

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN-LEÓN

Escuela de Medicina Veterinaria.



TEMA:

**Método Modificado de Tinción y Preparaciones Permanentes de Nematodos
Gastrointestinales en Rumiantes en el período de julio-agosto del 2009.**

**Br. Lipcia Junnieth Silva Montalván
Br Alex Modesto Saldaña Romero.
Autores.**

**Dra. Carolina Cárcamo
Tutor.**

**Msc. Rubén Carballo Manzanares.
Asesor.**

**2009
León, Nicaragua.**

DEDICATORIA:

A Dios nuestro señor por regalarme la vida y brindarme fortaleza, sabiduría por ser siempre mi guía en todos mis caminos y estar a mi lado en cada momento de mi vida.

A mis padres por estar siempre a mi lado, brindándome su apoyo incondicional y por llenar mi vida de alegría y gozo.

AGRADECIMIENTO:

En primer lugar agradezco a Dios mi señor por ser el creador de todas las cosas por permitirme cada día y culminar con éxito mi carrera como médico veterinario.

A mis padres por darme tanto amor, inculcarme buenos valores, por aconsejarme siempre y darme palabras de aliento en todo momento.

A mi novia Isabel por apoyarme incondicionalmente y darme amor, alegría a mi vida.

A mi tutora Dra. Carolina Cárcamo por brindarme sus conocimientos y esforzarse por ayudarme a lograr alcanzar el éxito.

De gran manera agradezco a mi asesor Msc. Rubén Carballo por apoyarme siempre, por transmitirme sus conocimientos, por dirigirme en el camino correcto.

De igual manera agradezco a mi hermano Juan José, a mi amigo Juan José Talavera Berrios, y al personal encargado del área de matanza y destace de ovinos-caprinos de Xochilacalt Malpaisillo por colaborar en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	3
IV. Justificación	4
V. Planteamiento del Problema	5
VI. Hipótesis	6
VII. Objetivo General	7
VIII. Objetivos Específicos	8
IX. Revisión Literaria	9
1- Phylum Nematelmintos	9
1.1- Características Generales de esta clase	9
1.2- Características Morfológicas y Estructurales de los Nematodos	10
1.3- Órgano Reproductor del Macho	13
1.4- Órgano Reproductor de la Hembra	13
2- Nematodos Gastrointestinales Comunes en Rumiantes	14
2.1- Género Trichuris	14
2.2- Género Chabertia	15
2.3- Género Ostertargia	16

2.4- Género Trichostrongylus	18
2.5- Género Oesophagostomun	21
2.6- Género Bunostomun	23
2.7- Género Haemonchus	26
2.8- Género Cooperia	28
3- Diagnóstico Parasitológico	29
3.1- Técnicas de Laboratorio	29
3.2- Procedimientos usados en el Laboratorio de Parasitología	29
3.3- Procedimientos para la Investigación de un Cadáver	30
3.4- Fijación y Conservación de Parásitos	31
3.5- Fijación de Artrópodos y Nematodos	34
3.6- Estudios Coprológicos	34
3.7- Aclaración de Nematodos	35
3.8- Preparaciones Semipermanentes de Nematodos	37
3.9- Preparaciones Permanentes	38
3.10- Conservación de Parásitos y Preparaciones Duraderas	39
X. Material y Método	41
1- Material utilizado	41
2- Localización del Estudio y Tipo de Estudio	41
3- Procedimiento para la Obtención de la Muestra	41

4- Preparación del Medio de Tinción Carmín Acético	42
5- Preparación del Lactofenol Solución Aclarante	42
6- Protocolo de Nematodos Método Estándar	43
7- Generalidades del Protocolo Método Modificado en Nematodos	44
8- Aplicación Del Método Modificado de Tinción Carmín Acético	45
XI. Resultados	46
XII. Discusión	47
XIII. Conclusiones	49
XIV. Recomendaciones	50
XV. Referencia Bibliográfica	51
XVI. Anexos	53

Silva Montalván Lipcia J. Saldaña Romero Alex M., Cárcamo Narváez C., Carballo, Manzanares R. (2009). Método de Tinción Carmín Acético Modificado para Preparación Permanente de Nematodos Gastrointestinales en Rumiantes. Programa de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. (UNAN-LEÓN).

Palabras claves: *Lactofenol, Carmín Acético, Resina Sintética, Aclarado, Nematodos.*

I. RESUMEN

EL presente estudio se realizó, con el objetivo de desarrollar, el Método de tinción Carmín Acético modificado para preparaciones permanentes de nematodos gastrointestinales en rumiantes 3 géneros de parásitos diferentes: Trichuris, Oesophagostomun, Haemonchus. En el trabajo experimental, se utilizó el método modificado de preparaciones de tinciones permanentes de nemátodos en un grupo de 14 parásitos, compuestos por: 10 del género Haemonchus, 2 Trichuris, 2 Oesophagostomun y pasando, los 3 tipos por el mismo proceso: aclarándose con Lactofenol, teñidos con Carmín Acético, montados con Resina Sintética, aplicándosele los cambios en tiempo de aclarado, pasajes por alcohol, tiempo de tinción, y de temperatura. Obteniéndose como resultado, que el Método Modificado resulto ser; efectivo para los parásitos del género Haemonchus y no muy bueno para los de Trichuris y Oesophagostomun.

II. INTRODUCCIÓN

Los nematodos parásitos de los animales domésticos tienen gran importancia económica, debido a la frecuencia y elevada morbilidad con que se presentan, en las diferentes especies; generalmente tienen carácter crónico y la mayoría interfiere con un buen crecimiento. Se localizan en la mayoría de los órganos, sin embargo es el tracto digestivo en donde se encuentran la mayoría de las especies. Tienen ciclo evolutivo directo o indirecto y algunas de ellas tienen importante papel como zoonosis (3).

Estas parasitosis provocan diferentes trastornos que interfieren en la correcta nutrición del animal, retraso en la madures sexual, disminución en la producción de carnes y la aparición de muchos signos clínicos importantes entre ellos la anorexia, anemias, retardo de crecimiento, predisposición a enfermedades de orden secundario y a veces hasta la muerte (11).

Se pretende poner en práctica un método modificado para la preparación de tinciones de nematodos con el propósito de disminuir el tiempo de espera y los costos del montaje de preparaciones. De resultar efectivo, el método a utilizar mejoraría las técnicas diagnósticas en los laboratorios de parasitología, ya que permitiría una correcta observación, determinación, conservación, y diagnóstico de parásitos nematodos adultos obtenidos del tracto gastrointestinal de rumiantes.

Se describen en este documento las composiciones, preparaciones, y procedimientos de las soluciones de: líquidos fijadores, conservadores, aclaradores y de tinción de mejor eficacia en nematodos. Los cuales son: Lactofenol aclarador, Carmin Acético como medio de tinción y Resina Sintética como medio de montaje final. Estos métodos son empleados en la preparación permanentes de nemátodos del tracto gastrointestinal de los rumiantes.

III. ANTECEDENTES

No existen antecedentes en Nicaragua de la práctica de estos métodos de preparaciones permanentes en nemátodos gastrointestinales de rumiantes.

Existe información acerca del desarrollo del Método Estándar en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM, México (14).

IV. JUSTIFICACIÓN

Poner en práctica el método modificado de tinción para preparaciones permanentes de nematodos gastrointestinales en rumiantes ya que en Nicaragua no existe referencia que se halla llevado a cabo, Siendo este método de vital importancia en los estudios relacionados en parasitología de medicina veterinaria.

Otro aspecto importante es que esta investigación será la línea de partida para otros estudios relacionados con este campo.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El procedimiento estándar para la preparación de tinciones y montajes permanentes de nematodos gastrointestinales en rumiantes son costosos y requieren gran cantidad de tiempo invertido. A pesar de ello, son una herramienta indispensable para la docencia en Parasitología Veterinaria y para el diagnóstico efectivo.

Con propósito de reducir los costos y el tiempo requerido para realizar tinciones y montajes permanentes de nematodos se pretende desarrollar un método que produzca resultados similares al método estándar de tal manera que sea capaz de ayudar de forma didáctica en un mejor aprendizaje en la identificación y diferenciación de nematodos gastrointestinales de rumiantes.

VI. HIPÓTESIS

Las preparaciones con Método Modificado de Tinción y Preparación Permanente de Nematodos Gastrointestinales en Rumiantes no permite la identificación correcta de estructuras morfológicas de nematodos.

VII. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar el Método de Tinción “Carmín Acético” Modificado para Preparaciones Permanentes de Nematodos Gastrointestinales en Rumiantes.

VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el protocolo para la tinción permanente “Carmín Acético” en los nematodos de acuerdo al Método Modificado.

- Describir las modificaciones realizadas en el trabajo realizado.

- Detallar la estructura interna de los nematodos a través del Método Modificado.

IX. Revisión Literaria

1- PHYLUM NEMATELMINTOS

El phylum nematodos incluye el grupo más numeroso de parásitos de los animales domésticos y del hombre. Su cuerpo es cilindroide, no segmentado con un tracto intestinal y una cavidad general. Son de forma redonda en sección transversa y están cubiertos por una cutícula más o menos resistente a la digestión intestinal (3).

Los nematodos son gusanos que se encuentran extensamente distribuidos en una variedad de hábitads. Algunos tienen vida libre otros son parásitos de plantas y de animales vertebrados o invertebrados.

1.1- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE ESTA CLASE

- Son vermes redondos no segmentados, encontramos especies libres y parásitos.
- El cuerpo es filiforme, con simetría bilateral.
- Tamaño variable desde algunos mm hasta un metro de longitud.
- Poseen aparatos digestivos, sexos separados y ciclos vitales indirectos y directos.

1.2- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE LOS NEMATODOS

a- CAPA SUPERFICIAL CONFORMADA POR UNA CUTÍCULA Y LA HIPODERMIS

- i) La cutícula es formada por la hipodermis esta es diferente entre los mismos parásitos es mas gruesa e impermeable para un género que otro, algunos poseen cutícula muy fina (3). La cutícula esta constituida por sustancia acelular que contiene queratina colágeno; hidratos de carbono y proteínas esclerotizadas. La cutícula cubre la porción anterior y posterior del sistema digestivo, también la vagina y el poro excretor. La ultra estructura esta conformada por tres capas (fibrilar, matriz, corteza) otra capa lipidica llamada epicutícula que interviene en la evasión de la respuesta inmune del hospedador. Los nematodos cada vez que pasan de un estadio larvario a otro cambian de cutícula (11).
- ii) La hipodermis; es sincitial y solo en algunas especies tienen estructura celular. La parte sincitial presenta unas estructuras llamadas fibrillas que van a dar origen a cuatro cordones gruesos y estos a su vez dan origen a cuatro cuadrantes. Los cordones son uno dorsal otro ventral y dos laterales. En los cordones dorsales y ventrales encontramos nervios y en los laterales se encuentran los canales excretores (3).

b- SISTEMA MUSCULAR

Es continuación de la hipodermis. Esta formada por células que tienen una parte contráctil o fibrilar y otra citoplasmática fibrilar no contráctil donde se halla el núcleo. La localización contráctil de estas células se halla en el núcleo, y ayudan en la clasificación de los nematodos y la cantidad de células musculares por el cuadrante.

SE CLASIFICAN EN

- i) Tipo Ectomariano: Máximo 4 células musculares.
- ii) Tipo Polimariano: Mas de 5 células musculares.

De acuerdo a la localización de los elementos contráctiles de las células musculares, se clasifican en:

- i) Tipo Platimariano: Elemento contráctil en el lado de la hipodermis
- ii) Tipo Celomariano: Contráctil en los lados de las células.
- iii) Tipo Carcomariano: Contráctiles alrededor en la parte interna de las células.

c- SISTEMA DIGESTIVO

i) BOCA

El orificio bucal con tener situación apical, subdorsal o ventral pueden presentar labios o corona foliácea, ganchos o no.

ii) CAVIDAD BUCAL

En el fondo de esta cavidad podemos encontrar ganchos, dientes u otras modificaciones cuniculares, algunos no presentan.

-Esófago

Secretan enzimas tienen una fuerte musculatura 3 glándulas esofágicas.

-Intestino

Es un tubo cilíndrico con pared no muscular compuesta por una lámina basal y por una sola capa epitelial de células.

iii) RECTO

Es una invaginación cuticular que en algunos nematodos poseen glándulas tienen función de absorción, defecación, secretora. En los machos forma un poro común genital y digestivo.

d- SISTEMA EXCRETOR CONFORMADO POR

- i) Un sistema glandular o recto es típico en estado larvario.
- ii) Un sistema canalicular célula H: formado por dos lóbulos laterales que se encuentra dentro de los cordones laterales de la hipodermis. El poro excretor generalmente se encuentra en el extremo anterior. La función de este sistema es mas bien osmorreguladora o incluso secretora. Estas células de la hipodermis también están formadas por glándulas que secretan acetilcolinesterasa y proteasas.

e- SISTEMA NERVIOSO

Está formado por un anillo circunfaringeo el cual se compone por un ganglio dorsal uno ventral y dos laterales. En la región del ano existe otro anillo. Presenta órganos sensoriales llamadas papilas situadas en los extremos anteriores (anfidos) y posteriores (fasmidos) del cuerpo del nemátodo. Ambas papilas tienen función secretora del tipo glandular y sensorial con función quimiorreceptora (9).

f- SISTEMA REPRODUCTOR

Los órganos reproductores del macho y hembras están formados por tubos cuyo extremo distal es ciego. Estos tubos a lo largo de su longitud sufren modificaciones de grosor y estructura que da lugar a los órganos.

1.3- ÓRGANO REPRODUCTOR DEL MACHO

Esta formado por testículos, vesícula seminal, vaso deferente y conducto eyaculador que termina en una cloaca. El conducto eyaculador en algunas especies de nematodos está cubierto por algunas glándulas oprostática. La estructura son espículas órganos alargados, filiforme, este se forma en el saco dorsal de la cloaca llamado saco o bolsa especular. Existen diferentes tamaños de espículas. Músculos retractores y eyectores sostienen las espículas desde la cloaca. Otra estructura auxiliar copuladora es el gubernaculo cuya función es servir de guía a las espículas a la hora de la cópula, también hay bolsa copuladora que en algunos nematodos no la tienen desarrollada y en efectos presentan algunas ventosas o alas posteriores, todas estas estructuras tienen la función de sujetar a la hembra en el momento de la cópula (3).

1.4- ÓRGANO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA

Esta constituido por: ovario, el oviducto, receptáculo, seminal, ovoyector, vagina y vulva.

OVARIO:

El oviducto se empieza a formar en la zona germinal del ovario, situado en el extremo distal, luego avanza, empieza a crecer y finalmente madura, luego los ovocitos pasan en fila por el oviducto donde son transportados hacia el útero.

ÚTERO

Aquí los huevos terminan de madurar, ya que presentan una capa epitelial que segrega proteínas y glucolípidos para maduración del huevo.

La capa muscular es más gruesa al final del útero que a veces forma un ovoyector que funciona como válvula.

VAGINA

Esta cubierta en su parte proximal por la cutícula y termina en la vulva.

VULVA

Cuando se encuentra en la parte anterior del parásito se llama prodelfa posterior opistodelfos y en la parte media del cuerpo anfidelfa. Cuando los parásitos hembras tienen un solo ovario y útero se llaman monadelfas. Cuando tienen más de dos ovarios y útero se llaman didelfos. Cuando tienen más de dos ovarios y úteros se llaman polidelfos.

2- NEMATODOS GASTROINTESTINALES COMUNES EN RUMIANTES

CLASE: NEMATODA.

ORDEN: TRICHOCEPHALIDA

FAMILIA: TRICHURIDAE

GÉNERO: TRICHURIS

2.1- Género Trichuris spp

Los parásitos del género Trichuris poseen un cuerpo grueso poseen boca simple, con estrías transversales en la cutícula. La parte esofageal es delgada y muy larga. La relación, largo del esófago-largo total del cuerpo, puede ser de 2:1 hasta 5:1 partes. La relación puede variar entre machos y hembras de la misma especie. No posee la bolsa copulatriz. La única espícula delgada y larga posee una vaina (prepucio) que puede ser lisa o poseer pequeñas espinas. La vulva se encuentra en la proximidad de la unión de la parte anterior delgada del cuerpo-esófago y la posterior gruesa (3).

Trichuris ovis estructura

El macho mide de 50 a 80 mm x alrededor de 600 μ . La porción esofageal es aproximadamente tres cuartas partes del largo total del cuerpo.

La espícula mide de 5 a 6 mm, terminando puntiaguda. La vaina de la espícula es larga y tachonada de espinas puntiagudas. La hembra mide de 50 a 70 mm de largo hasta 1.000 μ de ancho. La porción Esofageal puede ser de dos a cuatro veces más larga que

la parte gruesa del cuerpo. La vulva se encuentra al empezar la parte gruesa del Cuerpo. Los huevos son de color pardo-oscuro, alargados con botoncitos polares transparentes; miden de 70 a 80 x 30 a 42 μ . En el momento de la postura no son segmentados .Se encuentran en Ciego e intestino grueso de: ovino, caprino, bovino.

CLASE: NEMATODA

ORDEN: STRONGYLIDA

FAMILIA: CHABERTIDAE

GÉNERO: CHABERTIA

2.2- GENERO CHABERTIA

Chabertia ovina se presenta en el colon se ovejas, cabras, vacas y otros rumiantes de todo el mundo. Los machos miden 13-14mm de longitud y las hembras 17-20mm.

ESTRUCTURA

El extremo anterior esta ligeramente curvado hacia la cara ventral y la gran cápsula bucal se abre anteroventralmente.

La apertura oral esta rodeada por un doble circulo de pequeños elementos cuticulares, que sustituyen a las coronas radiadas. La bolsa copuladora del macho esta bien desarrollada, sus espículas miden 1.3-1.7mm de longitud tienen gubernaculum. La vulva de la hembra se abre unos 0.4mm del extremo posterior. Los huevos miden 90-105 por 50-55micra (11).

CICLO VITAL

Es directo la infestación se produce por vía oral.

SIGNOS CLÍNICOS

Animales fuertemente infestados presentan diarrea sanguinolenta y mucosa, anemia y pueden morir.

DIAGNÓSTICO

Investigación de huevos en heces, identificación de las larvas en cultivos fecales.

TRATAMIENTO

Benzimidazoles.

CLASE: NEMATODA

FAMILIA: TRICHOSTRONGYLIDAE

GÉNERO: OSTERTAGIA

2.3- GÉNERO OSTERTAGIA SPP

ESPECIE	HOSPEDADORES	LOCALIZACION
<i>O.circumcineta</i>	Ovino	Abomaso (cuajar).
<i>O. ostertagi</i>	Vacuno	Abomaso (cuajar).
<i>O.trifurcata</i>	Oveja, cabra, vaca.	Abomaso (cuajar).

Las especies de este género que se presentan en el cuajar y más raramente en el intestino delgado de ovejas, cabras, vacas y otros rumiantes se les conoce como el gusano pardo en el estómago posee este color en estado fresco son gusanos delgados.

OSTERTAGIA OSTERTAGI

Se presenta en el cuajo del ganado vacuno, al cual están muy adaptados, en cabras y más raros en ovejas.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 6.5 – 7.5 mm de longitud, las hembras de 8.3 – 9.2 mm.

OSTERTAGIA CIRCUMCINETA

Se presenta en el cuajar del ganado ovino y caprino.

ESTRUCTURA

Los machos miden 7.5-8mm de longitud hembras de 9.8-12.2mm.

OSTERTAGIA TRIFURCATA

Se presenta en cuajar de ovejas, cabras, puede encontrarse en bóvidos. El macho mide 6.5-7mm de longitud.

CICLO VITAL

Es directo muy similar al de otros tricostrongilidos la larva de tercer estado es ingerida, desenvaina en el rumen y penetra en las glándulas gástricas de la mucosa del cuajar. Las mudas 3 y 4 se producen en las glándulas y los adultos parásitos emergen a los 18 -21 días de la infestación, a menos que se halla producido hipobiosis. El período prepatente dura tres semanas.

EPIDEMIOLOGÍA DE OSTERTAGIA SPP

El desarrollo y la supervivencia de las fases de vida libre son similares en esencia a otros tricostrongilidos gastrointestinales.

La velocidad de desarrollo de los huevos hasta el tercer estado larvario depende de la temperatura medioambiental sea superior a 10°C.

Las larvas de ostertagia son muy resistentes al frío no son tan resistentes a la desecación.

SIGNOS CLÍNICOS: Reducción del apetito y diarreas.

DIAGNÓSTICO: Antecedentes de pastoreo y signos clínicos.

CLASE: NEMATODA

FAMILIA: TRICHOSTRONGYLIDAE

GÉNERO: TRICHOSTRONGYLUS

2.4- GÉNERO TRICHOSTRONGYLUS SPP

ESPECIE	HOSPEDADORES	LOCALIZACION
T. Columbriformis	Ovino, caprino, bovino	Intestino delgado
<i>T. facultatus</i>	Ovejas, cabras	Intestino delgado
<i>T. vitrinus</i>	Ovejas, cabras	Intestino delgado
<i>T. capricola</i>	Ovejas, cabras	Intestino delgado
<i>T. probolorus</i>	Ovejas, cabras	Intestino delgado
<i>T. axei</i>	Bovino, caprino	Cuajar
<i>T. rugatus</i>	Ovejas, cabras	Intestino delgado

ESTRUCTURA DE LOS TRICHOSTRONGYLUS

Las especies del género son pequeñas delgadas de color pardo-rojizo pálido, sin extremo cefálico manifiesto no posee cápsula bucal. El poro excretor esta situado normalmente en una visible hendidura próxima al extremo anterior. La bolsa copuladora del macho tiene largo lóbulos laterales, mientras que el lóbulo dorsal no esta bien definido. Los radios ventrales están ampliamente separados, y el radio ventroventral es mucho mas fino que el lateroventral, el cual es paralelo a los radios laterales (3).

El radio dorsal es delgado y esta hendido en su extremo en dos ramas que terminan en pequeñas lancetas. Las espículas son fuertes acanaladas, de color pardo; hay un gubernaculum. Los huevos son ovales, de cascara finas y segmentados en el momento de la puesta.

TRICHOSTRONGYLUS COLUMBRIFORMIS

Se encuentran en porción anterior del intestino delgado.

Silva-Saldaña.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 4-5.5mm de longitud y las hembras 5-7mm. Las espículas son iguales, de 0.135 a 0.156 mm de longitud. Los huevos miden 79-101 por 39-47 μm .

TRICHOSTRONGYLUS FACULTATUS

Se presentan en intestinos delgados de ovejas, cabras.

ESTRUCTURA

Machos miden 4.5- 5.6mm de longitud. Las espículas son subiguales, de unos 0.1 mm de longitud.

TRICHOSTRONGYLUS VITRINUS

Intestino delgado de ovejas, cabras.

ESTRUCTURA

Las espículas son iguales, de 0.16 a 0.17mm de longitud. Los huevos miden de 93-118 por 41-53 μm . los machos miden de 4-7mm de longitud, y las hembras, de 5 a 8 mm.

TRICHOSTRONGYLUS CAPRICOLA

Intestino delgado de ovejas, cabras.

ESTRUCTURA

Las espículas son iguales, de 0.13 a 0.145mm. Los machos miden de 3.5-5.5mm y hembras de 5-6.4mm.

TRICHOSTRONGYLUS AXEI

Se presenta en el cuajar del ganado caprino, bovino, ciervos.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 2.5-6mm de longitud y las hembras, de 3.5 -8mm. Las espículas son de diferentes tamaños y forma .La derecha mide 0.085-0.095mm de longitud y la izquierda, de 0.11-0.15mm. Los huevos miden 79-92 por 31-41µm.

TRICHOSTRONGYLUS RUGATUS

Intestino delgado de ovejas y cabras.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 4-6.6mm de longitud y las hembras, de 5.8-7.3mm. Las espículas son de diferentes tamaños y forma. La derecha mide de 0.137-0.145mm de longitud y la izquierda de 0.141-0.152mm (15).

TRICHOSTRONGYLUS PROBOLORUS

Intestino delgado ovejas, cabras accidentalmente el hombre.

EPIDEMIOLOGÍA

El desarrollo y supervivencia de las fases de la vida libre dependen de las condiciones atmosféricas y de los pastos.

En general las fases infestantes se producen en 4-6 días en condiciones óptimas a 27°C, la temperatura mínima para el desarrollo oscila entre 10 y 15 grados centígrados.

CICLO VITAL

La infestación se realiza por ingestión de las larvas infestadas junto con la hierba.

En el caso del *T. Columbriformis* y *T. Axei* la larva parásita del tercer estado se encuentra en el cuajar o en el intestino delgado de 2 – 5 días después de la infestación.

Larva del cuarto estado se forma a los 7 días y la del quinto estado a los 15 días post-infestación. El período prepatente dura unos 20 días.

SIGNOS CLÍNICOS

En ovejas y cabras los animales jóvenes son más susceptibles presentan debilidad en las patas y piel seca, posibles diarreas.

DIAGNÓSTICO

Cultivo de heces, identificación de larvas infestantes.

CLASE: NEMATODA

ORDEN: STRONGYLIDA

FAMILIA: CHABERTIDAE

GÉNERO: OESOPHAGOSTOMUN

2.5- GÉNERO OESOPHAGOSTOMUN SPP

ESPECIE	HOSPEDADORES	LOCALIZACIÓN
<i>O. aspersun</i>	Caprino	Ciego y colón
<i>O. Colombianun</i>	Ovino, caprino	Intestino grueso
<i>O. radiatum</i>	Vacuno	Intestino grueso
<i>O. Venulosum</i>	Ovino, caprino	Intestino grueso

Los miembros de este género presentan una cápsula bucal cilíndrica normalmente estrecha. Muestran surco cervical ventral cerca del extremo anterior por delante de la cual la cutícula se dilata formando una vesícula cefálica (3).

Las especies de este género también son conocidos como gusanos nodulares por formar nódulos en la pared intestinal, pueden encontrarse en el intestino delgado y grueso de vacas, cabras y ovejas (9).

OESOPHAGOSTOMUN COLUMBIANUN

Se presentan en ovejas y cabras.

Silva-Saldaña.

ESTRUCTURA

El macho mide de 12 – 16.5mm de longitud, y la hembra, 15 – 21.5mm por 0.45mm de anchura. Hay amplias alas cervicales que producen una marcada curvatura dorsal de la zona anterior del cuerpo.

La cutícula forma un collar bucal, que se presenta separado del resto del cuerpo por una construcción. La bolsa copuladora del macho esta bien desarrollada y presenta dos espículas iguales y aladas de 0.77 – 0.86mm de longitud. La vulva esta situada unos 0.8mm por delante del ano (3).

EPIDEMIOLOGÍA

Es de distribución mundial frecuente en zonas tropicales y subtropicales. La epidemiología de los nematodos gastrointestinales esta basado fundamentalmente en las condiciones ambientales clima, humedad velocidad de migración de las larvas. Ninguno de los estados preinfestantes resiste la desecación.

CICLO VITAL

Los huevos salen del hospedador con sus heces y tanto el desarrollo como la binomina de las fases libres son similares al strongylus spp. En condiciones óptimas alcanza el estado infestante en 6 o 7 días.

PATOGENIA

Presenta acción expoliatriz alimentándose de sangre debido a su ingesta produce anemia e hipoproteinemia, presenta acción irritativa al producir reacción inflamatoria.

SÍNTOMAS

Pérdida del apetito, pérdida de peso, retardo del crecimiento y anemia.

DIAGNÓSTICO

Examen coprológico, necropsia en caso de diagnóstico anatomopatológico.

TRATAMIENTO

Benzimidazoles.

OESOPHAGOSTOMUN VENULOSUM

Se presentan en colón de ovejas, cabras.

ESTRUCTURA

El macho mide 11-16mm de longitud, la hembra 13 – 24 mm no poseen alas cervicales, ni laterales.

CICLO BIOLÓGICO

Tras la ingestión de las larvas infestantes se producen formas enquistadas en la pared del intestino delgado en donde se realiza la muda al cuarto estadio larvario 4 días después de la infestación .Vuelven a la luz intestinal, pasan al intestino grueso y realizan la muda a adulto a los 13 – 16 días post-infestación, comenzando el período de patencia a los 28 – 31 días (9).

OESOPHAGOSTOMUN ASPERSUM

Se encuentra en el intestino grueso de cabras y ovejas.

ESTRUCTURA

Los machos miden 12 – 13mm de longitud y las hembras de 15 – 17 mm

CLASE: NEMATODA

ORDEN: STRONGYLIDA

FAMILIA: ANCYLOSTOMATIDAE

GÉNERO: BUNOSTOMUM

2.6- GÉNERO: BUNOSTOMUM SPP

Silva-Saldaña.

ESPECIE	HOSPEDADORES	LOCALIZACIÓN
<i>B. phlebotomun</i>	Vacuno	Intestino delgado
<i>B. trigonocephalum</i>	Ovino, caprino	Intestino delgado

BUNOSTOMUM TRIGONOCEPHALUM

Es un ancilostomido que se presentan en el intestino delgado (íleon y yeyuno) de ovejas y cabras en muchas partes del mundo.

ESTRUCTURA

Los machos miden 12-17 mm de longitud y las hembras 19-26mm el extremo anterior se halla curvado en dirección dorsal, por lo que la cápsula bucal se abre anterodorsalmente, esta es relativamente ancha y lleva en su margen ventral un par de placas quitinosas, próximas a su base hay un par de pequeñas lancetas subventrales. El túnel dorsal, que contiene el conducto de la glándula esofágica dorsal, termina en un amplio cono dorsal, que se proyecta en el interior de la cavidad bucal. No hay dientes dorsales en la cápsula (4).

La bolsa copuladora del macho esta bien desarrollada y tiene un lóbulo dorsal asimétrico.

Las espículas son delgadas, aladas y miden de 0.6-0.64mm de longitud. Los huevos miden 79-97 por 47-50µm; los extremos son absolutamente redondeados, las células embrionarias presentan una granulación oscura (4).

EPIDEMIOLOGÍA

Este parásito se localiza en muchas partes del mundo tiene un mejor desarrollo en climas húmedos, las larvas infestantes no resisten la desecación, por lo que la infestación se produce invariablemente en pastos permanentes u ocasionalmente húmedos. Se les encuentra en charcos o suelos con muy pocos drenajes.

CICLO VITAL

Silva-Saldaña.

El desarrollo es directo. La infestación del hospedador se produce por vía oral o a través de la piel, a continuación de la penetración dérmica la larva llega al pulmón donde se produce la tercera ecdisis, el cuarto estado larvario que posee cápsula bucal vuelve al intestino pasado 11 días y los primeros huevos aparecen en las heces en los 30-56 días post-infestación (1).

PATOGENIA

Acción expoliatriz adultos succionan sangre.

SÍNTOMAS

Anemia progresiva, edema intermandibular, diarrea de color oscuro, postración, y muerte posterior.

DIAGNÓSTICO

Coprológico observación de signos clínicos, cultivo de larvas.

TRATAMIENTO

Antihelmínticos para nematodos gastrointestinales.

BUNOSTOMUM PHLEBOTOMUM

De amplia distribución se encuentra en el intestino delgado, principalmente en el duodeno del ganado vacuno.

ESTRUCTURA

El macho mide de 10-18mm de longitud y la hembra 24-28mm, es muy semejante al *B. trigonocephalum*, pero se diferencia de ella porque el cono dorsal es mas corto, por la presencia de dos pares de lancetas subventrales en la cápsula bucal y por la mayor longitud de las espículas del macho que miden 3.5-4mm de longitud. Los huevos miden 106 por 46µm. son de extremos romos y contienen células embrionarias fuertemente

Silva-Saldaña.

pigmentadas por lo que pueden diferenciarse de otros huevos de helmintos presentes en las heces (12).

CLASE: NEMATODA

FAMILIA: TRICHOSTRONGYLIDAE

GÉNERO: HAEMONCHUS

2.7- GÉNERO HAEMONCHUS SPP

ESPECIE	HOSPEDADORES	LOCALIZACION
<i>H. contortus</i>	Vacuno, ovino, caprino.	Cuajar
<i>H. placei</i>	Vacuno	Cuajar

HAEMONCHUS CONTORTUS

Importante género del cuajar de diversos rumiantes, en ovejas, cabras, vacas, es conocido como el gusano del cuajar de los rumiantes, es una de las especies más patógenas.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 10 a 20 mm de longitud, y las hembras de 18 a 30 mm. El macho tiene un color rojizo uniforme, mientras que las hembras los ovarios blancos enrollados en espiral alrededor del intestino rojo le dan un aspecto rayado.

Las papilas cervicales son prominentes y espiniforme. Hay una pequeña cavidad bucal que contiene una lanceta dorsal (3).

La bolsa del macho tiene lóbulos laterales alargados, sustentados por radios largos y finos. El pequeño lóbulo dorsal es asimétrico y está desviado hacia el lóbulo lateral izquierdo, siendo sustentado por un radio dorsal en forma de Y.

Silva-Saldaña.

Las espículas miden de 0.46 a 0.506mm de longitud y cada una lleva una pequeña lengüeta cerca del extremo. La vulva de la hembra esta cubierta normalmente por un proceso lingüiforme (solapa vulvar), que suele ser grande y muy prominente pero que puede ser reducido en otro ejemplares (8).

Los huevos miden de 70 a 85 por 41 a 48mm y salen con las heces del hospedador conteniendo un embrión de 16 a 32 células.

DIAGNÓSTICO DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Los signos clínicos, por si solos, pueden conducir a la sospecha de hemoncosis y si además hay recuentos altos de números de huevos de heces (incluyendo la identificación de larvas en cultivos fecales), se poseen datos suficientes para establecer un diagnóstico. Sin embargo el diagnóstico definitivo solo puede hacerse mediante necropsia de un caso clínico representativo del rebaño.

HAEMONCHUS PLASEI

Se encuentra en el ganado bovino localizado en el cuajar.

CICLO VITAL

El desarrollo parasitario de *h. contortus* es muy similar al de otro estrombilidos. En condiciones ambientales adecuadas se alcanza el estado infestante en 4 a 6 días. Las bajas temperaturas retardan el desarrollo y por de bajo de 9 grados centígrados hay poco o ningún desarrollo. *H. contortus* no resisten la desecación ni las bajas temperaturas. A continuación de la ingestión de las larvas infestantes se produce el desenvainamiento en el rumen y las fases larvarias del parásito migran al cuajar, penetrando entre las glándulas epiteliales gástricas de los cuales salen como larvas del cuarto estado. El período prepatente *H. contortus* en ovejas dura unos 15 días y el de *H. placei* en vacas dura entre 26 a 28 días (8).

SIGNOS CLÍNICOS

Anemia, heces de color oscuro, y muerte súbita, debido a la aguda pérdida de sangre.

Silva-Saldaña.

CLASE: NEMATODA

FAMILIA: TRICHOSTRONGYLIDAE

GÉNERO: COOPERIA

2.8- GÉNERO COOPERIA SPP

ESPECIE	HOSPEDADORES	LOCALIZACION
<i>C. curticei</i>	Ovino, caprino	Intestino delgado
<i>C. oncophora</i>	Vacuno, ovino	Intestino delgado
<i>C. pectinata</i>	Vacuno, ovino	Intestino delgado
<i>C. punctata</i>	Vacuno.	Intestino delgado

Las especies de este género se encuentran normalmente en el intestino delgado con menos frecuencia en el cuajar de los rumiantes, son gusanos relativamente pequeños de color rojizo.

ESTRUCTURA

La bolsa copuladora del macho tiene un pequeño lóbulo dorsal. La vulva puede estar cubierta con una pequeña solapa y esta situada por de tras de la línea media del cuerpo.

COOPERIA CURTICEI

Con mayor presencia en ovejas y cabras, más raramente, en ganado vacuno.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 4.5 a 5.4 mm de longitud y las hembras de 5.8 a 6.2 mm.

COOPERIA PUNCTATA

Se presenta en el ganado vacuno y con frecuencia en ovinos.

Silva-Saldaña.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 4.7 a 5.9 mm de longitud y las hembras de 5.7 a 7.5 mm de longitud.

COOPERIA ONCOPHORA

Se da principalmente en ganado vacuno, también en ovinos.

ESTRUCTURA

Los machos miden de 5.5 a 9 mm de longitud y las hembras de 6 a 8 mm.

COOPERIA PECTINATA

Se presenta en el ganado vacuno y con menos frecuencia en ovinos.

ESTRUCTURA

El macho mide cerca de 7 mm y la hembra de 7.5 a 9 mm de longitud.

3- DIAGNÓSTICOS PARASITOLÓGICOS

3.1- TÉCNICAS DE LABORATORIO

Procedimientos sobre conservación de parásitos, detección, diagnóstico, preparación y montaje.

También se exponen técnicas de examen diagnóstico para determinación de diferentes tipos de especímenes.

3.2- Procedimientos que se realizan en el laboratorio de parasitología (1)

1.- Realizar análisis rutinarios de muestras clínicas, reconociendo las características importantes de los parásitos presente.

Silva-Saldaña.

- 2.- Calibrar y utilizar el micrómetro ocular para la medición de parásitos y sus huevos.
- 3.- Realizar análisis coprológicos para diagnóstico de determinadas parasitosis.
- 4.- Montar preparaciones frescas y permanentes de diferentes grupos de parásitos.
- 5.- Ejecutar técnicas de concentración de parásitos o huevos.
- 6.- Preparar frotis sanguíneos, de heces, delgados y gruesos.
- 7.- Realizar tinciones de preparaciones microscópicas.
- 8.- Realizar técnicas dirigidas a detecciones específicas de parásitos.
- 9.- Realizar recuentos de huevos en heces.
- 10.- Preparar los diferentes líquidos fijadores y colorantes, utilizados en parasitología.

3.3- PROCEDIMIENTOS PARA INVESTIGACIONES SOBRE EL CADÁVER

Con mucho cuidado y adecuadamente provistos de guantes de goma, bata de laboratorio, y en ocasiones mascarilla, ya que muchos huevecillos y larvas tienen capacidad de infestación, se procede al estudio parasitológico del animal vivo o su cadáver.

La disección de la cavidad abdominal y torácica permitirá la búsqueda de formas enquistadas o larvarias de helmintos.

Se analizarán los peritoneos parietal y visceral, en los que se pueden encontrar filarias adultas horadando las membranas serosas. Cada órgano extraído se colocará en un recipiente con suero fisiológico (para evitar que el shock osmótico reviente los parásitos). Los órganos huecos (intestino, conductos biliares, vesícula biliar, vejiga

urinaria, oviductos...) se abrirán con tijeras y se agitarán en suero fisiológico para desprender los parásitos que puedan estar adheridos al revestimiento epitelial (2).

Los órganos macizos (hígado, riñones, pulmones...) se desmenuzará con pinzas o tijeras.

Todos los recipientes conteniendo las vísceras con la solución salina o fisiológica, se dejarán sedimentar, eliminando el sobrenadante. (Se repite la operación tantas veces sea necesario hasta que el sedimento aparezca claro). El sedimento final se estudia bajo el microscopio. Es más aconsejable la observación en vivo de los helmintos, que posteriormente se fijarán según las técnicas que a continuación se exponen.

El estudio del contenido duodenal, y fecal, serán objeto de estudios coprológicos que se detallaran posteriormente (8).

3.4- FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE PARÁSITOS

Para conservar los parásitos de forma indefinida, a fin de que su morfología y estructura no se alteren con el tiempo, es preciso fijar los tejidos. Dependiendo del grupo zoológico al que pertenezca el parásito que pretendemos conservar, y la naturaleza de sus estructuras corporales, la técnica empleada podrá variar.

En el caso de que se trate de animales blandos, musculosos o retráctiles, previamente a la fijación se debe proceder a la relajación del animal, para que pueda permitir su estudio y determinación sin alteraciones morfológicas (7).

Relajación

Los animales pueden ser dormidos o relajados con varios procedimientos:

a) Con líquidos calientes (70-75 °C):

El líquido de Travaços a 70-75 °C hace que el cuerpo, de los Nematodos sumergidos en él, se relajen y estiren, antes de que mueran.

Silva-Saldaña.

b) Con frío

Colocando a los ejemplares en medio isotónico y enfriándolos en la nevera.

(En el caso de las duelas y otros platelmintos, da buen resultado situar los animales entre dos láminas de cristal y mantenerlas apretadas hasta su muerte y posterior fijación.)

c) Colocando los ejemplares vivos en medio isotónicos

Al que se le va añadiendo lentamente solución alcohólica de mentol y en el que deben de permanecer una hora.

Conservación indefinida

Los parásitos se pueden conservar indefinidamente en líquidos con base en fijadores como el **formol 4%** o el alcohol 70 %, dependiendo del filo, pero conviene realizar una fijación previa con fijadores más específicos.

Etiquetado

Para que un espécimen o una muestra tengan valor y puedan servir como base de un estudio científico debe ineludiblemente de ir acompañado de etiquetas identificativas en la que se indiquen: **Nombre específico, Nombre del hospedador, Ubicación del parásito, Localidad de recogida, fecha, y colector (1)**.

Líquidos Fijadores

Existen diversos líquidos fijadores que preservan los tejidos durante mucho tiempo.

Fijación de Platelminetos y Acantocéfalos

La mayoría de ellos tienen como base el formol, el alcohol, y el ácido acético. Cuando no se pretende realizar posteriores estudios histológicos, el más sencillo y utilizado de los fijadores es el formol al 4 %.

Silva-Saldaña.

Formol al 4%

Formalina (formol comercial al 40%) 1 parte

Suero fisiológico 9 partes

Cuando se desea conservar la flexibilidad de los ejemplares, se pueden emplear satisfactoriamente para Platelminfos y Acantocéfalos los fijadores de Gilson, de Bouin o el formol-acético- formol, cuyas composiciones a continuación se indican (16).

Fijador de Gilson

Sublimado corrosivo 5 g.

Agua destilada 220 ml

Acido Nítrico 4 ml

Acido acético glacial 1 ml

Alcohol etílico 70% 25 ml

Fijador de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico 75 partes

Formol comercial 25 partes

Acido acético glacial 5 partes

Formol - acético - alcohol (F.A.A.)

Alcohol etílico al 95 % 50 partes

Formol comercial 10 partes

Silva-Saldaña.

Acido acético glacial 2 partes

Agua destilada 25 partes.

3.5- Fijación de Artrópodos y Nematodos

En Nematodos, por su cutícula externa, los compuestos con base en formol no son los más adecuados, por que se deben fijar en alcohol de 70%. Se puede emplear, previamente, el líquido de Travasos, o una solución de glicerina y alcohol o formalina caliente al 5%(10).

Líquido de Travasos

Solución salina fisiológica de Ringer (0.9 %) 92 partes

Formol comercial 5 partes

Acido acético glacial 3 partes.

Al cabo de una hora puede pasarse para su conservación definitiva en alcohol al 70%.

Solución de glicerina - alcohol

Alcohol etílico de 70% 90 ml.

Glicerina 10 ml

Puede servir como conservante definitivo.

3.6- Estudios Coprológicos

Examen de heces. (Atención a la contaminación fecal)

Existen diversos procedimientos indicados según el tipo de parásito que se pretende identificar, siendo importante usar la adecuada, pues de lo contrario el parásito se hace muy difícil o imposible de identificar (2).

Silva-Saldaña.

- a. **Fijación:** Con formol, o alcohol, según el tipo de animal.
- b. **Coloración:** En ocasiones resulta indicado, para resaltar las estructuras internas que se ven por transparencia, una coloración sencilla con carmín, iodo, u otros colorantes (12).
- c. **Deshidratación** Se hace pasar por baños sucesivos de alcoholes de graduación creciente (70% a 80% 90% a absoluto) (12).
- d. **Intermediario:** Una vez escurrido el alcohol, y sin que el ejemplar se seque, se coloca sobre el portaobjetos y se añade una gota de xilol.
- e. **Aclarado:** Se puede añadir una gota de creosota de haya, que vuelve Transparente la preparación.
- f. **Inclusión:** Escurrido el xilol (y sin que nunca se seque) se pone la resina necesaria para el montaje (Bálsamo de Canadá, resina damar, o resinas sintéticas como Eukit, etc.).

Sobre la resina se coloca el cubreobjetos, procurando que no queden burbujas de aire. (Apoyando el borde del mismo sobre el porta con un ángulo de 40 °, y se deja caer suavemente). Se dejan secar en posición horizontal en estufa durante 24 horas (4).

3.7- Aclaración de los Nematodos

La impermeabilidad de su cutícula hace que los colorantes no penetren con facilidad, por lo que, para el estudio de sus órganos internos, deben de hacerse transparentes y montarse provisionalmente en glicerina, glicerina-gelatina, fenol al 88% o lactofenol (14).

Los ejemplares deben de estar en alcohol 70%, calentado a 70 °C. Si estuvieran fijados en formol, deberán pasarse a una mezcla a partes iguales de formol y alcohol 70% durante 3 horas y luego se hacen otros dos pases de 3 h. Por alcohol 70%(7).

- a. **Glicerina**

En una placa, con tapa no ajustada, se coloca glicerina al 10% en alcohol de 70%. Para que la evaporación lenta del alcohol permita el aclarado por la glicerina. (Puede tardar varios días)

b. Glicerogelatina

Gelatina incolora (Knox u otra) 8 g

Agua destilada 52 ml

Glicerina 50 ml

Albúmina de huevo (fresca) 5 ml

Cristales de fenol 0.1 g

Modo de preparación

Remojar la gelatina en agua 1 hora. Disolver calentando ligeramente. Añadir la glicerina y la clara de huevo, agitar hasta mezclar por completo y después calentar a 75 ° C durante 30 min. Filtrar a través de varias capas de franela fina. Añadir cristales de fenol al filtrado y mantener en frasco de boca ancha firmemente cerrado.

Modo de empleo

Para montar el ejemplar, transferirlo de la glicerina a un porta y cubrirlo con 2- 3 gotas de glicerogelatina fundida. Colocar un cubreobjetos circular. Cuando se haya endurecido, se colocan unas gotas de Permout encima de cubreobjetos y se coloca otro cubreobjetos, más grande, cuadrado. Se sella la preparación rebordeando (11).

Éste método es excelente para las preparaciones permanentes de huevos de helmintos.

c. Fenol al 88%

Silva-Saldaña.

(Atención es corrosivo de metales y piel) El aclarado es más rápido si desde alcohol al 70% se pasa a fenol al 88%. Los ejemplares grandes se colocan en una placa, mientras que los pequeños se puede hacer en un porta excavado con un cubre. El tiempo del aclarado es aproximadamente de 5 a 10 minutos.

Una vez terminada la observación se elimina el fenol con varios pasos por alcohol de 70%, donde se conservarán en alcohol-glicerina.

d. **Lactofenol**

Aunque menos rápido también es menos cáustico y más seguro de usar que el fenol, da muy buenos resultados (3).

Fenol licuado..... 1 parte.

Acido láctico..... 1 parte

Glicerina..... 2 partes

Agua destilada.... 1 parte

Si se utiliza en caliente, el aclarado es más rápido y existe menos distorsión (13).

3.8- Preparaciones semipermanentes de Nematodos

Una alternativa al procedimiento anterior que sirve para el montaje tanto de Nematodos como de pequeños artrópodos.

Silva-Saldaña.

Líquido de Hoyer

Goma arábica.... 30 g.

Agua destilada.... 50 ml

Glicerina..... 20 ml.

Hidrato de coral... 200g.

Mezclar en el orden indicados y filtrar a través de 8-10 capas de gasa.

Empleo:

Se coloca una gota de líquido de montaje en un portaobjetos, orientando los ejemplares, y aplicando un cubreobjetos. Para extender los ejemplares vivos se calienta la preparación en la llama de alcohol. Al cabo de un mes se puede sellar los bordes, con goma de asfalto de Murallita, o laca de uñas.

3.9- PREPARACIONES PERMANENTES

El Bálsamo de Canadá es un excelente medio de montaje, pero requiere una preparación muy cuidadosa del material, pasándolo por concentraciones recientes de alcohol para eliminar toda el agua. En este proceso puede producirse un encogimiento especialmente en los nematodos, difícil de eliminar. La aplicación de la glicerogelatina es más simple pero también produce encogimiento, es sin embargo muy útil para huevos y nematodos pequeños que tienden a transparentarse demasiado en otros medios (13).

Para todos los materiales no teñidos tales como nematodos, escólex de cestodos, acantocéfalos y artrópodos, un medio muy apropiado sería la siguiente mezcla 60 partes de goma arábica, 40 de glicerina, 100 de hidrato de coral y 1 de timol. Los

Silva-Saldaña.

especímenes se transfieren desde alcohol del 70% a glicerina de 50% y después se montan en el medio de la goma arábica.

Mientras que los nematodos se examinan normalmente en lactofenol en el que se colocan desde el alcohol de 70 %, los cestodos y trematodos todos deben ser teñidos, puesto que es necesario estudiar las estructuras para lo cual se montan en el bálsamo en la forma ordinaria .Se han empleado varios colorantes como por ejemplo: la hematoxilina de Delafield, la hematoxilina de Ehrlich, paracarmin y carmín acético al 2%. Normalmente se recomienda diluir bastante el colorante con agua destilada y prolongar el tiempo de tinción, en lugar de utilizar el colorante concentrado. Los ejemplares deben estar teñidos en exceso para diferenciarlos mediante alcohol-ácido al 0.1% con solución de alumbre.

3.10- CONSERVACIÓN DE LOS PARÁSITOS Y OBTENCIÓN DE PREPARACIONES DURADERAS

Los parásitos reunidos en el curso de la autopsia se depositan en agua limpia o en solución fisiológica de cloruro de sódico. El agua solo esta indicada nada más para los vermes de cutícula grande y gruesa (cestodos gusanos fusiforme etc.); los vermes más pequeños y delicados se deterioran en agua, muchas veces en el curso de breve espacio de tiempo con lo que resultan inservibles para la investigación. Por esta indicado introducir estos vermes en solución fisiológica de cloruro sódico. Si el examen de los parásitos para ulteriores investigaciones. Los ejemplares limpios se sumergen en un líquido fijador (alcohol de 70% calentado, formalina al 4%, líquido fijador de Schaudinn, solución de Barbagallo, etc.)

Solo los parásitos pequeños (ooquistes de coccidios, trichomonas, trematodos de de escaso tamaño, larvas de nematodos o parte de los mismos escólex, ganchos etc.).Se presentan al examen en fresco o en vivo. De esta forma puede obtenerse cierta orientación a partir de los detalles morfológicos. En el caso de dificultar el excesivo movimiento de los parásitos su examen, pueden frenarse los desplazamientos con una

Silva-Saldaña.

solución al 1-2% de cocaína; sin embargo, solo con la muerte de los parásitos se consigue este, propósito para lo cual basta añadir una o dos gotas de solución de yodo bajo el cubre objeto. Las partes blandas de los pequeños organismos muertos se conservan transparentes durante una hora, para más tarde hacerse su imagen borrosa y confusa (4).

Los vermes se hacen transparentes con lactofenol, glicerina o ácido láctico. Esto puede llevarse a cabo de distintas formas; los vermes extraídos del agua de la solución fisiológica de cloruro sódico o del líquido fijador se depositan con unas gotas de agua sobre un portaobjeto, se levanta un extremo del cubre y se instalan allí unas gotas de lactofenol; el agua que se va evaporando se reemplaza enseguida por lactofenol.

Los vermes redondos de cuerpo fino se hacen transparente al cabo de 20-30 minutos y los más gruesos varían horas después (a veces varios días); los nematodos mantenidos en lactofenol durante tiempos más largos pueden cubrirse con glicerina-gelatina(5).

Los ejemplares fijados en el alcohol de 70% se trasladan a otro alcohol de 70% al que se haya agregado en 5- 10% de glicerina. El alcohol de esta mezcla se va evaporando poco a poco por lo que los vermes se van transparentando cada vez más que aumenta la concentración de la glicerina, sin que por ello se retraigan.

Para la conservación prolongada de distintos vermes da buenos resultados el alcohol de 70% (12).

X. MATERIAL Y MÉTODOS

1- MATERIAL UTILIZADO

1. Guantes de látex.
2. Pinsas.
3. Tijera de disección.
4. Platos petri.
5. Tubos de ensayo.
6. Pipetas.
7. Solución salina.
8. Alcohol al 70%.
9. Alcohol al 80%.
10. Alcohol al 100%.
11. Fenol cristalizado.
12. Fenol liquido.
13. Lactofenol.
14. Baño de Maria.
15. Porta objeto.
16. Cubre objeto.
17. Microscopio.
18. Medio de tincion Carmín Acético.
19. Resina sintetica.
20. Mascarilla.
21. Botas de hule.
22. Gabacha.
23. Gradilla metálica.
24. Bálsamo de Canadá.
25. Cámara de tomar fotos en microscopio.

2- Localización del Estudio y Método empleado

El lugar de recogida de los especímenes fue el municipio de Larreinaga Malpaisillo del departamento de León (6) en el centro de matanza de ovinos y caprinos Xochilt Acalt, luego de obtenerlos se procedió a trabajarlos en la Facultad de Medicina Veterinaria (laboratorio de parasitología) UNAN LEÓN. El método utilizado en este trabajo fue de tipo exploratorio.

3- Procedimiento para la Obtención de la Muestra

Los parásitos fueron encontrados en intestino grueso y abomaso de ovejas y cabras, estos parásitos se enjuagaron en solución salina y luego se pasaron en alcohol al 70%, así fueron transportados al laboratorio de la universidad donde fueron identificadas las especies con ayuda del microscopio después de su identificación se etiquetaron en

Silva-Saldaña.

tubos de ensayo señalando el nombre del parásito, especie de huésped, localización, momento y lugar de recogida, y el método de fijación empleado dando un total de muestra de 14 parásitos :10 del género Haemonchus, 2 Trichuris, 2 Oesophagostomun.

4- PREPARACIÓN SOLUCIÓN DE CARMÍN ACÉTICO COMO MEDIO DE TINCIÓN

• Reactivos

- Carmín 12.5gms.
- Acido acético glacial 12.5ml.
- Sulfato de aluminio y potasio 12.5grs.
- Timol cristales.

▪Protocolo de Preparación

1. Colocar el carmín en polvo en un mortero.
2. Agregar 200 ml de agua destilada y los 12.5 ml de ácido acético.
3. Reposar por 20 minutos.
4. Hervir durante una hora y dejar enfriar.
5. Disolver el sulfato de aluminio y potasio en 150 ml de agua destilada y agregar a la solución de carmín fría.
6. Hervir nuevamente por una hora.
7. Agregar el resto de agua.
8. Enfriar y filtrar.
9. Agregar un cristal de timol.

5- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE LACTOFENOL LÍQUIDO

ACLARADOR

Se tiene que llevar el Fenol cristalizado o sólido a Fenol líquido para poder preparar el Lactofenol.

Silva-Saldaña.

El procedimiento usado para llevarlo de sólido a líquido fue el (Baño de María), usando una temperatura de 60 grados centígrados y un tiempo de una hora, una vez obtenido el Fenol líquido se procedió a la preparación del Lactofenol (Líquido aclarador), usando la siguiente fórmula:

- Ácido láctico (sólido llevar a líquido)- 50 partes (ml).
- Fenol (líquido)- 25 partes (ml).
- Agua 25 partes (ml).

6- PROTOCOLO DE NEMATODOS, MÉTODO ESTÁNDAR

- Se toma la muestra, en este caso parásito de nematodos frescos se enjuagan con solución salina fisiológica. Después lo depositamos para fijarlos en alcohol al 70% (4 a 8 días) tibio para que fijen bien.
- Luego se introducen en lactofenol y se están viendo hasta, que decoloren y se vean transparentes de 2 a 8 días.
- Luego se pasan a , alcohol para enjuagarlos en alcohol al 70% por 3 minutos.
- Luego se tiñen con Carmín Acético 20 a 30 minutos o haemolumbre 20 a 30 minutos en caso de este colorante se tiene primero que enjuagar con destilados 30 minutos agua; para luego meter en alcohol al 70%.
- Luego de teñirlos o enjuagarlos con agua se pasan a meter en alcohol al 70% durante un día.
- Luego alcohol de 80% (24 horas)
- Luego alcohol de 90% (24 horas)

Silva-Saldaña.

- Luego alcohol al 100% o absoluto (24 horas)
- Luego se tienen que montar con Resina Sintética al 60% en xilol y meterlos en estufa 30 grados centígrados durante una semana.

7- GENERALIDADES DEL PROTOCOLO DE NEMATODOS MÉTODO MODIFICADO

1. Se tomó la muestra de parásitos de Nematodos frescos del tracto gastrointestinal de los Rumiantes, estos se enjuagan con Solución Salina Fisiológica por 30 minutos; después lo depositamos en tubos de ensayo con alcohol al 70% como medio de fijación se dejan en este alcohol por 6 días para que fijen bien.
2. Después se introducen en Lactofenol solución aclarante por 6 días.
3. Luego se retiran del líquido aclarante, y se enjuagan con alcohol al 70% por 2 minutos.
4. Se extraen del alcohol al 70% para teñirlos con el medio de tinción Carmín Acético por 15 minutos.
5. Después de teñirlos, se sumergen en alcohol al 80% por todo un día.
6. Luego, son cambiados a alcohol al 100% o alcohol absoluto por 24 hrs.
7. Se montan con Resina Sintética al 60% en Xilol, se aplica Bálsamo de Canadá en los bordes del cubre objeto como sellante y se dejan a temperatura ambiente.

8- APLICACIÓN DEL MÉTODO MODIFICADO DE TINCIÓN DE PREPARACIONES PERMANENTE DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN RUMIANTES

1. Los 14 parásitos fueron sumergidos en alcohol al 70% por 6 días para que se fijaran y estiraran bien.
2. Estuvieron después 6 días en solución de Lactofenol para que se decoloraran y se hicieran transparentes.
3. Luego se enjuagaron en alcohol al 70% por 2 minutos.
4. Después de enjuagarlos se procedió a teñirlos con el medio de tinción Carmín Acético por 15 minutos.
5. Se sumergieron en alcohol al 80% por 24 hrs.
6. Fueron sacados de alcohol al 80% y cambiados al alcohol de 100% o alcohol absoluto por 24hrs.
7. Se procedió a montar los parásitos con Resina Sintetica al 60% en Xilol y se sellaron los bordes del cubre objeto con Bálsamo de Canadá.
8. Después de montadas las láminas de parásitos se dejaron a temperatura ambiente.

XI. RESULTADOS

Las modificaciones realizadas en el Método Estándar para dar origen al Método Modificado fueron: disminución del tiempo de aclarado, y de tinción, suprimir el uso de alcoholes deshidratadores al 70% y 90% después del proceso de tinción, no se usó la estufa y se procedió a usar Bálsamo de Canadá como sellador de los bordes del cubre objeto.

1. De las 14 muestras de parásitos tomadas, 10 brindaron excelentes resultados siendo estas la del parásito *Haemonchus spp.*, 4 no dieron buenos resultados con el método modificado, 2 de ellas del género *Trichuris* y las otras 2 del parásito *Oesophagostomun*.
2. Para los parásitos del género *Haemonchus* los resultados obtenidos con el método modificado resultaron exitosos para la identificación de estructuras morfológicas internas.
3. El método modificado puesto en práctica resultó ser más efectivo para parásitos nemátodos del género *Haemonchus* que para los nemátodos del género *Oesophagostomun* y *Trichuris* con todos los cambios que en este método se efectuaron de igual forma en los tres géneros.

XII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, al poner en práctica el Método de Tinción Modificado de Preparaciones Permanentes de Nemátodos Gastrointestinales de Rumiantes, se encontró que este método es más efectivo para parásitos del género *Haemonchus* que para los del género *Trichuris* y *Oesophagostomum*; los factores determinantes de este resultado vienen dados por los diferentes cambios realizados en el método modificado en el transcurso de su desarrollo tales como: disminución en el tiempo de aclarado, cambio en el orden de los alcoholes (alcohol al 80% y 100%), deshidratadores y disminución del tiempo de tinción. No se usó alcohol al 70% como deshidratador porque ya habían estado 6 días como fijación, alcohol al 90% no se usó porque se tomó como una modificación.

Los parásitos del género *Trichuris* y *Oesophagostomum* presentan una estructura fisiológica más fuerte; éstos poseen una cutícula protectora más gruesa y más impermeable que la del género *Haemonchus* quien posee una cutícula más fina, motivo por el cual estos parásitos necesitan mayor tiempo de aclarado en Lactofenol que el *Haemonchus* (3).

De tal forma que al poseer cutícula más resistente a la solución aclaradora los parásitos *Oesophagostomum* y *Trichuris* no se hicieron lo suficientemente traslucidos como para que la absorción o fijación de la tinción fuera mejor y lograr así buen resultado en el montaje (9).

La falta de transparencia en estos parásitos y su poca fijación de colorante fueron causantes de que al hacerlos pasar por los alcoholes deshidratadores, 80% y 100% respectivamente, dieran lugar a que no fuesen capaces de retener la tinción (9).

Se optó por dejarlas a temperatura ambiente para que estas secan; porque la zona del Pacífico suele ser muy seca y poseer temperaturas que oscilan entre los 27°C a 32°C en invierno, y los 30°C a 35° C durante el verano (5) (6).

Al observar los resultados obtenidos en la investigación se concluye que el Método Modificado es igual de bueno que el Método Estándar teniendo su excepción en las diferentes especies de parásitos. (14).

Con referencia a los resultados obtenidos:

El método estándar (14) presenta, con relación a las diferentes especies de parásitos, una buena fijación de los especímenes con tiempo de aclarado de (8 días) lo cual resulta en excelentes montajes.

De lo anterior se puede concluir que el método modificado es igual de bueno que el método estándar, pues los resultados son semejantes en calidad y teniendo sus excepciones en las diferentes especies de parásitos. (8) (14).

XIII. CONCLUSIONES

- Con los presentes resultados se demuestra que el método modificado puede brindar muy buenos resultados para algunos géneros de parásitos, pero no para otros como se observó con la puesta en práctica.
- El Método Modificado resulto ser muy efectivo para los nematodos del género Haemonchus.
- El Método Modificado no da buenos resultados para parásitos nematodos pertenecientes a los géneros de Oesophagostomun y Trichuris respectivamente.
- Los parásitos de género Trichuris y Oesophagostomun nesecitaban mayor tiempo de aclarado con el Lactofenol y mayor tiempo de tincion con el Carmín Acético, así mismo el uso de alcoholes deshidratadores del 70% y 90%.

XIV. RECOMENDACIONES

- Seguir realizando investigaciones seleccionando otro género de parásito.
- Utilizar este método para lograr un mejor diagnóstico en las estructuras de nematodos gastrointestinales de los rumiantes.
- Tomar muestras de parásitos de otras especies de animales para comprobar el método.
- Dar seguimiento especial a este método que es muy importante en parasitología del cual consideramos se obtendrá mayor información y mejores resultados.
- Recomendamos que el tiempo de aclarado con Lactofenol sea mayor para parásitos del género Trichuris y Oesophagostomun para lograr mas transparencia y obtener mejores resultados.
- Se recomienda que el proceso de tinción con el medio Carmín Acético sea mayor para parásitos como Oesophagostomun y Trichuris y así lograr una mejor tinción.

XV. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Ash, L. R. & Orihel, Th.C.1987. - Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press. American Society og Clinical Pathologists, Chicago.
2. Blanco Torren y J. Galiano. 1989.- Atlas de Coprología, Digestión y Parásitos. Asoc. Española de Farmacéuticos Analistas.
3. Cordero del Campillo M. Rojo Vázquez F.A Parasitología veterinaria McGraw Hill. Interamericana.
4. Hendrix, Ch.M. 1999.- Diagnóstico Parasitológico Veterinario. Harcourt. Brace. Madrid.
5. [http: // www.INETER.gob.ni/metereologia/clima_nic/ características del clima.html](http://www.INETER.gob.ni/metereologia/clima_nic/características_del_clima.html).
6. Incer Barquero Jaime `` Geografía Dinámica de Nicaragua``.
7. Lamy L.H. Techniques de Base, Protozoaires, et helminthes parasites, recherche et identification au laboratoire. Maloine S.A. Edit.
8. Leventhal R. y R.F. Cheadle.1992.- Parasitología Médica. Interamericana MacGraw-Hill.
9. Markell, E. K. Voge, M. Y John, D. 1990.- Parasitología Médica.Interamericana .McGraww Hill.
- 10.Owen D.G. 1992.- Parasites of Laboratory Animals. Laboratory Animals Hand Books Nº 12. Laboratory nimals Ltd. by Royal Society of Medicine ServicesLimited.
- 11.Quiroz Héctor Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos Uteha Noriega Editores.
- 12.Schell, S.C. 1969.- Manual de Laboratorio en Parasitología. Edit. Academia León.
- 13.Shore García L. y Ash L.R. Diagnóstico parasitológico, manual de laboratorio clínico. Edit.

14. Vargas Angélica Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.
15. Vasallo Matilla, F. Reflexiones ante la elección de una técnica coproparasitológica. Boletín. Contr. Cal. Vol 4 (2) Pp. 46-50. Med. Panamericana.
16. Zaman, V. Atlas de Parasitología Clínica. Panamericana Editorial.

XVI. ANEXOS

Toma de muestras de parásitos de ovinos



Recolección de muestras



Preservación de parásitos
en alcohol de 70%.



Etiquetado de muestras recolectadas



Identificación de parásitos

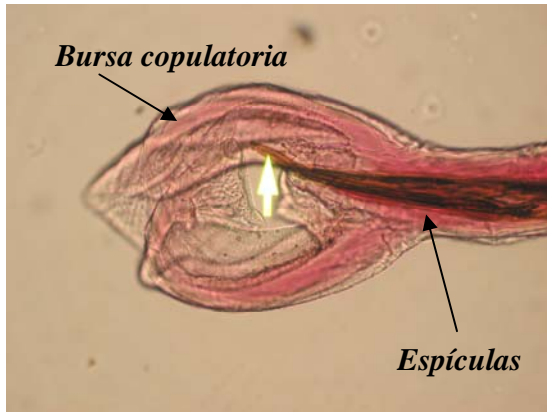
Silva-Saldaña.



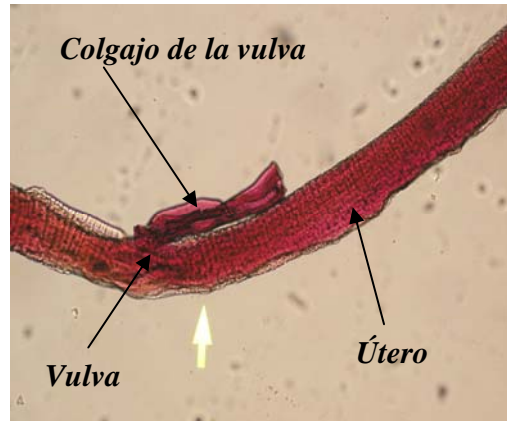
Láminas montadas.



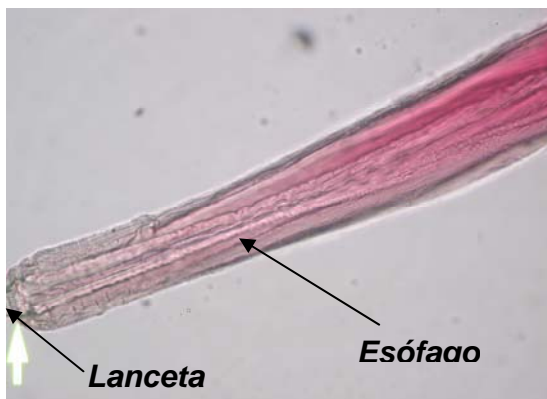
Observación de láminas.



Extremo posterior *H. Contortus* macho
Aparato reproductor.



H. Contortus hembra
Aparato reproductor.



Extremo anterior de *H. contortus*



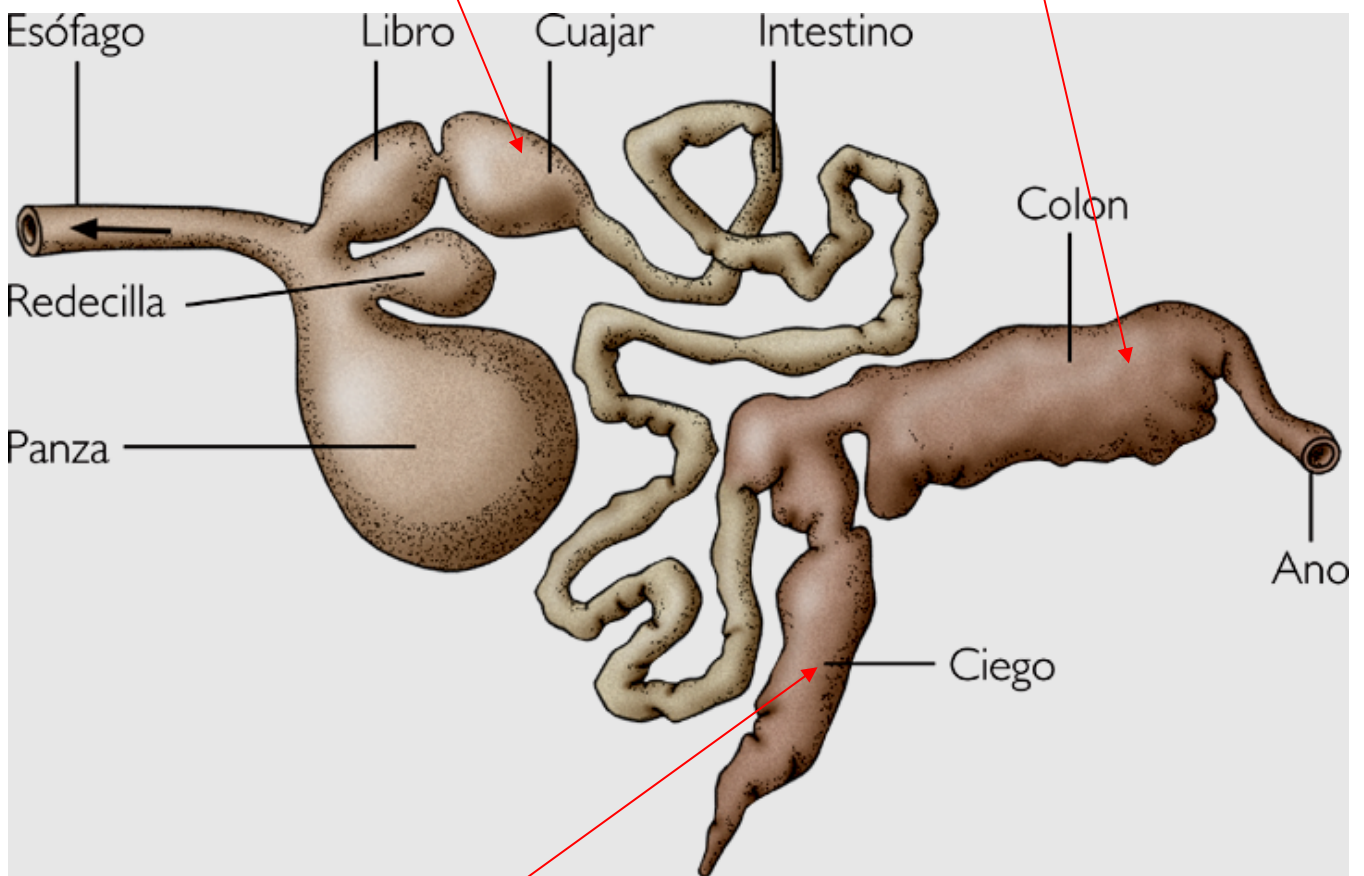
(Extremo anterior)

Silva-Saldaña.

Localización de Parásitos encontrados.

Parásitos Haemonchus

*Parásitos de Oesophagostomun
Y Trichuris*



*Parásitos de Oesophagostomun
Y Trichuris*

GLOSARIO

Bursa: pequeño saco o cavidad con forma de saco rellenos de liquido que esta situado en lugares titulares para evitar fricciones.

Calcáreo: que contiene cal; yesoso.

Carmín Acético: medio de tincion usado para teñir parásitos.

Cutícula: capa de sustancia más o menos sólida que recubre la superficie libre de una célula epitelial (medio protector).

Ecdisis: muda, recambio de las capas externas de la piel (participa exclusivamente la epidermis) bajo control endocrino. Puede ser completa o incompleta debido generalmente a una nutrición deficiente. Conocida también como exuvia (muda).

Escoplex: órgano de fijación considerado como el extremo anterior o cefálico.

Espícula: espina o cuerpo afilado con forma de aguja.

Estándar: algo que se establece como medida o modelo al que se deberían ajustar otras cosas similares.

Formol: solución de formaldehído.

Glicerina: líquido transparente, incoloro, denso utilizado como agente humectante y disolvente de fármacos.

Hipobiosis: desarrollo detenido como el de larvas de gusano en ovejas inmunes.

Lactofenol: solución aclarante de parasitos para su posterior observación o tinción.

Papila: pequeña elevación o proyección en forma de pezón.

Patente: abierto, efectivo.

Prepatente: antes de que se manifiesten, usado para referirse a la infección por virus, bacterias y especialmente parásitos helmintos.

Resina Sintetica: medio de montaje.

Timol: fenol que se obtiene del aceite de tomillo y de otros aceites volátiles.

Vermes: en el contexto de la ciencia veterinaria se refiere a helmintos endoparásitos.

Zoonosis: enfermedad de los animales transmisible al hombre.