

**INFESTACION EXPERIMENTAL CON LARVAS DE
NEOSTRONGYLUS LINEARIS (NEMATODA,
PROTOSTRONGYLIDAE) DE DIVERSAS ESPECIES
DE *CANDIDULA* Y *HELICELLA*
(MOLLUSCA, STYLOMMATOPHORA)**

Por: M.^a P. Morrondo Pelayo
M.^a Y. Manga González
M. Cordero del Campillo
P. Díez Baños

INTRODUCCION

Neostrongylus linearis (Marotel, 1913), Gebauer, 1932, nematodo productor de bronconeumonía en los ovinos, completa su ciclo externo en diversos moluscos entre los que figuran varias especies de la familia Helicidae (Pulmonata, Stylommatophora). Diversos aspectos relativos a la infestación natural y/o experimental de los moluscos hospedadores intermediarios (H.I.) han sido estudiados, entre otros, por^{1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.}

En el presente trabajo se estudia la receptividad de las *Candidula* y *Helicella* spp. existentes en la provincia de León⁶, a la infestación experimental con *N. linearis*.

MATERIALES Y METODOS

Las larvas I (L-I) de *N. linearis* se obtuvieron a partir de las heces de una oveja infestada experimentalmente por Castañón⁵.

Se probaron las siguientes especies de Helicelinae: *Candidula intersecta* (Poiret, 1801); *Candidula rocandioi* (Ortiz de Zárate, 1950); *Helicella bierzona* (Gittenberger & Manga, 1977); *Helicella corderoi* (Gittenberger & Manga, 1977); *Helicella itala* (L., 1758); *Helicella jamuzensis* (Gittenberger & Manga, 1977); *Helicella madritensis* (Rambur, 1868); *Helicella ordunensis* (Kobelt, 1882) y *Helicella zaratei* (Gittenberger & Manga, 1977).

Los moluscos utilizados fueron recogidos en uno de los lugares citados para cada especie por Manga⁶ y, aunque se procuró recolectarlos en enclaves no frecuentados

por ganado ovino, siempre se comprobó la ausencia de infestación natural, examinando un 10% de los ejemplares de cada especie.

La infestación de los moluscos, así como su posterior manejo y tratamiento, se han hecho de acuerdo con Morrondo y col.¹⁰. Se infestaron un total de 419 caracoles, distribuidos según se indica en el cuadro I.

A fin de determinar las posibles diferencias interespecíficas de las nueve especies de moluscos infestados, para los parámetros: (a) % de penetración de las L.-I. (b) grado de evolución y (c) % de L-III, definidos en un trabajo previo^{10, 11}, se realizaron análisis de varianza de una vía para $p \leq 0,001$. Seguidamente se calculó la «t de Student», siendo $p = 0,05$, para constatar si existían o no diferencias significativas entre las medias de cada especie, para cada uno de los parámetros anteriormente citados.

También se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación para conocer la relación existente entre cada uno de los parámetros estudiados.

Se empleó la prueba Ji-cuadrado ($p = 0,05$) para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas respecto al % de penetración, evolución y L-III, así como para el número de larvas por molusco, cuando en un mismo lote de caracoles se utilizaron ejemplares adultos y juveniles. Dicha prueba se empleó, igualmente, para conocer la influencia ejercida por la temperatura sobre los tres primeros parámetros antes mencionados, así como sobre el día de aparición de las primeras L-II y L-III y de aquél en que todas se hallaban en este último estadio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como se puede observar a la vista de los resultados resumidos en el cuadro I, los valores máximos y la media de larvas/molusco, oscilaron entre 4-92 y 1,7-12,8, respectivamente, correspondiendo los primeros datos a *H. bierzona* y los segundos a *H. ordunensis*.

Los períodos requeridos para la aparición de las primeras L-II y L-III en las especies probadas son, en general, superiores a los señalados por Cabaret & Dakkak², Cabaret^{3, 4}, Muller¹³ y Rojo¹⁵, quienes trabajaron con otras especies de helícidos.

Al aplicar Ji-cuadrado ($p = 0,05$) a los dos lotes de *H. madritensis* mantenidos a distinta temperatura (17° y 20° C), no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros considerados (cuadro II). Por esta razón, ambos lotes fueron reunidos en uno sólo, en posteriores tratamientos estadísticos.

A la vista de los análisis de varianza efectuados sobre el % de penetración, evolución y L-III (cuadro III), se advierte que existen diferencias interespecíficas altamente significativas entre las nueve especies de moluscos probadas.

Teniendo en cuenta la media del % de penetración de las L-I de *N. linearis* (cuadro IV), podemos establecer, en orden decreciente, como especies más adecuadas: *H. jamuzensis*, *H. bierzona*, *C. intersecta*, *H. ordunensis*, *H. madritensis*,

H. zaratei, *H. itala*, *H. corderoi* y *C. rocandioi*. Al aplicar la «t de Student» no se puede demostrar que existan diferencias significativas entre *H. jamuzensis* y *H. bierzona*; *H. bierzona* y *C. intersecta*; *H. ordunensis* y *H. zaratei*; *H. madritensis* y *H. zaratei*; *H. corderoi* y *C. rocandioi*.

En orden decreciente, las especies más adecuadas de moluscos, refiriéndose a la media del % de evolución (cuadro IV) fueron: *H. ordunensis*, *C. rocandioi*, *H. itala*, *H. zaratei*, *H. corderoi*, *H. madritensis*, *C. intersecta*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*.

Aplicando la «t de Student» no se puede demostrar que existan diferencias significativas entre *H. ordunensis* y *C. rocandioi*; *H. ordunensis* y *H. itala*; *H. ordunensis*, *H. madritensis* y *H. zaratei*; *H. ordunensis* y *H. corderoi*; *C. rocandioi* y *H. itala*, *H. zaratei*, *H. corderoi*, *H. madritensis*, *C. intersecta*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*.

De la misma forma, y continuando en el mismo cuadro, las especies más adecuadas, en cuanto a la media del % de L-III, fueron: *H. ordunensis*, *H. itala*, *H. zaratei*, *H. corderoi*, *C. intersecta*, *C. rocandioi*, *H. madritensis*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*. No obstante, no se puede afirmar que existan diferencias significativas con la aplicación de la «t de Student» entre: *H. ordunensis* y *H. madritensis*; *H. itala* y *H. zaratei*, *H. corderoi*, *C. intersecta*, *C. rocandioi*, *H. madritensis*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*.

Los tres porcentajes anteriormente considerados, varían con las distintas especies de moluscos, e incluso, dentro de la misma especie, hecho observado por Morrondo y col.¹⁰, Morrondo & Manga¹¹, y Rojo¹⁵, aunque este último autor sólo lo mencionó para el porcentaje de penetración.

Al comparar entre sí la media del % de penetración, evolución y L-III, se observa que no existe correlación entre la primera y la segunda, ni entre la primera y la tercera, pues los coeficientes de correlación son 0,4 y 0,1, respectivamente. Al hacerlo entre la media del porcentaje de evolución y la del porcentaje del L-III, el coeficiente de correlación es 0,9, lo que indica que están altamente correlacionados.

Confirmamos que la fase de invasión del pie del caracol no guarda necesariamente correlación con el destino futuro de la larva, pues son evidentes las variaciones que se producen en los tres períodos considerados^{10, 14}.

Dado que el desarrollo en el molusco no es sincrónico, no resulta extraño hallar diversas fases de evolución en un mismo período y en un mismo caracol (cuadro V), hecho ya observado por Morrondo y col.¹⁰ y por Morrondo & Manga¹¹, utilizando otros Helicidae.

Las medidas obtenidas de L-II (cuadro VI) y de L-III (Cuadro VII), extraídas de las distintas especies de moluscos, fueron muy similares entre sí, por lo que se expresan en conjunto. En general, existe coincidencia con los datos hallados por Morrondo y col.¹⁰, Moukdak¹², Müller¹³, debiendo señalar el mayor desarrollo de nuestras larvas, que el observado por Cabaret⁴ y Rojo¹⁵.

Únicamente en el caso de *H. madritensis* se utilizó un lote compuesto por ejemplares adultos y juveniles. Aplicando Ji-cuadrado ($p = 0,05$) a los datos del

cuadro VIII, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre adultos y juveniles, para los parámetros allí considerados. Este hecho no parece concordar con lo señalado por Cabaret⁴ y Rojo¹⁵ para una mezcla de *Muellerius capillaris*/*Neostromglylus linearis* y *Cochlicopa lubrica*, y para *Neostromglylus linearis* y otras especies de Helicidae, respectivamente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto parece deducirse que las especies más adecuadas, en orden decreciente, son: *H. ordunensis*, *H. itala*, *H. zaratei*, *H. corderoi*, *C. rocandioi*, *H. madritensis*, *C. intersecta*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*.

Es la primera vez que se prueba experimentalmente la receptividad a la infestación por *N. linearis* de *C. rocandioi*, *H. bierzona*, *H. corderoi*, *H. itala*, *H. madritensis* y *H. zaratei*, aunque *H. itala* y *H. madritensis* habían sido halladas albergando larvas de este parásito, en condiciones naturales por Manga & Morrondo⁸.

H. ordunensis, *H. jamuzensis* y *C. intersecta* fueron citados por primera vez como hospedadores intermediarios experimentales de *N. linearis* por Morrondo y col.⁹ y Morrondo & Manga¹¹.

RESUMEN

La infestación experimental de 419 ejemplares de 2 *Candidula* spp. y 7 *Helicella* spp. (Mollusca) con L-I de *Neostromglylus linearis* (Nematoda), obtenidas de heces ovinas, ha demostrado que hay diferencias altamente significativas entre las nueve especies de caracoles, en lo que respecta a los porcentajes de larvas que invaden el pie, evolucionan y alcanzan el estadio de L-III, así como el número de días requeridos para ello. Los métodos estadísticos utilizados fueron el análisis de la varianza (una vía), la «t de Student», el coeficiente de correlación y la Ji-cuadrado.

Las especies más receptivas, en orden decreciente, son: *H. ordunensis*, *H. itala*, *H. zaratei*, *H. corderoi*, *C. rocandioi*, *H. madritensis*, *C. intersecta*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*. Por primera vez se comprueba experimentalmente la receptividad de *C. rocandioi*, *H. bierzona*, *H. corderoi*, *H. itala*, *H. madritensis* y *H. zaratei* a *Neostromglylus linearis*.

EXPERIMENTAL INFECTION WITH *NEOSTROMGLYLUS LINEARIS* (NEMATODA, PROTOSTROMGLYLIDAE) LARVAE OF SEVERAL SPECIES OF *CANDIDULA* AND *HELICELLA* (MOLLUSCA, STYLOMMATOPHORA)

SUMMARY

419 snails of two *Candidula* and seven *Helicella* spp. were experimentally infected with L-I of the small ovine lung-worm *Neostromglylus linearis*. Statistically significant differences were observed to exist between the nine species in the percentage of

larvae invading the snail's foot, the progression in their evolution and their development to the infective stage (L-III). Variance analysis (one way), Student's «t», coefficient of correlation and χ^2 were applied.

The susceptibility of the snails, expressed in decreasing order, was as follows: *H. ordunensis*, *H. itala*, *H. zaratei*, *H. corderoi*, *C. rocandioi*, *H. madritensis*, *C. intersecta*, *H. jamuzensis* y *H. bierzona*. The experimental susceptibility of *C. rocandioi*, *H. bierzona*, *H. corderoi*, *H. itala*, *H. madritensis* y *H. zaratei* to *Neostromglylus linearis* has been demonstrated for the first time.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Fernández Revuelta por su contribución a la valoración estadística de los resultados.

A N. Díez Baños por su colaboración técnica.

BIBLIOGRAFIA

- CABARET, J. (1979).—Réceptivité expérimentale à l'infestation par les larves de Protostrongylidés de quelques Hélicides fréquents au Maroc. Facteurs de variation. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **54** (4): 475-482.
- CABARET, J. & DAKKAK, A. (1979).—Infestation expérimentale de *Cochlicella ventricosa* (Draparnaud, 1801) par les larves L₁ de Protostrongylidés. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **54** (1), 57-64.
- CABARET, J. (1980).—Motilité et infestivité des larves L₁ de Protostrongylidés: Facteurs de variation. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **55** (5): 571-581.
- CABARET, J. (1981).—Réceptivité des mollusques terrestres de la région de Rabat à l'infestation par les Protostrongyles dans les conditions expérimentales et naturelles. These présentée à l'Université Pierre et Marie Curie et au Museum National d'Histoire Naturelle (en prensa).
- CASTAÑÓN, L. (1981).—Ciclo interno de «*Neostromglylus linearis*» (Marotel, 1913); Gebauer, 1932 (Nematoda, Protostrongylinae) en la oveja. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 1-207.
- MANGA, M.^a Y. (1977).—Los Helicidae (Gastropoda, Pulmonata) de la provincia de León. Tesis doctoral. Facultad de Biología, Universidad de León. 1-365, 1-113 (dos vols.).
- MANGA, M.^a Y.; MORRONDO, M.^a P.; REGUERA, A. y CASTAÑÓN, L. (1979).—Datos sobre infestación natural de algunas *Cerutuella* y *Helicella* spp. (Mollusca, Stylommatophora) por larvas de Protostrongylinae ovinos. 2.^o Congreso Nacional de Parasitología, León, 1-4 octubre, página 106.
- MANGA, M.^a Y. y MORRONDO, M.^a P.—Notes of natural infection of some Helicidae spp (Mollusca, Stylommatophora) by Protostrongylinae sheep larvae. *Malacologia*, **22**. (En prensa).
- MORRONDO, M.^a P.; MANGA, M.^a Y.; REGUERA, A. y Díez, N. (1979).—Infestación experimental de diversos Helicidae con Protostrongylinae ovinos. 2.^o Congreso Nacional de Parasitología. León, 1-4 octubre, p. 107.
- MORRONDO, M.^a P.; CORDERO, M.; Díez, P. y MANGA, M.^a Y. (1980).—Infestación experimental de tres *Cerutuella* spp. (Mollusca, Stylommatophora) con larvas de *Muellerius capillaris* y *Neostromglylus linearis* (Nematoda, Protostrongylinae). *An. Fac. Vet. León*, **26**: 107-123.
- MORRONDO, M.^a P. & MANGA, M.^a Y.—Experimental study on the susceptibility of five Helicidae species to larvae of Protostrongylinae. *Malacologia*, **22**. (En prensa.)
- MOUKDAK, A. R. (1978).—Zur Entwicklung der kleinen Lungenwürmer des Schafes in Laboratoriumstieren, mit einem Beitrag zur Differentialdiagnose der dritten Larven. *Z. Parasitenk.*, **155**, 241-247.
- MÜLLER, F. R. (1934).—Ein Beitrag zur Entwicklung des Lungenwurmes *Neostromglylus linearis* Marotel. *Sitzungsberichte Ges. naturf. Freunde.*, 158-161.

- 14) REGUERA, A.; ROJO, F. A. y CORDERO, M. (1980).—La dosis como factor de regulación de la población parasitaria en el sistema *Neostromylus linearis/Ceratomyxa (Xeromagna) cespitum arizonis* (Nematoda, Protostrongylinae/Mollusca, Stylommatophora), *An. Fac. Vet., León*. **26**, 91-100.
- 15) ROJO, F. A. (1973).—*Bronconeumonías verminosas ovinas en León, con especial atención al ciclo biológico de "Neostromylus linearis"* (Marotel, 1913), Gebauer, 1932. *An. Fac. Vet. León*, **19**, 147-197.
- 16) ROJO, F. A. y CORDERO, M. (1974).—*Le cycle biologique de Neostromylus linearis* (Marotel, 1913), Gebauer, 1932. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **49**, 685-699.

CUADRO I

Especie de molusco	N.º ej. infest.	tª m.m. ° C	N.º L-I/molusco	Nº larvas/molusco			Día formación primeras L-II	Día formación primeras L-III	Día todas L-III
				mín.	máx.	\bar{x}			
<i>C. intersecta</i>	39	22	105	1	10	2,4	35	39	42
<i>C. rocandioi</i>	43	18	140	1	12	3,8	16	36	43
<i>H. bierzona</i>	31	22	200	1	4	1,7	30	39	41 (37% L-III)
<i>H. corderoi</i>	40	20	100	1	5	2,3	25	37	42 (75% L-III)
<i>H. itala</i>	80	20	185	1	15	4,6	14	32	39
<i>H. jamuzensis</i>	39	22	220	1	30	3,1	12	35	41 (75% L+III)
<i>H. madritensis</i>	25	17	140	1	10	2,5	17	38	41
<i>H. madritensis</i>	40	20	200	1	24	4,7	13	33	35
<i>H. ordunensis</i>	42	18	300	1	92	12,8	12	28	31
<i>H. zaratei</i>	40	20	100	1	8	3,8	16	20	31

CUADRO II

Especie de molusco	tª m.m. ° C	N.º L-I/molusco	% penetración \bar{x}	% evolución \bar{x}	% L-III \bar{x}	Día formación primeras L-II	Día formación primeras L-III	Día todas L-III
<i>H. madritensis</i>	17	140	86,0	2,1	1,5	17	38	41
<i>H. madritensis</i>	20	200	47,3	5,0	2,6	13	33	35

CUADRO III
Análisis de varianza

Fuente de Variación		S.S.	df	M.S.	F.
Tratamientos	% P.	52.174,33	8	6.521,79	25,34***
	% E.	1.823,15	8	227,89	4,65***
	% L-III	9.838,10	8	235,60	2,80***
Error	% P.	105.519,71	410	257,37	
	% E.	20.092,37	410	49,01	
	% L-III	1.885,00	95	83,70	
Total	% P.	157.694,04	418		
	% E.	21.915,52	418		
	% L-III	7.953,10	103		

P = penetración. E = evolución. *** = p ≤ 0,001

CUADRO IV

Especie de molusco	% penetración		% evolución		% L-III	
	\bar{x}	N.º observaciones	\bar{x}	N.º observaciones	\bar{x}	N.º observaciones
<i>C. intersecta</i>	68,12	39	3,38	39	4,99	8
<i>C. rocandioi</i>	41,53	43	7,09	43	2,23	8
<i>H. bierzona</i>	70,56	31	1,27	31	0,63	3
<i>H. corderoi</i>	41,60	40	6,25	40	5,11	6
<i>H. itala</i>	50,47	80	6,52	80	7,77	25
<i>H. jamuzensis</i>	76,00	39	2,00	39	0,80	10
<i>H. madritensis</i>	62,16	65	3,93	65	2,18	19
<i>H. ordunensis</i>	65,03	42	8,06	42	15,11	12
<i>H. zaratei</i>	61,63	40	6,44	40	6,99	17

CUADRO V

Días sacrificio p.i.	6-9	10-13	14-17	18-21	22-25	26-29	30-33	34-37	38-41	42-45
% de larvas	L-I	L-I	L-I	L-I	L-I	L-I	L-I	L-I	L-I	L-I
1	100	100	100	100	100	100	100	40	60	6
2	100	100	47	53	10	90	100	100	93	7
3	100	100	100	100	100	100	50	50	100	63
4	100	100	100	100	43	57	100	100	93	7
5	100	100	50	50	100	100	100	82	45	55
6	100	50	50	100	100	100	100	100	56	44
7	100	100	67	33	100	100	100	100	80	20
8	100	90	10	4	96	100	100	89	22	78
9	100	75	25	100	100	39	61	4	96	100
10	100	100	82	18	81	19	78	22	73	27

1. *C. intersecta*; 2. *C. rocardoi*; 3. *H. bierzona*; 4. *H. corderoi*; 5. *H. itala*; 6. *H. jamuzensis*; 7. *H. madriensis* (infestada a 17°C); 8. *H. madriensis* (infestada a 20°C); 9. *H. ordunensis*; 10. *H. zaratei*.

CUADRO VI
Medidas absolutas y relativas de 23 larvas II de "Neostrogylus linearis"

	Mínimo	Máximo	\bar{x}	ROJO (1973)	MORRONDO (1980) \bar{x}
Longitud total con la vaina.	445,7	522,8	477,8	360-380	496,6
Longitud total de la larva.	352,9	502,8	403,8	320	397,7
Longitud total del esófago.	148,6	158,6	155,8	140	151,6
Distancia anillo nervioso/ extremo anterior.	62,8	90,2	77,9	80	68,6
Distancia poro excretor/ extremo anterior.	65,9	110,0	85,7	90-100	76,7
Distancia ano/ extremo posterior.	17,1	23,7	21,8	20	20,2
Distancia primordio genital- extremo posterior.	151,4	197,1	168,5	100	164,0
Longitud total/longitud esófago.	2,7	3,3	2,9		3,0
Longitud total/anillo-extremo anterior.	5,5	6,8	6,2		6,2
Longitud total/poro-extremo anterior.	4,3	6,8	5,3		5,6
Longitud total/ano-extremo posterior.	16,3	22,0	20,0		20,6
Longitud total/primordio- extremo posterior.	2,7	3,0	2,8		3,2

CUADRO VII
Medidas absolutas y relativas de 25 larvas III de "Neostrogylus linearis"

	mínimo	máximo	\bar{x}	MULLER (1934)	ROJO (1973)	EL-MOUKDAK (1978)	MORRONDO (1980) \bar{x}	(1981)
Longitud total con las vainas.	485,7	600,0	510,1		540-552	488-634	585,8	
Longitud total de la larva.	445,7	585,7	506,6	500-555	500		544,1	500
Longitud del esófago.	117,1	197,1	165,3	200	100	120-184	172,4	
Distancia anillo nervioso- extremo anterior.	62,8	105,7	87,3		70		81,1	
Distancia poro excretor- extremo anterior vaina.	94,3	118,6	104,5		90-100		100,1	
Distancia poro excretor- extremo anterior.	80,0	111,4	92,1		80	90-120	92,5	
Distancia ano-extremo posterior.	22,8	34,3	29,2	35	20-30	20-30	28,1	<30
Distancia primordio genital-extremo posterior.	168,6	225,7	198,6		190		205,6	
Longitud total/longitud esófago.	3,4	5,3	4,2				4,7	
Longitud total/anillo- extremo anterior.	5,9	7,5	6,5				6,9	
Longitud total/poro- extremo anterior.	5,0	6,5	5,7				6,0	
Longitud total/ano- extremo posterior.	19,4	24,8	21,5				22,0	
Longitud total/ primordio-extremo posterior.	2,5	3,5	2,7				2,7	

CUADRO VIII

Especie de molusco	N.º ejemplares infestados	% penetración \bar{x}	% evolución \bar{x}	% L ^{III} \bar{x}	N.º larvas/molusco		
					min.	máx.	\bar{x}
<i>H. madritensis</i>	24 (A.)	49,8	4,3	2,7	1	20	4,3
<i>H. madritensis</i>	16 (J.)	43,4	6,1	2,6	1	24	5,2

(A.) = adultos
(J.) = juveniles

**SUPERVIVENCIA DE LAS LARVAS I DE
NEOSTRONGYLUS LINEARIS (NEMATODA,
PROTOSTRONGYLIDAE) EN CONDICIONES
CONTROLADAS DE HUMEDAD Y TEMPERATURA**

Por: A. Reguera Feo
M. Cordero del Campillo
F. A. Rojo Vázquez

INTRODUCCION

Los estudios sobre la resistencia de las larvas I (L-I) de los Protostrongylidae, en diversas condiciones ambientales, se iniciaron tempranamente (Davtyan² y Pavlov¹¹, ambos en 1937).

La mayoría de las veces, los datos aportados son meras observaciones colaterales, en el marco de trabajos orientados fundamentalmente al estudio del ciclo vital^{1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 14}, aunque también se han llevado a cabo estudios encaminados a determinar la supervivencia larvaria ante factores ambientales diversos^{4, 5, 12, 13}.

Sin embargo, no conocemos ningún trabajo dedicado a investigar la supervivencia de las L-I de *Neostrongylus linearis*.

MATERIALES Y METODOS

Se preparó una serie de coprocultivos a partir de heces frescas, sin tratar de ningún modo, obtenidas de una oveja con infestación pura de *Neostrongylus linearis*, mantenida en el Departamento en condiciones que garantizaban su aislamiento y la imposibilidad de infestaciones por Protostrongylidae. El animal se mantenía en una jaula metabólica y la retirada de heces se hacía cada ocho-doce horas.

Inicialmente se tomaban 100 g. de heces para cada coprocultivo, de los cuales se colocaban en dispositivos Baermann-Wetzel 10 g. Transcurridas dieciocho horas se recogían del fondo 10 ml. y se centrifugaban a 2.000 rpm., durante cuatro minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se volvían a suspender los 1-2 ml. de fondo hasta un volumen de 10 ml. con agua corriente, a fin de realizar el recuento en cámara McMaster.