

First report of *Nematodirus filicollis* natural infection in a sheep from the Mexican sub-humid tropics

Primer reporte de infección natural de *Nematodirus filicollis* en un ovino del trópico sub-húmedo mexicano

Roger Rodríguez-Vivas^{1*} Ph.D, Luis Pérez-Cogollo¹ Ph.D, Iris Trinidad-Martínez¹ QFB, Melina Ojeda-Chi¹ M.Sc, Miguel González-Santana¹ MVZ.

¹Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Km. 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, CP 97100. Mérida, Yucatán, México.

*Correspondencia: rvivas@correo.uady.mx

Received: December 2016; Accepted: May 2017.

RESUMEN

Objetivo. El presente estudio tiene por objetivo reportar por primera vez el caso de un ovino que adquirió la infección natural con *Nematodirus filicollis* en condiciones de clima tropical sub-húmedo. **Materiales y métodos.** Se tomó una muestra de heces que fue procesada para identificar y cuantificar la excreción de huevos de nematodos por gramo de heces (h/gh) mediante las pruebas de Flotación Centrifugada y McMaster. Asimismo, se realizó un cultivo de larvas mediante la prueba de Corticelli-Lai. **Resultados.** El ovino presentó una nematodiasis mixta por *Trichuris* spp. (100 h/gh), *Nematodirus* spp. (100 h/gh) y otros nematodos del orden strongylida (1500 h/gh). El tamaño de los huevos del *Nematodirus* fue de $202 \pm 3 \mu$ de largo y $97 \pm 2 \mu$ de ancho. En el cultivo de larvas se identificaron los géneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* y *Nematodirus*. La longitud promedio de las larvas de *Nematodirus* fue de $955 \pm 8.0 \mu$ y ancho de $28 \pm 0.5 \mu$, mientras que la longitud promedio de la cola de la vaina fue de $233.4 \pm 41.6 \mu$. **Conclusiones.** Con base en las dimensiones de las larvas y sus características morfológicas se reporta que la infección del ovino fue por *Nematodirus filicollis*. Se concluye que *N. filicollis* es capaz de sobrevivir en las condiciones del clima tropical sub-húmedo en México y se reporta por primera vez el caso de un ovino que adquirió la infección natural con este nematodo.

Palabras clave: borrega, heces, larva, strongylida (Fuente: CAB, MeSH).

ABSTRACT

Objective. The aim of the present study is to report for the first time the natural infection of a sheep with *Nematodirus filicollis* in the sub-humid tropics of Mexico. **Materials and methods.** Faecal samples were processed to identify and quantify faecal nematode eggs per gram of feces (EPG) using the flotation and modified McMaster techniques. Also, faecal cultures were made using the Corticelli-Lai technique. **Results.** The ewe showed a mixed infection with *Trichuris* spp. (100 EPG), *Nematodirus* (100 EPG) and other strongylida nematodes (1500 EPG). The egg size of *Nematodirus* spp. was $202 \pm 3 \mu$ long and $97 \pm 2 \mu$ wide. Larvae of *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* and *Nematodirus* genera were identified from de faecal cultures. *Nematodirus* larvae averaged $955 \pm 8.0 \mu$ long and $28 \pm 0.5 \mu$ wide. Whereas, the average length of the sheath tail was $233.4 \pm 41.6 \mu$. **Conclusions.** According to the morphological traits of eggs and larvae, it is concluded that the infection of the sheep corresponded to *Nematodirus filicollis*. It is concluded that *N. filicollis* is able to survive in the sub-humid tropics of Mexico and for the first time an acquired natural infection of this nematode in a sheep is reported.

Keywords: ewe, feces, larva, strongylida (Source: CAB, MeSH).

INTRODUCTION

The genus *Nematodirus* Ransom, 1907 corresponds to nematodes of the small intestine of ruminants that have a direct life cycle and are members of the subfamily Nematodirinae (Nematoda: Trichostrongyloidea). The genus *Nematodirus* is composed of more than 45 species and many are distributed in ruminants mainly from the United Kingdom, Norway, New Zealand, Canada and the United States of America (1, 2).

In the United Kingdom, *N. battus* produces the death of thousands of lambs annually. In sheep herds, morbidity and mortality can reach 50-100% and 5-20%, respectively, with an impact on the welfare and economy of the farms (3).

In a phylogenetic study conducted by Hoberg (4) he showed that the Nematodirinae subfamily originated in the Holarctic with primary distributions determined through the Beringia. The stages of development of free life have adapted to extreme weather conditions, being relatively resistant to low temperatures and drying (4).

The genus *Nematodirus* (eg, *N. battus*, *N. filicollis*) has been mainly restricted to temperate regions of the northern hemisphere (3,5). In order for the third stage larvae (L₃) to emerge, the embryoned egg must be exposed to low temperatures (close to 0 ° C) for a prolonged period, followed by an increase in temperature above 10°C (6). However, *N. battus* has been reported in Sicilia, Italy (7), under conditions where the minimum temperature in winter sporadically reaches <11°C in this Mediterranean island. This adaptation to various temperate climates serves to concentrate the infecting larvae in the spring when there are susceptible lambs, limiting the reproduction of this nematode to one generation per year (8).

In Mexico, the genus *Nematodirus* has only been reported in sheep from regions with subtropical and temperate climates (9-11), where climatic conditions are favorable for the development of infective larvae and allows for the infection of vulnerable sheep. So far the genus *Nematodirus* has not been reported as a natural parasite of sheep in tropical climates in Mexico, for this reason this study reports for the first time, the case of a sheep that acquired the natural infection with *Nematodirus* spp. in sub-humid tropical climate conditions.

INTRODUCCIÓN

El género *Nematodirus* Ransom, 1907 corresponde a nematodos del intestino delgado de los rumiantes que tienen un ciclo de vida directo y es miembro de la subfamilia Nematodirinae (Nematoda: Trichostrongyloidea). El género *Nematodirus* está compuesto por más de 45 especies y muchas se encuentran distribuidas en rumiantes principalmente del Reino Unido, Noruega, Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos de América (1, 2).

En el Reino Unido, *N. battus* produce la muerte de miles de corderos anualmente. En rebaños ovinos la morbilidad y mortalidad puede alcanzar 50-100% y 5-20%, respectivamente con un impacto en el bienestar y economía de las granjas (3).

En un estudio filogenético realizado por Hoberg (4) demostró que la subfamilia Nematodirinae se originó del Holártico con distribuciones primarias determinadas a través del Beringia. Las fases de desarrollo de vida libre se han adaptado a condiciones climáticas extremas, siendo relativamente resistentes a bajas temperaturas y a la desecación (4).

El género *Nematodirus* (ejemplo, *N. battus*, *N. filicollis*) ha sido principalmente restringido en regiones con clima templado del hemisferio norte (3,5). Para que la larva de tercer estado (L₃) emerja se requiere que el huevo embrionado sea expuesto a bajas temperaturas (cerca de 0°C) por un periodo prolongado, seguido del aumento de la temperatura superior a los 10°C (6). Sin embargo, *N. battus* ha sido reportado en Sicilia, Italia (7), en condiciones donde la temperatura mínima en invierno esporádicamente alcanza <11°C en esta isla Mediterránea. Esta adaptación a diversos climas templados sirve para concentrar las larvas infectantes en la primavera cuando existe corderos susceptibles, limitando la reproducción de este nematodo a una generación por año (8).

En México el género *Nematodirus* sólo ha sido reportado en ovinos de regiones con climas subtropical y templado (9-11), donde las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de las larvas infectantes y permite la infección de ovinos susceptibles. Hasta el momento el género *Nematodirus* no ha sido reportado como parásito natural de ovinos en climas tropicales de México, por tal motivo el presente estudio reporta por primera vez el caso de un ovino que adquirió la infección natural con *Nematodirus* spp. en condiciones de clima tropical sub-húmedo.

MATERIALS AND METHODS

Design. The report corresponds to a case study, with epidemiological circumstantial evidence related to its occurrence. In the Veterinary Parasitology laboratory of the Campus of Biological and Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma de Yucatán (CCBA-UADY), the feces of a 24-month-old female sheep of the Katahdin breed were registered for the diagnosis of gastrointestinal parasites. The sample came from a sheep farm located in the municipality of Mérida in the state of Yucatán, Mexico. In the coproparasitoscopic examination the presence of eggs of *Nematodirus* spp. (Figure 1) was observed. Given this finding, we proceeded to visit the farm to carry out an epidemiological study and to obtain the possible origin of this nematode.

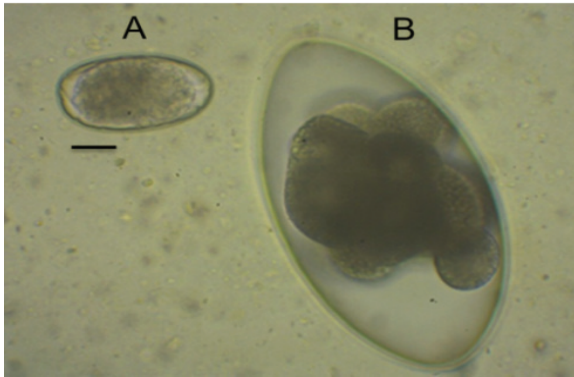


Figure 1. Nematode egg of the order strongylida (A) and egg of *Nematodirus* spp. diagnosed by the centrifuged flotation test in a sheep born in the sub-humid tropics of Mexico (the bar corresponds to 10 μ in length).

Study site. In the clinical history of the case the sheep was found to be born on a farm located in the municipality of Mérida in the state of Yucatan, Mexico. The state of Yucatán is located at a latitude of 19°31' - 21°38' N and a longitude of 87°22' - 90°25' W; It presents a sub-humid tropical climate with rains in summer. The maximum ambient temperature varies from 35 to 40°C and the minimum from 10 to 16°C, with an average room temperature of 27°C. Relative humidity varies from 65 to 90%, with an average of 80% and annual rainfall of 1,000 mm. Two annual seasons are present: rainy (from June to November) and dry season (from December to May) (12). The geomorphology belongs to the young carsotectonic system, classified as a geomorphological landscape of undulating structural plains with dissolution and denudation. Soils are mainly lithosol, rendzin and cambisol (13).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño. El reporte corresponde a un estudio de caso, con obtención de evidencia epidemiológica circunstancial relacionada con esta ocurrencia. En el laboratorio de Parasitología Veterinaria del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (CCBA-UADY) se recibió las heces de un ovino hembra de 24 meses de edad de la raza Katahdin de registro para el diagnóstico de parásitos gastrointestinales. La muestra provino de una granja ovina ubicada en el municipio de Mérida en el estado de Yucatán, México. En el examen coproparasitoscópico se observó la presencia de huevos de *Nematodirus* spp. (Figura 1). Ante este hallazgo se procedió a visitar la granja para realizar un estudio epidemiológico y conocer el posible origen de este nematodo.

Sitio de estudio. En la historia clínica del caso se constató que el ovino nació en una granja ubicada en el municipio de Mérida en el estado de Yucatán, México. El estado de Yucatán se ubica a una latitud de 19° 31' - 21° 38' N y una longitud de 87° 22' - 90° 25' O; presenta un clima tropical sub-húmedo con lluvias en verano. La temperatura ambiente máxima varía de 35 a 40°C y la mínima de 10 a 16°C, con temperatura ambiente promedio de 27°C. La humedad relativa varía de 65 a 90%, con promedio de 80% y precipitación pluvial anual de 1,000 mm. Se presentan dos estaciones anuales: lluvia (de junio a noviembre) y seca (de diciembre a mayo) (12). La geomorfología pertenece al sistema carsotectónico joven, clasificado como un paisaje geomorfológico de planicie estructural ondulada con disolución y denudación. Los suelos son principalmente de tipo litosol, rendzina y cambisol (13).

Rebaño de la granja y ovino estudiado. La granja cuenta con un total de 476 ovinos, de los cuales 290 conforman el pie de cría. Como parte del mejoramiento genético en noviembre de 2015, tres ovinos de la raza Katahdin procedentes del municipio de Córdoba, Veracruz, México fueron introducidos a la granja. Este municipio se encuentra ubicado en el estado de Veracruz, México en la orilla de la cordillera montañosa de la Sierra Madre Oriental y en la parte sur de la región montañosa del estado de Veracruz. El clima de la región es templado-húmedo con lluvias en verano, temperatura promedio de 18°C (6-35°C), precipitación pluvial anual de 1800 mm, con frío moderado en invierno.

Manejo del rebaño. Todos los ovinos de la granja son mantenidos en confinamiento y reciben alimento en corrales de tierra. Los

Flock and sheep studied. The farm has a total of 476 sheep, out of which 290 make up the breeding stock. As part of the genetic improvement program in November 2015, three sheep of the Katahdin breed from the municipality of Córdoba, Veracruz, Mexico were introduced into the farm. This municipality is located in the state of Veracruz, Mexico on the shore of the mountainous mountain range of the Sierra Madre Oriental and in the southern part of the mountainous region of the state of Veracruz. The climate of the region is temperate-humid with rains in the summer, average temperature of 18°C (6-35°C), annual rainfall of 1800 mm, with moderate cold in winter.

Herd management. All the sheep in the farm are kept in confinement and receive food in earthen pens. Juvenile animals are raised in high cages with a slat floor. The feeding consists in the administration of foliage of grasses (*Pennisetum purpureum*, *Penissetum violaceum*) and arboreal (*Brosimum allicastrum*, *Guazuma ulmifolia* and *Leucaena leucocephala*) grown in the same farm. The grass is fertilized with feces from the sheep in the farm. Additionally, sheep receive fresh water *ad libitum* and food supplements throughout the year. The sheep in the entire farm are dewormed with 1% ivermectin (0.2 mg/kg BW subcutaneously) and albendazole (4 mg/kg BW orally) every 3 months.

Clinical examination of sheep and herd. The physical examination of the sheep was performed (Figure 2) and pale mucous membranes (FAMACHA® of 3, score of 1-4), body condition of 3 (score 1-5) and diarrhea were found. The ovine positive to *Nematodirus* spp. was sampled again to confirm the infection along with 12 animals that remained in the same pen for the previous three months. Additionally, the three sheep from



Figure 2. Female sheep positive for *Nematodirus* spp. in the sub-humid tropics of Mexico.

animales juveniles son criados en jaulas elevadas con piso tipo "slat". La alimentación consiste en la administración de follaje de gramíneas (*Pennisetum purpureum*, *Penissetum violaceum*) y arbóreas (*Brosimum allicastrum*, *Guazuma ulmifolia* y *Leucaena leucocephala*) cultivadas en la misma granja. Las gramíneas son fertilizadas con heces de los propios ovinos de la granja. Adicionalmente los ovinos reciben agua fresca *ad libitum* y suplemento alimenticio durante todo al año. Los ovinos de toda la granja son desparasitados con ivermectina al 1% (0.2 mg/kg de PV vía subcutánea) y albendazol (4 mg/kg de PV vía oral) cada 3 meses.

Examen clínico del ovino y el rebaño. Se realizó el examen físico del ovino (Figura 2) y se encontró que presentaba mucosas pálidas (FAMACHA® de 3, escala de 1-4), con condición corporal de 3 (escala 1-5) y con diarrea. El ovino positivo a *Nematodirus* spp. fue nuevamente muestreado para constatar la infección junto con 12 animales que permanecieron en el corral los últimos tres meses. Adicionalmente los tres ovinos procedentes del municipio de Córdoba, Veracruz e introducidos en 2015 (sospechosos de introducir al predio el género del nematodo) en la granja, fueron muestreados con la intención de realizarles pruebas coproparasitoscópicas.

Estudio microscópico de heces. Del ovino positivo para *Nematodirus* spp. se obtuvo una muestra de 10 g heces directamente del recto mediante el uso de una bolsa limpia de polietileno, la cual fue conservada en condiciones de refrigeración (4°C) en nevera y transportada al laboratorio de Parasitología Veterinaria del CCBA-UADY para su estudio. La muestra fue sometida a las pruebas de Flotación Centrifugada y McMaster (14) para la identificación de huevos de helmintos y cuantificación de la eliminación de huevos por gramo de heces (h/gh). Cincuenta huevos del género *Nematodirus* fueron medidos con ayuda de un micrómetro adaptado a un microscopio óptico (40 x). Dos porciones de la muestra (3 g/ cada uno) fueron usadas para realizar dos cultivos de larvas mediante el método de Corticelli-Lai (14), la primera porción inmediatamente a la toma fue usada para realizar el cultivo de larvas y la segunda fue conservada durante 21 días en condiciones de refrigeración (1-2°C) para posteriormente realizar el cultivo de larvas en una incubadora a 28°C. Las cosechas de larvas L₃ de ambos cultivos se realizaron a los 21 días. La clasificación de las larvas L₃ se determinó mediante su morfología y tamaño (8). Para poder identificar la especie del género *Nematodirus* 100 larvas L₃ fueron medidas (ancho, largo total y largo de la cola) con ayuda de un micrómetro adaptado a un microscopio óptico (10 x).

the municipality of Córdoba, Veracruz introduced in 2015 (suspected of introducing the nematode genus to the farm) were sampled with the intention of performing coproparasitoscopic tests.

Microscopic feces study. Of the positive sheep for *Nematodirus* spp. a 10 g stool sample was obtained directly from the rectum by using a clean polyethylene bag, which was stored under refrigerated conditions (4°C) in a refrigerator and transported to the Veterinary Parasitology laboratory of the CCBA-UADY for study. The sample was subjected to the Centrifuged Flotation and McMaster tests (14) for identification of helminth eggs and quantification of the elimination of eggs per gram of feces (EPG). Fifty eggs of the genus *Nematodirus* were measured with the aid of a micrometer adapted to an optical microscope (40 x). Two portions of the sample (3 g/each) were used to perform two larval cultures using the Corticelli-Lai method (14), the first portion immediately after harvesting was used to perform larval culture and the second was preserved for 21 days under refrigerated conditions (1-2°C) to later perform the culture of larvae in an incubator at 28°C. The larval L₃ harvests of both cultures were carried out after 21 days. The classification of larvae L₃ was determined by their morphology and size (8). In order to identify the species of the genus *Nematodirus* 100 larvae L₃ were measured (width, total length and length of the tail) with a micrometer adapted to an optical microscope (10 x).

Database of the Veterinary Parasitology Laboratory of the CCBA-UADY. To know the existence of cases of *Nematodirus* spp. in ovines from the state of Yucatan, Mexico, the files of the Veterinary Parasitology Laboratory of the CCBA-UADY were reviewed from January 2008 to September 2016. Additional information was also obtained on positive cases such as the origin of the animals and the elimination of eggs per gram of feces.

RESULTS

Table 1 shows the sheep diagnosed with *Nematodirus* spp. at the laboratory of Veterinary Parasitology of the CCBA-UADY through centrifuged flotation and McMaster tests, from a total of 1272 sheep studied from January 2008 to September 2016. All positive animals came from areas of temperate climates that were introduced in flocks to the state of Yucatan. Only the sheep reported in the present case was born in the state of Yucatan and at the time of taking the fecal sample, it eliminated 100 EPG of *Nematodirus* spp.

Base de datos del laboratorio de Parasitología Veterinaria del CCBA-UADY. Para conocer la existencia de casos de *Nematodirus* spp. en ovinos del estado de Yucatán, México, se revisaron los archivos del laboratorio de Parasitología Veterinaria del CCBA-UADY de enero de 2008 a septiembre de 2016. Asimismo se obtuvo información adicional de los casos positivos tales como la procedencia de los animales y la eliminación de huevos por gramo de heces.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta los ovinos diagnosticados con *Nematodirus* spp. en el laboratorio de Parasitología Veterinaria del CCBA-UADY mediante las pruebas de Flotación centrifugada y McMaster de un total de 1272 ovinos estudiados de enero de 2008 al septiembre de 2016. Se observa que todos los animales positivos procedían de áreas de climas templados que fueron introducidos en rebaños al estado de Yucatán. Sólo el ovino que se reporta en el presente caso nació en el estado de Yucatán y al momento de la toma de la muestra fecal eliminó 100 h/gh de *Nematodirus* spp.

Todos los huevos de *Nematodirus* spp. observados en las heces del ovino presentaron cubierta delgada, sin color y extremos cónicos (Figura 3). El tamaño de los huevos fue de $202 \pm 3 \mu$ de largo y $97 \pm 2 \mu$ de ancho. El hecho que los huevos sean incoloros, su morfología con extremos cónico y tamaño se descartó la presencia de *Nematodirus battus* como especie infectante.

Los 12 ovinos que permanecieron en el corral con el ovino positivo para *Nematodirus* spp. y los tres ovinos procedentes del municipio de Córdoba, Veracruz no eliminaron huevos de *Nematodirus* spp.

Tanto el cultivo realizado sin el previo enfriamiento así como el que se realizó con una semana de enfriamiento permitieron la recuperación de larvas de *Nematodirus* spp. Los géneros de nematodos identificados en los cultivos de larvas sin el previo enfriamiento de la heces correspondieron a *Haemonchus* (58.1%), *Trichostrongylus* (32.5%), *Oesophagostomum* (5.8%) y *Nematodirus* (3.4%). Asimismo, los géneros de nematodos identificados en los cultivos de larvas con el previo enfriamiento de la heces correspondieron a *Haemonchus* (59.0%) *Nematodirus* (24.4%), *Trichostrongylus* (15.1%) y *Oesophagostomum* (1.6%).

Table 1. Cases positive for *Nematodirus* spp. in sheep diagnosed by Centrifugal Flotation and McMaster tests in the Veterinary Parasitology Laboratory of the Campus of Biological and Agricultural Sciences of the Universidad Autónoma de Yucatán.

Location of the land in Yucatán	Year	Location of provenance	Climate	<i>Nematodirus</i> spp. (EPG)	Strongylida** (EPG)	<i>Trichuris</i> spp. (EPG)
Samahil	2008	Tlaxcala	Temperate	50	150	0
Samahil	2008	Tlaxcala	Temperate	50	0	50
Samahil	2008	Tlaxcala	Temperate	150	0	50
Samahil	2008	Tlaxcala	Temperate	50	100	0
Mérida	2008	Estado de México	Temperate	50	750	0
Chocholá	2009	Estado de México	Temperate	50	1400	0
Chocholá	2009	Estado de México	Temperate	50	0	50
Tixpehual	2010	Tlaxcala	Temperate	50	0	0
Mérida	2015	Tlaxcala	Temperate	500	150	0
Mérida*	2016	Yucatán	Tropical	100	1500	100

*Reported case, **order strongylida, EPG: eggs per gram of feces

All eggs of *Nematodirus* observed in the ovine feces presented thin cover, without color and conical ends (Figure 3). The size of the eggs was $202 \pm 3 \mu$ long and $97 \pm 2 \mu$ wide. The fact that the eggs are colorless, their morphology with conical ends and size ruled out the presence of *Nematodirus battus* as an infecting species.

The 12 sheep that remained in the pen with the positive ovine for *Nematodirus* spp. and the three sheep from the municipality of Córdoba, Veracruz did not eliminate eggs of *Nematodirus* spp.

Both the culture carried out without the previous cooling as well as the one that was carried out with one week cooling allowed the recovery of larvae of *Nematodirus* spp. The genera of nematodes identified in the larval cultures without the previous cooling of the faeces corresponded to *Haemonchus* (58.1%), *Trichostrongylus* (32.5%), *Oesophagostomum* (5.8%) and *Nematodirus* (3.4%). Likewise, the genera of nematodes identified in the larval cultures with the previous cooling of faeces corresponded to *Haemonchus* (59.0%) *Nematodirus* (24.4%), *Trichostrongylus* (15.1%) and *Oesophagostomum* (1.6%).

The larvae of *Nematodirus* spp. found in the sheep agree with the descriptions of other



Figure 3. a. Larva of *Nematodirus* spp. recovered from the Corticelli-Lai larvae culture of a sheep born in the sub-humid tropics of Mexico (bar corresponds to 100 μ in length). b. End of larva tail unsheathed from *Nematodirus filicollis*.

authors because they are easily recognizable due to their large size and length and the filamentous shape at the ends of the sheath tail. The average size of the larvae of the *Nematodirus* genus identified in the sheep was $955 \pm 8.0 \mu$ in length and $28 \pm 0.5 \mu$ in width. While the average length of the sheath tail was $233.4 \pm 41.6 \mu$. The anterior tip of the larvae is rounded, with an oral cavity in the form of a straight tube and a filariform esophagus. There are eight large intestinal cells, well delimited with their respective nucleus. In the hind limb, the tail of the larvae have a fish tail shape that characterizes *N. filicollis*.

DISCUSSION

Several authors mention that for a natural infection of the *Nematodirus* genus to exist in sheep, most species require eggs to be exposed for prolonged periods at low temperatures (close to 0°C), followed by an increase in temperature higher than 10°C (6). However, Torina et al (7) report the natural infection of sheep with *N. battus* in Sicilia, Italy, where the minimum temperature in winter sporadically reaches $<11^{\circ}\text{C}$. This last situation could have occurred in the farm studied since the natural infection occurred in a sub-humid tropical climate where temperatures of less than 10°C can only be recorded in January and February (12). In an experiment conducted by Van Dijk and Morgan (15), they compared the hatching requirements between *N. battus* isolates from Scotland and southwestern England and found that not all larval eggs require cold stimulation to produce infective stages. Likewise, Van Dijk and Morgan (3) mention that prolonged periods of high temperatures ($25\text{-}30^{\circ}\text{C}$) do not necessarily affect the survival of *N. battus* eggs. It would be expected that high temperatures increase the mortality rates of infective larvae, but management practices such as the increase in animal load favors the infection of sheep with this nematode and allows its survival in extreme climates (3, 16).

Obtaining larvae L_3 of *N. filicollis* from laboratory cultures with and without previous cooling of the feces, allows us to suppose that this genus does not necessarily require a cooling period and therefore can survive in the environmental conditions of the sub-humid tropic. Likewise, the establishment of the genus *Nematodirus* in other regions that are not temperate such as in Sicily, Italy (7), Hueytamalco, Puebla, Mexico (10) and in the present study demonstrates the geographical expansion of this nematode to places outside

Las larvas de *Nematodirus* encontradas en el ovino concuerdan con las descripciones de otros autores por ser fácilmente reconocibles debido a su gran tamaño y longitud y la forma filamentosa como termina la cola de la vaina. El tamaño promedio de las larvas del género *Nematodirus* identificadas en el ovino fue de $955 \pm 8.0 \mu$ de longitud y $28 \pm 0.5 \mu$ de ancho. Mientras que la longitud promedio de la cola de la vaina fue de $233.4 \pm 41.6 \mu$. La extremidad anterior de las larvas es redondeada, con cavidad bucal en forma de tubo recto y esófago filariforme. Se observan ocho células intestinales grandes, bien delimitadas con su respectivo núcleo. En la extremidad posterior, la cola propiamente dicha de la larva tienen forma de cola de pescado que caracteriza a *N. filicollis*.

DISCUSIÓN

Diversos autores mencionan que para que exista una infección natural del género *Nematodirus* en ovinos, la mayoría de las especies requieren que los huevos sean expuestos por periodos prolongados a temperaturas bajas (cerca de 0°C), seguido del aumento de la temperatura superior a los 10°C (6). Sin embargo, Torina et al (7) reportan la infección natural de ovinos con *N. battus* en Sicilia, Italia, donde la temperatura mínima en invierno esporádicamente alcanza $<11^{\circ}\text{C}$. Esta última situación pudo presentarse en la granja estudiada ya que la infección natural se dio en un clima tropical sub-húmedo donde solamente en el mes de enero y febrero se pueden registrar temperaturas inferiores a 10°C (12). En un experimento realizado por Van Dijk y Morgan (15) compararon los requerimientos de eclosión entre aislamientos de *N. battus* de Escocia y el suroeste de Inglaterra y encontraron que no todos los huevos larvados requieren el estímulo frío para producir estadios infectantes. Asimismo, Van Dijk y Morgan (3) mencionan que los periodos prolongados de altas temperaturas ($25\text{-}30^{\circ}\text{C}$) no necesariamente afectan la sobrevivencia de los huevos de *N. battus*. Se esperaría que las altas temperaturas aumenten las tasas de mortalidad de larvas infectantes, pero las prácticas de manejo tales como el aumento de la carga animal favorece la infección de los ovinos con este nematodo y permite la sobrevivencia del mismo en climas extremos (3, 16).

La obtención de larvas L_3 de *N. filicollis* a partir de los cultivos de laboratorio con y sin previo enfriamiento de la heces, permite suponer que este género no requiere obligatoriamente de un periodo de enfriamiento y por ende puede

of areas where the eggs are cooled to produce infective larvae.

In a study conducted by Sánchez and Quiroz (11) 2% and 1% of sheep from Tlaxco, Tlaxcala, Mexico (cold weather 2603 m above sea level) were parasitized by *N. battus* and *N. spathiger* respectively. Most studies in Mexico report the presence of the *Nematodirus* genus without identifying the species of this nematode (9, 10). The present study is the first report for Mexico of *N. filicollis* in tropical climate; although it was not possible to obtain the adult parasites of *N. filicollis* because the infection occurred in a female registered ovine and the owner did not allow the sacrifice of the animal. In future studies, it will be necessary to obtain the adult stages and compare them morphometrically and genetically with other *Nematodirus* species and evaluate the nematode's capacity to cause damage to the health of the sheep of the Mexican sub-humid tropics.

The low elimination of eggs (100 EPG) of *N. filicollis* in the ovine of this study and the climatic limitations of the Mexican tropics for the survival of the larval eggs of the nematode could explain the low transmission in the herd studied. In addition, the intensive production system that was handled in the study farm and the fertilization of the cutting grass with feces of animals of the same farm, including the feces of the animals that were introduced from Córdoba, Veracruz (animals suspected of introducing the nematode genus into the farm), could explain the transmission of this nematode in the Mexican tropics. In future studies it will be necessary to evaluate the capacity of *N. filicollis* to produce natural infections in different production and management systems for sheep raised in the Mexican tropics.

The mixed infection of *N. filicollis* with other nematodes of the strongylida order along with the genus *Trichuris* found in the study sheep could have contributed to the deterioration of the health of the animal and present a clinical picture of gastrointestinal nematodiosis, a condition frequently observed in sheep of the region (17).

In conclusion *N. filicollis* is capable of surviving the biogeographical and climatological conditions of the state of Yucatan, Mexico, and for the first time the case of a sheep that acquired the natural infection with *N. filicollis* in tropical sub-humid conditions is reported in Mexico.

sobrevivir en las condiciones ambientales del trópico sub-húmedo. Asimismo, el establecimiento del género *Nematodirus* en otras regiones que no son de clima templado tales como en Sicilia, Italia (7), Hueytamalco, Puebla, México (10) y en el presente estudio demuestra la expansión geográfica de este nematodo a lugares fuera de áreas donde los huevos tienen un enfriamiento para poder producir larvas infectantes.

En un estudio realizado por Sánchez y Quiroz (11) encontraron que el 2% y 1% de ovinos de Tlaxco, Tlaxcala, México (clima frío con 2603 m sobre el nivel del mar) se encontraron parasitados por *N. battus* y *N. spathiger*, respectivamente. La mayoría de los estudios en México reportan la presencia del género *Nematodirus* sin identificar la especie de este nematodo (9, 10). El presente estudio es el primer reporte para México de *N. filicollis* en clima tropical; aunque en el mismo no fue posible obtener los parásitos adultos de *N. filicollis* debido a que la infección se presentó en un ovino hembra de registro y el propietario no permitió el sacrificio del animal. En futuros estudios será necesario obtener los estadios adultos y compararlos morfológica y genéticamente con otras especies de *Nematodirus* y evaluar la capacidad del nematodo para producir daños en la salud de los ovinos del trópico sub-húmedo mexicano.

La baja eliminación de huevos (100 h/gh) de *N. filicollis* en el ovino del presente estudio y las limitantes climáticas del trópico mexicano para la sobrevivencia de los huevos larvados del nematodo podrían explicar la baja transmisión en el rebaño estudiado. Además, el sistema de producción intensivo que se manejó en la granja de estudio y la fertilización del pasto de corte con heces de animales de la misma granja, incluyendo las heces de los animales que fueron introducidos de Córdoba, Veracruz (animales sospechosos de introducir el género de nematodo en la granja), pudieran explicar la transmisión de este nematodo en el trópico mexicano. En futuros estudios será necesario evaluar la capacidad de *N. filicollis* para producir infecciones naturales en distintos sistemas de producción y manejo de ovinos criados en el trópico mexicano.

La infección mixta de *N. filicollis* con otros nematodos del orden strongylida junto con el género *Trichuris* encontrados en el ovino de estudio pudieron haber contribuido al deterioro de la salud del animal y a presentar un cuadro clínico de nematodiosis gastrointestinal, afección frecuentemente observada en ovinos de la región (17).

Acknowledgement

The owner of the sheep farm is thanked for allowing access to his farm and conduction of the study.

Se concluye que *N. filicollis* es capaz de sobrevivir a las condiciones biogeográficas y climatológicas del estado de Yucatán, México y se reporta por primera vez el caso de un ovino que adquirió la infección natural con *N. filicollis* en condiciones de clima tropical sub-húmedo en México.

Agradecimiento

Se agradece al propietario de la granja ovina por permitir el acceso a su predio y realizar el estudio.

REFERENCIAS

1. Oliver AMB, Leathwick DM, Pomroy WE. A survey of the prevalence of *Nematodirus spathiger* and *N. filicollis* on farms in the North and South Islands of New Zealand. *New Zealand Vet J* 2014; 62(5):286-289.
2. Nadler SA, Hoberg EP, Hudspeth DS, Rickard LG. Relationships of *Nematodirus* species and *Nematodirus battus* isolates (Nematoda: Trichostrongyloidea) based on nuclear ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 2000; 86(3):588-601.
3. Van Dijk J, Morgan ER. The influence of temperature on the development, hatching and survival of *Nematodirus battus* larvae. *Parasitol* 2008; 135(2): 269-283.
4. Hoberg EP. Coevolution and biogeography among nematodirinae (Nematoda: Trichostrongylina) Lagomorpha and Artiodactyla (Mammalia): Exploring determinants of history and structure for the northern fauna across the Holarctic. *J Parasitol* 2005; 91:358-369.
5. Langrová I, Makovcová K, Vadlejch J, Jankovská I, Petrtyl M, Fechtner J, et al. Arrested development of sheep strongyles: onset and resumption under field conditions of Central Europe. *Parasitol Res* 2008; 103:387-392.
6. Morgan ER, Van Dijk J. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Vet Parasitol* 2012; 189:8-14.
7. Torina A, Dara S, Marino AM, Sparagano OA, Vitale F, Reale S, et al. Study of gastrointestinal nematodes in Sicilian sheep and goats. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1026:187-194.
8. Bowman, DD, Lynn RC, Eberhard ML. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 8th ed. Missouri, Saunders; 2003.
9. Montalvo-Aguilar X, López-Arellano ME, Vázquez- Prats V, Liébano-Hernández E, Mendoza-de-Gives P. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Téc Pecu Méx* 2006; 44(1):81-90.
10. Vázquez PVM. Aspectos epizootiológicos de las verminosis gastroentéricas en ovinos en clima A(f)c. [Tesis de Maestría] Ciudad de México D. F., México. Universidad Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Departamento de Medicina; 1985.
11. Sánchez SG, Quiroz HH. Frecuencia de parásitos gastrointestinales, pulmonares y hepáticos en ovinos de la Magdalena Soltepec, Tlaxcala, México. *Vet Méx* 1993; 24(3):195-198.
12. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información). Anuario estadístico y geográfico de Yucatán. 2015. México. http://www.datatur.sectur.gob.mx/ITxEF_Docs/YUC_ANUARIO_PDF15.pdf

13. Bautista F, Frausto O, Ihi T, Aguilar Y. Actualización del mapa de suelos del Estado de Yucatán México: enfoque geomorfopedológico y WRB. *Ecosist Rec Agrop* 2015; 2(6):303-315.
14. Rodríguez-Vivas RI, Cob-Galera LA. Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria. Segunda edición. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México 2005.
15. Van Dijk J, Morgan ER. Variation in the hatching behaviour of *Nematodirus battus*: Polymorphic bet hedging? *Int J Parasitol* 2010; 40(6):675-681.
16. Gethings OJ, Rose H, Mitchell S, Van Dijk J, Morgan ER. Asynchrony in host and parasite phenology may decrease disease risk in livestock under climate warming: *Nematodirus battus* in lambs as a case study. *Parasitol* 2015; 142:1306-1317.
17. Torres-Acosta JF, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero AJ, Cuéllar-Ordaz JA. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet Parasitol* 2012; 189(1):89-96.