

2.º 85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IMPORTANCIA DE LA SERIE COPROPARASITOSCOPICA
EN EL DIAGNOSTICO DE LA FASCIOLASIS EN BOVINOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

CARLOS GONZALEZ REBELES ISLAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

CAPITULO I.

Resumen.

CAPITULO II.

Introducción.

CAPITULO III.

Material y Métodos

CAPITULO IV.

Resultados y Discusión.

CAPITULO V.

Conclusiones

CAPITULO VI.

Bibliografía

I. Resumen.

La finalidad del presente trabajo es la de encontrar - entre cuatro horas del día, con intervalos de seis horas entre cada una, en cual ocurre mayor expulsión de huevos de Fasciola hepatica en heces del ganado bovino parasitado con este tremátodo; asimismo, determinar el número necesario de exámenes coproparasitológicos que se le deben efectuar a - una misma muestra para evitar la aparición de falsos negativos.

Se utilizó un lote de 6 bovinos raza Holstein, cuya -- edad fluctuaba entre los 4 y 5 años, los cuales estaban parasitados con Fasciola hepatica. Se tomaron 4 muestras de heces diariamente a cada uno de los animales a las siguientes horas: 6:00, 12:00, 18:00 y 24:00 hs.; todo esto se repitió durante 10 días consecutivos. Las muestras se examinaron por el método coproparasitológico de sedimentación, -- realizando una serie de 10 exámenes para cada una.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó - por el método de ji cuadrada (χ^2) para conocer si existían diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cuatro muestras diarias; sólo en 4 de los 10 días las muestras de las

24:00 hs., resultaron ser diferentes con respecto a las tres primeras horas, conteniendo un mayor porcentaje de falsos negativos. Por otro lado se encontró que al realizar 3 exámenes coproparasitológicos a una muestra se obtiene un 93.69% de efectividad en el diagnóstico de fasciolosis en bovinos, mientras que con un examen se obtuvo solamente el 70.37%.

II. Introducción.

La fasciolosis, también conocida con los nombres de "distomatosis hepática", "mal de botella", "hígado picado o podrido", "palomilla" y "conchuela hepática" entre otros, es un padecimiento parasitario que se presenta en la mayoría de las especies ganaderas, pero fundamentalmente en bovinos y ovinos, así como también en algunas especies de la fauna silvestre, y aún en el hombre (5,19,20,25,41).

El agente etiológico de este padecimiento es el tremátodo Fasciola hepatica, del cual también se conocen las especies: F. magna (55), F. indica (8,22,33,40) y F. gigantica, de la que se han informado algunos casos en México (50).

La F. hepatica en su estado adulto se aloja en los conductos biliares del parénquima hepático, aunque en algunas ocasiones invade otros tejidos u órganos (14,53); mientras que en su fase larvaria parasita a gasterópodos pulmonados de los géneros: Lymnaea, Fossaria, Galba y Pseudosuccinea, que son los denominados huéspedes intermediarios (24).

La fasciolosis se encuentra distribuida en casi todo el mundo. En México se le encuentra tanto en el litoral del Norte y del Pacífico como en los valles del altiplano,

así como también en las llanuras del norte. Su incidencia varía de acuerdo a los factores ecológicos que intervienen en el ciclo evolutivo del parásito y además está siempre asociada con sus huéspedes intermediarios, así como también con los sistemas de manejo de las diferentes especies involucradas en el problema (49).

La enfermedad puede presentarse en forma aguda o crónica, la primera ocasiona pérdidas económicas directas, -- causadas por la muerte de los animales, principalmente en ovinos (33); la forma crónica produce pérdidas indirectas, de mayor volumen económico, debidas a que se presenta en el ganado afectado, una disminución de la resistencia a -- otras enfermedades, anemia y merma en la producción lactea, disminución de la densidad y la calidad de la lana, decomi so total o parcial de los hígados (2,10,18,31,52,54).

Debido a las enormes pérdidas económicas (8,25), que ocasiona la fasciolosis en la ganadería nacional y siendo ésta enzoótica en amplias regiones de México, ha merecido la atención de diversos investigadores que han tratado en varias formas de resolver el problema (59).

En la actualidad el método más utilizado para controlar la fasciolosis es el atacar al parásito en su fase infectiva, dentro del huésped definitivo con la finalidad de romper el ciclo del tremátodo en esta etapa. De esta forma al efectuar un tratamiento al ganado, además de producir la recuperación del animal, al atacar la fasciola ya sea en su estado maduro o inmaduro, se impide su reproducción, evitando la salida de huevos por las heces, los cuales continuarían el ciclo y consecuentemente la infección o reinfección de otros animales. Sin embargo, también hay que tomar en cuenta que para llevar a cabo un tratamiento adecuado y eficaz contra la distomatosis hepática, resulta de gran importancia el lograr un diagnóstico efectivo del padecimiento. Además de que en la mayoría de los casos es necesario comprobar el efecto fasciolicida del producto utilizado, efectuando un examen posterior al tratamiento, entendiéndose con esto la importancia que dicho diagnóstico tiene.

Existen innumerables reportes en la literatura que tratan acerca de varias técnicas utilizadas para el diagnóstico de la distomatosis hepática. Sin embargo, algunos de estos métodos presentan inconvenientes y otros factores, los cua--

les se discutirán más adelante, que dificultan el diagnóstico (1,7,21,27,32,35,36,45,51).

En la distomatosis hepática de tipo agudo, el diagnóstico se realiza generalmente mediante el examen postmortem del animal afectado, observándose las lesiones típicas en el tejido hepático (hepatitis traumática hemorrágica), así como por el hallazgo de tremátodos en el parénquima del hígado (12). Para el diagnóstico de la distomatosis hepática o fasciolosis en su estado crónico se han desarrollado varios métodos, de los cuales los principales son los inmunológicos y los coproparasitológicos.

De los métodos inmunológicos para el diagnóstico de la fasciolosis, se han utilizado varias técnicas, siendo las más comunes la intradermo-reacción, fijación de complemento, inmunoelectroforesis e inmunofluorescencia indirecta, con las que se obtienen resultados de una seguridad variable entre el 14 y 60% (35,36). Kapp (37), señala que la efectividad del antígeno para la prueba de precipitación en gel da resultados variables, siendo el 54% para el antígeno somático salino, el 50% para el polisacárido y el 42.5% para el mucoprotéico. En México Quiroz y Herrera en pruebas de in-

tradermo-reacción en bovinos, encontraron una efectividad del 96.6% '48), sin embargo se presenta el problema de la disponibilidad del antígeno. Hörchner (43) indica un 87% de efectividad para la prueba de anticuerpos fluorescentes, pero menciona también que resulta muy costosa para poder ser recomendada como prueba de rutina. Otra desventaja que presentan los métodos inmunológicos en el diagnóstico de la fasciolosis es, el que pueden presentarse reacciones cruzadas con otros parásitos (24,44), debido al variado número de antígenos presentes en el organismo del tremátodo '34), - así como también, de que se requiere para la realización de estas técnicas, de personal entrenado para tal efecto y material especializado.

Ciertas técnicas para el diagnóstico de otras enfermedades parasitarias han sido adaptadas para el diagnóstico de la fasciolosis, como por ejemplo, la modificación del método AMS III comúnmente utilizado en el diagnóstico de la esquistosomiasis (1,29). Lamentablemente estas técnicas tienen las mismas limitantes señaladas anteriormente. Además, Hope (30) al comparar este método (AMS III) con el de sedimentación, demostró que esta última técnica resultó significativamente más exacta y práctica.

Los métodos de diagnóstico por medio de exámenes copro parasitológicos han demostrado ser los más efectivos para detectar la distomatosis hepática o fasciolosis (58). Este tipo de diagnóstico consiste en detectar los huevos del digtoma en las heces del ganado afectado; gran número de técnicas han sido utilizadas con este fin, variando desde un simple frotis de heces (7), hasta elaborados métodos cuantitativos (15,26,27,56,59). Algunos métodos consisten en la concentración de huevos por medio de un tamizado (16,60), en otros se utiliza la sedimentación basandose en la relativamente alta gravedad específica de los huevos que les permite, al estar en suspensión, sedimentar más rápidamente que las pequeñas partículas de desechos alimenticios encontrados en las heces, facilitando de esta manera su separación. También se han utilizado técnicas de flotación para recuperar huevos de Fasciola hepatica de las heces. Todas estas técnicas han sufrido modificaciones y variaciones de acuerdo a los diversos autores que las han trabajado, tales como las descritas por Denis et al. (13) quienes emplearon la técnica de sedimentación centrifugando a baja velocidad y tiñendo el depósito final con tintura de yodo del 7-15%. Koopman (39) menciona que Doeksen utilizó 20 a 25 g de he-

ces disueltas en agua, las cuales eran filtradas a través de una malla de 0.4 mm, dejando reposar la suspensión durante 4 a 12 horas y tificando el sedimento con azul de metileno. En la técnica cuantitativa por sedimentación, -- descrita por Parfitt y Banks (47) se utilizan de 1 a 2 -- gramos de heces y se tiñe el sedimento con solución de cristal violeta, azul de metileno o verde malaquita.

Las técnicas por medio de flotación también han sufrido modificaciones de acuerdo a los diversos autores. - Euzéby (21) señala que Vajda, para el estudio de los huevos de fasciola, utilizó una solución de silicato sódico con una densidad de 1.430; Nesemerí (45) cita que Schmid usó carbonato potásico con densidad de 1.450; Janecksko y Urbanek, mencionados por Euzéby (21) emplearon en esta técnica el yoduro mercúrico-potásico con densidad de 1.440; Parfitt (46) empleó sulfato de zinc; y Huertas (32) solución glucosada con densidad de 1.275. Existen multitud - de métodos diferentes dirigidos a concentrar huevos de tremátodos con estas soluciones hipertónicas, pero presentan la desventaja de que los huevos se deforman; también en algunas de estas soluciones se tiene el inconveniente de que

son demasiado viscosas y otras son incapaces de penetrar - en la materia vegetal contenida en las heces, haciendo así que las partículas floten junto con los huevos y además -- que pueden estropear las lentes del microscopio, amen de - que se utilizan productos químicos costosos (45, 51, 58).

De los anteriores, los métodos de sedimentación resul- tan ser de las mejores técnicas rutinarias conocidas para el diagnóstico de la fasciolasis; sin embargo estas técni- cas tienen el inconveniente de ser muy tardadas, pues se - requiere de un lapso variable de 30 a 60 minutos para una sola muestra (23,42,57); en ocasiones se requiere hacer va- rios exámenes coproparasitológicos en los que se emplearía demasiado tiempo y material, siendo esto una seria limitan- te para el empleo de estas técnicas. Siendo dentro de es- tas técnicas coproparasitológicas, una de las mejores y - de las más prácticas, la de Benedek (9,45), debido a su ra- pidez, efectividad y a que casi no emplea reactivos duran- te el procedimiento. Esta técnica de sedimentación, cuali- tativa, ha sido recientemente modificada por Boray y Pear- son (6) para uso cuantitativo y se encontró que resulta más sensible que la técnica de flotación en nitrato mercúrico-po

tásico descrita por Whitlock (59). La diferencia de la sensibilidad fue particularmente pronunciada en la detección de infecciones ligeras de distomatosis hepática. Huertas (32) modificó el tiempo de sedimentación, reduciéndolo a un minuto, señalando además que esta técnica de sedimentación modificada es más sensible que la técnica de flotación.

Sin embargo es necesario tomar en cuenta, que debido a que el método de sedimentación se basa en la observación de los huevos de Fasciola hepatica en las heces del ganado infectado, el diagnóstico se verá afectado por la salida y cantidad de los huevos de distoma en las heces y las variaciones o fluctuaciones que con ello ocurran. Dicha expulsión no es constante, sino que se encuentra influenciada por diversos factores. Se sabe que cada parásito ovoposita alrededor de 20,000 huevos diarios (58), los cuales se almacenan en la vesícula biliar; ésta descarga su contenido en el intestino con cierta periodicidad, pudiendo aumentar o disminuir de acuerdo a la alimentación o el ayuno (17). Se señala también este hecho por algunos autores como Darski (11), que trabajando con 5 borregos positivos a Fasciola hepatica, reportó que el mayor número de huevos lo encontró -

en la muestra tomada al medio día y Bogatko (3) trabajando con bovinos encontró que la producción de huevos más elevada fue en la toma de la muestra de la tarde. Otros factores - de los que puede depender la salida de los huevos por las heces, son (58):

---- La consistencia de las heces, ya que si las mismas son diarreicas, entonces, aunque los parásitos pongan el mismo número de huevos, estarán diluidos y habrá una consiguiente disminución en el recuento por gramo. El estreñimiento produce el efecto contrario.

---- El volumen de la dieta, actuando directamente sobre el volumen de las heces. Si los animales se alimentan a base de una ración concentrada, entonces el recuento de los huevos aumenta, mientras que, si su reacción es voluminosa, a base de heno o hierba, el recuento da un número menor. El volumen de las heces está en relación también con la edad del animal y por la misma razón el recuento tiende a dar cifras más altas en animales jóvenes que en adultos.

---- La especie animal. Como consecuencia de la gran diferencia en el volumen de la producción de heces, el recuento de

huevos en las heces de ovinos es mucho más alto que en las de vacunos.

---- La resistencia del huésped, ya que como consecuencia de que el huésped se hace resistente reduce la producción de huevos de los parásitos que contiene. Sin embargo el ganado vacuno, en algunos casos, tiende a liberarse de su infección de fasciolas al cabo de meses o años y es más probable que una disminución en la producción de huevos preceda a la expulsión verdadera del tremátodo.

---- Por último, la hora en que se les da la alimentación al ganado, e incluso la posición del animal, pueden afectar la expulsión de huevos en las heces.

Por los factores antes mencionados sucede que en varias ocasiones se pueden dar como negativos los resultados de animales parasitados con Fasciola hepatica; Herrera (28) reporta que fue necesario realizar hasta 8 exámenes coproparasitoscópicos para poder alcanzar un 100% de efectividad en un grupo de bovinos parasitados, ya que al efectuar solamente un examen se alcanzó un 51.28% de animales positivos.

Debido a los problemas expuestos anteriormente, se planteó el presente trabajo, con la finalidad de alcanzar una mayor eficiencia en el diagnóstico de la fasciolosis, partiendo a probar dos hipótesis:

Los huevos de Fasciola hepatica en heces rectales se encuentran en mayor cantidad a determinada hora del día.

La repetición de un número de observaciones coproparasitológicas a una muestra, permite realizar el diagnóstico de laboratorio de la fasciolosis con mayor precisión.

Por lo tanto, el presente estudio, pretende los siguientes objetivos: El determinar entre cuatro horas del día, con intervalos de seis horas entre cada una, en cual de ellas ocurre una mayor expulsión de huevos del parásito en las heces del ganado bovino. Y asimismo, el determinar entre 10 observaciones el número necesario de exámenes coproparasitológicos que se le deben efectuar a una misma muestra para evitar la aparición de falsos negativos.

III. Material y Métodos.

Para llevar a cabo el presente trabajo se realizó un muestreo a un grupo de bovinos en el Centro Experimental Pecuario de Tulancingo, Hgo., con el objeto de detectar a los animales que resultaran positivos a fasciolosis. De los resultados obtenidos se seleccionó un lote de 6 bovinos raza Holstein, de los cuales cuatro eran hembras y dos machos, y cuya edad fluctuaba entre 4 y 5 años.

A estos animales infectados en forma natural con Fasciola hepatica, se les mantuvo juntos dentro de un corral separandolos del resto del ganado. La alimentación consistió en forraje cortado de la pradera y se les llevó directamente al pesebre, por lo que los 6 bovinos comían a la misma hora.

La toma de muestras fue realizada dentro del mismo corral. Se muestreó a cada uno de los animales 4 veces al día con intervalos de 6 horas entre la toma de una muestra y la otra, comenzando a tomar la primera a las 6:00, la segunda a las 12:00, la tercera a las 18:00 y la cuarta a las 24:00 horas; esto se repitió durante 10 días consecutivos, obteniendo un total de 240 muestras. Las he-

ces se tomaron directamente del recto de cada animal y fueron colocadas en bolsas de plástico previamente identificadas: el material se mantuvo en refrigeración hasta su utilización en el laboratorio, realizando posteriormente 10 exámenes coproparasitológicos por sedimentación, a cada una de las 240 muestras, hasta completar un total de 2,400 observaciones.

La técnica de sedimentación utilizada fue la de Benedek (9,45), la cual consiste en mezclar materia fecal, 5 a 10 g tratándose de bovinos ó 3 g en pequeños rumiantes, con agua en un mortero, posteriormente son filtradas a través de una coladera de malla fina hacia un frasco a una altura de 10 cm, luego se deja reposar por espacio de unos minutos para que sedimente. Benedek (7) demostró que prácticamente no existió diferencia entre el número de huevos recuperados por extender el tiempo de sedimentación de 2 minutos a una hora. Posteriormente se decanta el líquido sobrenadante, repitiendo la operación cuantas veces sea necesario, hasta que el sobrenadante quede claro. Se vierte el sedimento a una caja de petri, se le agrega una gota de azul de metileno al 1% y se examina la muestra a través --

del microscopio estereoscópico. Sin embargo, para utilizarla en el presente trabajo se le realizaron las siguientes modificaciones: La dilución de los 5 g de heces se realizó en un vaso de plástico con agua y agitando con una cuchara; otra variación fue la de efectuar dos colados sucesivos a la suspensión de heces en lugar de uno, filtrando en la segunda ocasión con un pedazo de gasa dentro del colador, lo que permitió el paso de los huevos y a la vez retuvo mayor cantidad de residuos, facilitando la observación; el tiempo de sedimentación utilizado fue de tres minutos, basándose en el hecho de que los huevos de Fasciola hepatica sedimentan a una velocidad de 100 mm/min (32,58) y como se utilizaron frascos de 250 ml de capacidad y con una altura de 10 cm, la sedimentación ocurrió en 1 minuto, dando 2 minutos como margen de seguridad; por último para colorear el sedimento se utilizaron de 2 a 4 gotas de violeta de genciana al 4%. El sedimento ya coloreado se vertió a una caja de petri que tenía el fondo cuadrículado, con el objeto de facilitar la observación a través del microscopio estereoscópico; después se efectuó una revisión total en la muestra, con el fin de detectar cuales de los 10 exámenes realizados a cada -

una resultaron positivos, por el hecho de encontrar uno o varios huevos del distoma y cuales aparecieron como falsos negativos al no encontrarse huevos del parásito; posteriormente se anotó en un cuadro por animal el número de positivos encontrados dentro de cada serie coproparasitoscópica (ver esquema).

El esquema, ejemplifica el diseño del experimento y la forma en que fueron anotados los resultados; en la parte superior del mismo se observan las 4 horas del día en que fueron tomadas las muestras; y en forma vertical, del lado izquierdo, los 10 días que duró el muestreo. Este modelo de cuadro se repitió 6 veces, uno por cada bovino en experimentación.

Esquema del diseño experimental

H O R A S

6:00

12:00

18:00

24:00

| | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
|----|------|-------|-------|-------|
| 1 | * | * | * | * |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |

* Dentro de cada división se anotó el número de positivos encontrados, en los 10 exámenes coproparascópicos realizados a cada una de las muestras.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo por el método de χ^2 (4), con el objeto de determinar las diferencias existentes entre los datos que se obtengan de las observaciones efectuadas al muestreo dentro de las cuatro horas mencionadas anteriormente.

Se realizó además un análisis de probabilidad a los resultados, por medio de distribución binomial, con el objeto de poder determinar el número de exámenes coproparascópicos mínimo que se le deben efectuar a una muestra, para evitar falsos negativos.

IV. Resultados y Discusión.

Los datos obtenidos después de haber efectuado la serie coproparasitológica de 10 exámenes a cada una de las muestras tomadas a los seis bovinos durante 10 días y a 4 diferentes horarios, se observan en los cuadros número 1 al número 6. En ellos se anotaron únicamente el número de exámenes que resultaron positivos y cada cuadro corresponde a las observaciones de un bovino. Como puede apreciarse en los cuadros 1, 2, 3 y 6 se encontró en general un número menor de positivos en las muestras de las 24:00 horas.

Para poder observar más claramente el comportamiento de las muestras en cada uno de los cuatro diferentes horarios en que fueron tomadas, los datos se agruparon en el cuadro número 7. En él se encuentra anotado en porcentajes, el total de exámenes positivos observados por día de los seis animales juntos en una hora determinada y a partir del mismo se obtuvo la gráfica número 1. Esta gráfica representa el comportamiento de las muestras en cada una de las horas y se puede ver claramente que existe un menor porcentaje de exámenes positivos a las 24:00 horas con respecto a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas.

Cuadro No. 1

Número de muestras positivas a *F. hepatica*, observadas en la serie coproparasitoscópica de 10 exámenes por muestra, durante 10 días y en cuatro diferentes horas, del bovino # 1.

| | | H O R A S | | | |
|------------------|----|-----------|-------|-------|-------|
| | | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
| D I A S | 1 | 8 | 10 | 6 | 4 |
| | 2 | 8 | 7 | 9 | 5 |
| | 3 | 7 | 10 | 10 | 2 |
| | 4 | 9 | 10 | 10 | 4 |
| | 5 | 9 | 10 | 10 | 4 |
| | 6 | 8 | 10 | 9 | 4 |
| | 7 | 4 | 10 | 9 | 1 |
| | 8 | 9 | 10 | 10 | 9 |
| | 9 | 10 | 10 | 10 | 4 |
| | 10 | 9 | 9 | 10 | 6 |
| TOTAL | | 81 | 96 | 93 | 43 |

Cuadro No. 2

Número de muestras positivas a *F. hepatica*, observadas en la serie coproparasitoscópica de 10 exámenes por muestra, durante 10 días y en cuatro diferentes horas, del bovino # 2.

H O R A S

6:00

12:00

18:00

24:00

| | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 10 | 10 | 9 | 9 |
| 2 | 8 | 10 | 9 | 7 |
| 3 | 10 | 10 | 10 | 7 |
| 4 | 9 | 9 | 10 | 1 |
| D I A S 5 | 7 | 10 | 2 | 8 |
| 6 | 8 | 10 | 10 | 8 |
| 7 | 9 | 10 | 10 | 7 |
| 8 | 10 | 10 | 10 | 8 |
| 9 | 10 | 10 | 9 | 0 |
| 10 | 10 | 4 | 10 | 2 |
| TOTAL | 91 | 93 | 89 | 57 |

Cuadro No. 3

Número de muestras positivas a F. hepatica, observadas en la serie coproparasitoscópica de 10 exámenes por muestra, durante 10 días y en cuatro diferentes horas, del bovino # 3.

H O R A S

6:00 12:00 18:00 24:00

| | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 9 | 10 | 10 | 6 |
| 2 | 6 | 8 | 9 | 0 |
| 3 | 8 | 8 | 9 | 3 |
| 4 | 10 | 6 | 9 | 5 |
| D I A S 5 | 9 | 9 | 10 | 2 |
| 6 | 6 | 9 | 8 | 5 |
| 7 | 9 | 10 | 9 | 1 |
| 8 | 9 | 10 | 10 | 4 |
| 9 | 10 | 10 | 10 | 4 |
| 10 | 6 | 6 | 10 | 5 |
| TOTAL | 82 | 86 | 94 | 35 |

Cuadro No. 4

Número de muestras positivas a *F. hepatica*, observadas en la serie coproparasitológica de 10 exámenes por muestra, durante 10 días y en cuatro diferentes horas, del bovino # 4.

H O R A S

6:00 12:00 18:00 24:00

| | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
|--------------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 10 | 10 | 9 | 8 |
| 2 | 10 | 8 | 10 | 5 |
| 3 | 10 | 10 | 7 | 10 |
| 4 | 5 | 10 | 10 | 9 |
| D | | | | |
| 5 | 10 | 10 | 10 | 7 |
| I | | | | |
| 6 | 9 | 10 | 9 | 10 |
| A | | | | |
| 7 | 10 | 10 | 10 | 9 |
| S | | | | |
| 8 | 10 | 10 | 10 | 8 |
| 9 | 10 | 10 | 9 | 3 |
| 10 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| TOTAL | 94 | 97 | 94 | 78 |

Cuadro No. 5

Número de muestras positivas a *F. hepatica*, observadas en la serie coproparasitológica de 10 exámenes por muestra, durante 10 días y en cuatro diferentes horas, del bovino # 5.

H O R A S

| | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
|-------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 2 | 10 | 6 | 10 | 6 |
| 3 | 9 | 10 | 10 | 0 |
| 4 | 2 | 10 | 10 | 10 |
| D | 5 | 10 | 10 | 10 |
| I | 6 | 10 | 10 | 9 |
| A | 7 | 10 | 10 | 10 |
| S | 8 | 10 | 10 | 7 |
| 9 | 10 | 10 | 10 | 9 |
| 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| TOTAL | 91 | 96 | 100 | 81 |

Cuadro No. 6

Número de muestras positivas a F. hepatica, observadas en la serie coproparasitoscópica de 10 exámenes por muestra, durante 10 días y en cuatro diferentes horas, del bovino # 6.

H O R A S

6:00

12:00

18:00

24:00

| | 6:00 | 12:00 | 18:00 | 24:00 |
|-------|------|-------|-------|-------|
| 1 | 10 | 10 | 8 | 5 |
| 2 | 10 | 8 | 10 | 4 |
| 3 | 10 | 10 | 9 | 3 |
| 4 | 4 | 10 | 10 | 3 |
| D | | | | |
| 5 | 10 | 10 | 10 | 9 |
| I | | | | |
| A | | | | |
| 6 | 8 | 10 | 9 | 9 |
| S | | | | |
| 7 | 9 | 10 | 10 | 10 |
| 8 | 10 | 10 | 10 | 7 |
| 9 | 7 | 10 | 10 | 7 |
| 10 | 7 | 10 | 3 | 10 |
| TOTAL | 85 | 98 | 89 | 67 |

Cuadro No. 7

Promedio del total de exámenes coproparasitológicos positivos a F. hepatica de los 6 bovinos, durante 10 días y en cuatro horas diferentes.

H O R A S

6:00

12:00

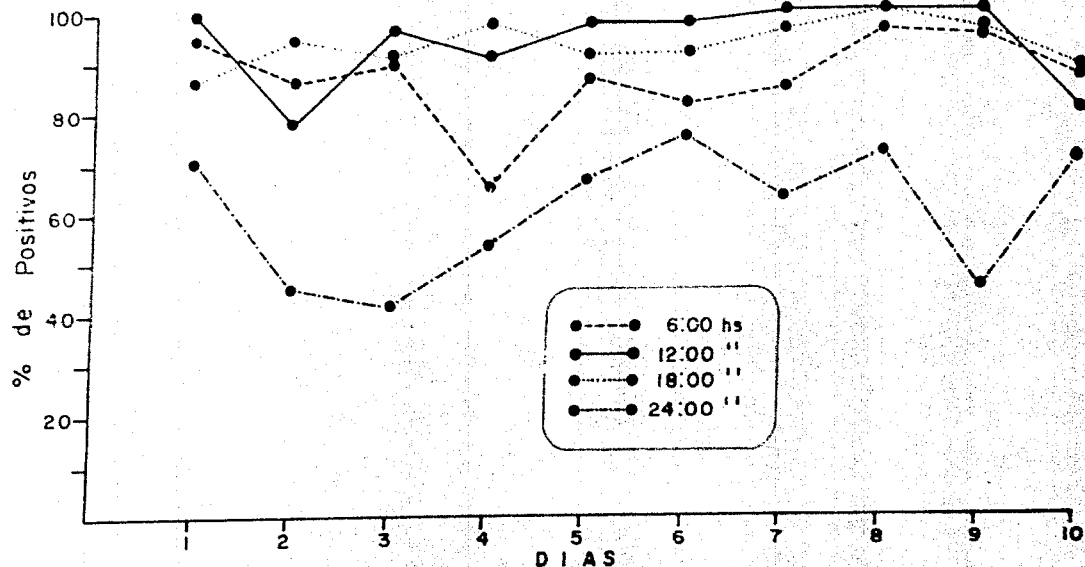
18:00

24:00

| | | | | |
|-----------------------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 95 % | 100 % | 86.66 % | 70 % |
| 2 | 86.66 % | 78.33 % | 95 % | 45 % |
| 3 | 90 % | 96.66 % | 91.66 % | 41.66 % |
| 4 | 65 % | 91.66 % | 98.33 % | 53.33 % |
| D I A S 5 | 91.66 % | 93.33 % | 86.66 % | 66.66 % |
| 6 | 81.66 % | 98.33 % | 91.66 % | 75 % |
| 7 | 85 % | 100 % | 96.66 % | 63.33 % |
| 8 | 96.66 % | 100 % | 100 % | 71.66 % |
| 9 | 95 % | 100 % | 96.66 % | 45 % |
| 10 | 86.66 % | 80 % | 83.33 % | 70 % |
| \bar{x} | 87.33 % | 94.33 % | 93.16 % | 60.16 % |

GRAFICA I

RELACION DE LOS PORCENTAJES DE EXAMENES COPROPARASITOSCOPICOS
POSITIVOS A E. hepatica DE LOS BOVINOS EN LAS CUATRO HORAS,
DURANTE 10 DIAS



Para demostrar estadísticamente si existió o no una diferencia en relación al número de positivos encontrados a las diferentes horas en que se realizó el muestreo, se analizaron los datos obtenidos por medio del método de χ^2 .

En primer lugar se procedió a la evaluación estadística del total de positivos encontrados para cada una de las cuatro horas durante los 10 días, comparando las diferentes horas entre sí y se encontró que las horas 6:00, 12:00 y 18:00 fueron iguales, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación a las 24:00 horas, siendo en esta última en la que se observó el menor número de positivos. Solamente el 60.16% \bar{x} de los exámenes efectuados al muestreo de las 24:00 horas fueron positivos, mientras que para las 6:00, 12:00 y 18:00 horas fue de 87.33% \bar{x} , 94.33% \bar{x} y 93.16% \bar{x} respectivamente (ver cuadro # 7).

A manera de comprobación, al efectuar un análisis por medio de un cuadro de contingencia en el cual se analizaron los resultados de las cuatro horas durante todos los días, se obtuvo un resultado a la χ^2 de 19.07. Dicha diferencia se debe al menor número de positivos en el muestreo de las 24:00 horas, ya que al efectuar el mismo análisis, se utili

zó sólo las tres primeras horas (6:00, 12:00 y 18:00) y se obtuvo un resultado a la χ^2 de 6.86, por lo que se ve que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) para estas horas.

Sin embargo, el análisis diario mostró que solamente durante los días 2,3,4 y 9 del muestreo existieron diferencias ($p < 0.05$) entre las 24:00 horas con respecto a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas, que fueron iguales. La gráfica número 1 muestra, en la curva que corresponde al muestreo de las 24:00 horas, la aparición de los puntos más bajos en los días 2,3,4 y 9; que fueron los días en que hubo menor número de positivos. Solamente en el día 4 no se observa claramente esta situación debido a que en éste las muestras de las 6:00 horas presentaron un porcentaje muy bajo de positivos. Sin embargo al compararlo con los puntos que corresponden a las 12:00 y 18:00 horas se puede observar la diferencia.

A partir de los datos obtenidos con este estudio no se pudo probar la primera hipótesis planteada en un principio. Ya que no hubo diferencias entre las cuatro horas en que se tomaron las muestras; y solamente en cuatro de los diez - -

días que duró el muestreo, apareció un porcentaje menor de positivos a las 24:00 horas. Tampoco se encontró concordancia de resultados con los reportados en otros trabajos (3, 11), donde señalan que existe una mayor expulsión de huevos del trematodo en una determinada hora del día.

Sin embargo hay que tomar en cuenta que el presente estudio se realizó con un número muy reducido de animales, y el rango de horas entre la toma de cada muestra fue muy grande, además de que como no fue posible sacrificar los animales no se conoció el grado de parasitosis en cada uno de ellos. Por lo que para ampliar la inferencia de este trabajo, sería necesario realizarlo con un mayor número de animales y conociendo el grado de infección de los mismos, volumen de las heces y otras variables que pudieran afectar el diagnóstico.

En relación al número mínimo de exámenes coproparasitoscópicos que se han de efectuar a una muestra para obtener una seguridad del 90 al 100% de que un animal es positivo o no, al efectuar un diagnóstico de fasciolosis; se realizó una análisis de probabilidad por distribución binomial con los datos obtenidos a partir de las 2,400 observa

ciones: analizando por separado el muestreo de las tres -- primeras horas (6:00, 12:00 y 18:00) y por otro lado al de las 24:00 horas por resultar diferente a las horas anteriores, en cuatro días.

Los resultados obtenidos a partir del primer análisis efectuado con las tres primeras horas se observan en la -- gráfica número 2; en ella se muestra la distribución acumulativa de la probabilidad de encontrar un positivo, al realizar 10 exámenes coproparasitológicos por muestra, tomada a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas. Se puede observar que al efectuar 3 exámenes coproparasitológicos a una sola muestra se alcanza una probabilidad de 0.93 de encontrar un positivo, que expresado en porcentaje se puede decir que con tres exámenes realizados a una muestra se obtiene un 93% de efectividad. Además la gráfica muestra como el incremento de esa probabilidad resulta muy bajo al efectuar un número mayor de exámenes a partir de ese punto. En el cuadro número 3 se puede ver claramente que el incremento porcentual de efectividad es de .33% al realizar 4 exámenes, 5% con 5 exámenes y a partir de este número el incremento es mínimo, bajando de un .53 a .04% con 10 exámenes. Por -

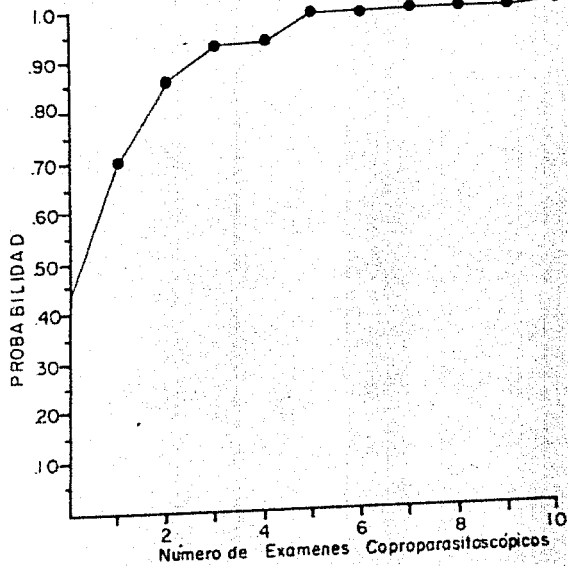
lo que es suficiente efectuar solamente 3 exámenes para obtener una seguridad del 93.69% de efectuar un diagnóstico efectivo.

La gráfica número 3 muestra una situación diferente, se alcanza una probabilidad de 0.90 (90% de efectividad) - hasta después de efectuar 8 exámenes. Y como se puede observar en el cuadro número 9, el incremento porcentual de efectividad, aunque también va bajando al aumentar el número de exámenes, resulta mayor que en el primer análisis. - En este caso el incremento porcentual de efectividad va de 10.89% al 3.28% con 10 exámenes. La probabilidad de encontrar un positivo dentro de esta serie coproparasitoscópica, resultó más baja debido a que este análisis se efectuó con el muestreo de las 24:00 horas, que fue cuando se detectó, durante cuatro días, una mayor cantidad de falsos negativos, por lo que resultó que sería necesario efectuar un mayor número de exámenes para alcanzar un 90% de efectividad.

Los resultados obtenidos del primer análisis por distribución binomial (a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas) corroboran la segunda hipótesis planteada al principio del experimento.

GRAFICA 2

PROBABILIDAD ACUMULATIVA DE ENCONTRAR UN EXAMEN POSITIVO DE F. hepatica EN BOVINOS, AL REALIZAR SERIES COPROPARASITOSCOPICAS DE 10 EXAMENES POR MUESTRA, CON EL MUESTREO DE LAS 3 PRIMERAS HORAS (6:00, 12:00 Y 18:00 hs)



Cuadro No. 8

Serie de exámenes coproparasitológicos de *F. hepatica* en bovinos y efectividad porcentual acumulativa en el muestreo de las tres primeras horas (6:00, 12:00 y -- 18:00).

| E.C.P. | P | Δ P |
|--------|---------|------------|
| 1 | 70.37 % | ----- |
| 2 | 85.79 % | 15.42 % |
| 3 | 93.69 % | 7.90 % |
| 4 | 94.02 % | 0.33 % |
| 5 | 99.02 % | 5 % |
| 6 | 99.55 % | 0.53 % |
| 7 | 99.68 % | 0.13 % |
| 8 | 99.70 % | 0.02 % |
| 9 | 99.70 % | 0 % |
| 10 | 99.74 % | 0.04 % |

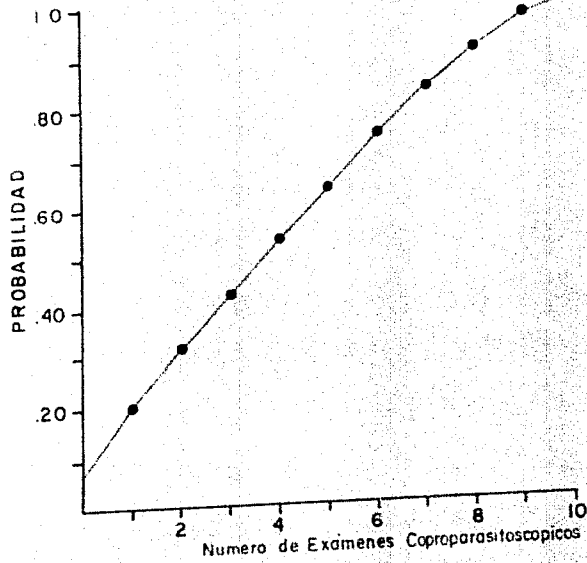
E.P.C. - Número de exámenes coproparasitológicos

P - Porcentaje

Δ P - Incremento

GRAFICA 3

PROBABILIDAD ACUMULATIVA DE ENCONTRAR UN EXAMEN POSITIVO DE *F. hepatica* EN BOVINOS, AL REALIZAR SERIES COPROPARASITOSCOPICAS DE 10 EXAMENES POR MUESTRA, CON EL MUESTREO DE LAS 24:00 hs



Cuadro No. 9

Serie de exámenes coproparasitológicos de F. hepatica en bovinos y efectividad porcentual acumulativa en el muestreo de las 24:00 horas.

| E.C.P. | P | Δ P |
|--------|---------|------------|
| 1 | 20.30 % | ----- |
| 2 | 31.19 % | 10.89 % |
| 3 | 42.29 % | 11.10 % |
| 4 | 53.01 % | 10.72 % |
| 5 | 63.50 % | 10.49 % |
| 6 | 73.84 % | 10 % |
| 7 | 83.11 % | 9.27 % |
| 8 | 90.81 % | 7 % |
| 9 | 96.72 % | 5.91 % |
| 10 | 100 % | 3.28 % |

E.C.P. - Número de exámenes coproparasitológicos

P - Porcentaje

Δ P - Incremento

V. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos a lo largo del experimento, no se encontraron diferencias significativas entre las cuatro diferentes horas en que fueron tomadas las muestras. Excepto en cuatro días de los diez que duró el muestreo, las 24:00 horas fue diferente con respecto a las otras tres primeras horas, por encontrarse en ella un mayor porcentaje de falsos negativos.

A partir de la serie coproparasitoscópica de 10 exámenes efectuados por cada muestra, se determinó que con tres exámenes realizados a cada una es suficiente para alcanzar un 93.69% de efectividad en el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos.

VI. Bibliografía.

- 1) Akahane, Hiroshige, Tomoo O., Takeshi S., Kiichi Hiro
sawa. (1975). Diagnosis of fasciolasis: I. Com
parison of the efficacies of various concentra--
tion techniques of ova in stool. Jap.J. Parasit-
tol., 24(2): 55-60. Cit. Biol.Abst. (1976), 62(1):
365.
- 2) Black N.M., Froyd G. (1972). The possible influence -
of liver fluke infestation on milk quality. Scien
tific Letters. Vet. Rec., 90(3): 71-72.
- 3) Bogatko W. (1972). Diagnosis of bovine fasciolasis -
by faecal examination. Med.Weter, 28(1): 31-33.
Cit. Fiol. Abst. (1973) 56(5):2745.
- 4) Bonnier G., Tedin O. (1965). Bioestadística. Los mé-
todos estadísticos para la valoración de experi-
mentos biológicos. Ed. Acribia, España. pp 67-70.
- 5) Bonilla C. A. (1974). Contribución al estudio de la Fas
ciola spp su frecuencia en el ganado bovino del -
municipio de Tuxpan, Ver. Tes.Lic., FMVZ. UNAM.,
México.

- 6) Boray J.C., Pearson I. G. (1960). The anthelmintic - efficiency of tetrachlorodifluoroethane in sheep infested with F. hepatica. Aust. Vet. J., 36: -- 331-337.
- 7) Boray J.C. (1969). Standardization of techniques for - pathological and anthelmintic studies with Fasciola spp. Division of Animal Health, C.S.I.R.O., Mc. Master Lab., Glebe, N.S.W., Australia pp34-45.
- 8) Borchert A. (1964). Parasitología Veterinaria. Trad. - a la 3a. Ed. alemana. Ed. Acribia, España. pp40-90.
- 9) Buch J., Superrer R. (1977). Veternärmedizinische para - sitologie. Verlag Paul Parey., Berlin, Hamburg. - pp 35-36.
- 10) Dargie J.D., Holmes P.H., Maclean J.M., Mulligan W. - - (1968). Further studies of the anaemia in fascio - lasis: Simultaneous use of ⁵¹Cr labelled red - - cells and ⁹⁵NB labelled albumin. Vet. Rec., 82: 360-361.

- 11) Darski J. (1969). Variation in egg production of - - Fasciola hepatica in single experimental infections. Wiad Parazyt. 15: 93-96.
- 12) Davis J.W., Anderson R.C. (1973). Enfermedades parasitarias de los mamíferos salvajes. Trad. a la 1a. Ed. en alemán. Ed. Acribia, España. pp276-94.
- 13) Dennis W.R., Stone W.H., Swanson L. E. (1954). A new - laboratory and field diagnostic test for fluke - ova in faeces. J.A.V.M.A., 124: 47-50.
- 14) Diccionario terminológico de ciencias médicas. (1966). 9a. Ed. Salvat Editores, S.A., México p. 433.
- 15) Döbel D. (1963). Vergleichende prüfung von nachweis- methoden für Fasciolasier. Inaugural-Dissertation.
- 16) Dorsman W. (1956). A new technique for counting eggs of Fasciola hepatica in cattle faeces. J. Helminth., 30: 165-172.
- 17) Dukez H.H. (1967). Fisiología de los animales domésticos. Trad. de la 7a. ed. en inglés. 3a.Ed., Ed.- Aguilar, España. pp 382-386.

- 18) Düvel D., Sambeth W., Bosaller W. (1972). On the patho-
genity of Fasciola hepatica in sheep. Parassito-
logia. Istituto di Parassitologia. Citta Universi-
taria, Roma. 14(1): 35-44.
- 19) Emett W.P. Animal diseases. United States Department of
Agriculture. Washington, D.C. pp 206-212.
- 20) Escamilla G.J. (1973). Estudio Nomográfico de Fasciola
hepatica del ganado bovino sacrificado en el ras-
tro de Tuxtla Gutiérrez, Chis. Tes.Lic., F.M.V.Z.
U.N.A.M., México.
- 21) Euzéby J. (1958). Diagnostic expérimental des helmin--
thoses animales. Vigot Frères Editeurs, Paris. -
50-55.
- 22) Gariev B.G. (1970). Reporte de Fasciola indica. Zool. -
Zh., 49(10): 1570-1571. Cit.Biol.Abst. (1971), --
52(11):6254.
- 23) Gerlormini N. (1967). Enfermedades parasitarias en vete-
rinaria. Librería el Ateneo Ed., México. pp. - -
119-126 y 390.

- 24) Gómez F. (1970). Valoración de la intradermo-reacción en el diagnóstico de la Fasciolosis bovina. Tes. Lic., F.M.V.Z. U.N.A.M., México.
- 25) González H.A. (1969). Evaluación de las pérdidas económicas ocasionadas por el decomiso total o parcial de hígados de bovino parasitados con Fasciola hepática en el rastro de Ferrería. Tes.Lic., F.M.V.Z. U.N.A.M., México.
- 26) Grégoire C., Pouplard L., Cotteleer C., Schyns P., Thomas J., Deberdt A (1956). Nouvelle méthode de diagnostic. La dietomatose, Ann. Med. Vet., 100: 294-303.
- 27) Happich F.A., Poray J.C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. I. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic F. hepática infection in sheep. Aust. Vet. J., 45: 326-328.
- 28) Herrera R.D. (1971). Frecuencia de F. hepática en el Centro Nacional para la Educación Investigación y Extensión de la Zootecnia de la U.N.A.M, Tes.

Lic., F.M.V.Z. U.N.A.M., México.

- 29) Hope C., Ruane M. (1970). Modification of the AMS III method of recovering schistosome eggs for use - in the diagnosis of fascioliasis. Lab. Pract., 19 (115): 1025-1027.
- 30) Hope C., Ruane M. (1971). Sedimentation method for the demonstration of the eggs of Fasciola hepatica in faeces. Lab. Pract., 20(12): 935-939, 945.
- 31) Hope C. (1972). Production effects of the liver fluke, F. hepatica, on beef cattle. Vet. Rec., 91:641-643.
- 32) Huertas V.M. (1976). Modificaciones a las técnicas de sedimentación y flotación para el diagnóstico de la fascioliasis. Tes. Lic., F.M.V.Z. U.N.A.M., México.
- 33) Hutyra, Marek, Manninger R., Mocsy J. (1968). Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos. Tomo II. Enfermedades de los órganos. Trad. de la 11a. ed. alemana. 2a. ed., Ed.Labor, España, pp. 303-323.

- 34) Kagan I.G. (1969). Caracterización de antígenos parasitarios. Bol. de la Of. Sanit. Pan , 67(1):13-30.
- 35) Kagan I.G. (1974). Advances in immunodiagnosis of parasitic infections. Z. Parasitenk., 45: 163-195.
- 36) Kagan I.G., Norman L. (1976). Manual of clinical immunology. Serodiagnosis of parasitic diseases. -- Amer. Soc. Micro., pp 392-403.
- 37) Kapp Burzynska, et. al. (1973). Efficacy of selected serological tests in the diagnosis of bovine fasciolosis. II. Comparision of the iodine test and gel diffusion test. Med. Weter., 29(3): 40-43.
Cit. Biol. Abst. (1974), 57(4): 2110.
- 38) Khanbegyan R.A. (1960). New method for the diagnosis of fasciolosis. Veterinarija (Moscow) 37(10): 76-77.
- 39) Koopman S.J. (1966). Comparision of methods of examining bovine faeces for eggs of Fasciola hepatica. -- Tijdsch. Diegneesk., 91: 1341.

- 40) Lapage G. (1957). Parasitología veterinaria. Compañía Editorial Continental, México, pp 236-242.
- 41) Martínez P.R. (1972). Incidencia de Fasciola hepatica en el Municipio de Tierra Blanca, Ver. Tes. Lic. F.M.V.Z. U.N.A.M., México.
- 42) Medway W. et. al. (1973) Patología clínica veterinaria. Trad. de la 1ª. ed. del inglés U.T.E.H.A., México, p 462..
- 43) Meza B.R., Huertas V.M. (1978). Diagnóstico actual de la Fasciolosis. Curso de Actualización: Enfermedades Parasitarias del Ganado Bovino. División - de Estudios Superiores, Depto de Parasitología, F.M.V.Z., U.N.A.M., México, pp. 1-14.
- 44) Muñoz A. (1970). Estudio epizootiológico de la fasciolosis por inmuno-reacción en bovinos en el valle Morelia-Queréndaro. Tes. Lic., F.M.V.Z., U.N.A.M., México.
- 45) Nesemerli L., Hollo F. (1961). Diagnóstico parasitológico veterinario. Trad. a la 1ª. ed. en alemán. Ed. Acribia, España. pp. 27-36.

- 46) Parfitt J.W. (1959). A technique for the examination of helminth eggs and protozoan cysts in faeces from farm animals in Britain. *Lab. Pract.*, 7:353-355.
- 47) Parfitt J.W., Banks A.W. (1970). A method for counting Fasciola hepatica eggs in cattle faeces in the field. *Vet. Rec.*, 87(7): 180-182.
- 48) Quiroz R.H., Herrera R. D., Fernández C.L. (1973). Valoración de la intradermo-reacción en el diagnóstico de la fasciolosis bovina. *Rev. Vet.*, 4(4): - 236-239.
- 49) Quiroz R. H. (1978). Importancia de la fasciolosis subclínica en bovinos. Curso de Actualización: Enfermedades Parasitarias del ganado bovino. División de Estudios Superiores. Depto. de Parasitología F.M.V.Z., U.N.A.M., México, pp 57-76.
- 50) Quiroz R.H. Presencia de Fasciola gigantica en un vena do cola blanca (Odocoileus virginianus) de Toluca, Edo. de México. en prensa.

- 51) Raynaud J.P. (1975). Examen critique et comparaison des techniques coproscopies parasitaires polyvalentes. Rev. Méd. Vét., 126 (8-9): 1139-1158.
- 52) Roseby F. B., B. Rur. Sc. (1970). The effect of Fasciolosis on the wool production of merino sheep. - - Aust. Vet. J., 46: 361-365.
- 53) Runnells R. A., Monlux W.S., Monlux A.W. (1965). Principles of Veterinary Pathology. 7th ed., 2nd rep., the Iowa State Univ. Press, U.S.A. p. 645.
- 54) Sánchez A.A., Herrera D., Barrios Z.D. (1976). Incidencia de la fasciolosis bovina y su valoración económica a partir de hígados decomisados de ganado Holstein nativo de la región, sacrificados en el Rastro de Tulancingo, Hgo. Resúmenes, XIII Reunión Anual, INIP (SARH), México.
- 55) Soulsby E.J.L. (1965). Textbook of veterinary clinical - parasitology Vol. I Ed. Davis F. A. Co., USA p.531.
- 56) Swanson L.E., Hoopper. (1950). Diagnosis of liver fluke infection in cattle. J.A.V.M.A., 117:127-129.

- 57) Taracena F., Quiroz H. (1974). **Prácticas de parasitología veterinaria. Manual, F.M.V.Z., U.N.A.M., México.**
- 58) Taylor E.L. (1965). **Fasciolosis y el distoma hepático. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, (FAO), Roma.**
- 59) Whitlock H.V. (1950). **A technique for counting trematode eggs in sheep faeces. J. Helminth., 24:47-52.**
- 60) Willmoth S., Pesler F.R.N. (1952). **Variations in faecal egg-counts in Paramphistome infections as determined by a new technique. J. Helminth., 26 (2-3): 147-156.**