

Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas

Evaluating a combined method of control of the ovine haemonchosis under controlled conditions

Fabián Leonardo Arroyo Balán^a, Pedro Mendoza de Gives^b, Maria Eugenia López Arellano^b, Enrique Liébano Hernández^b, Víctor Vázquez Prats^b, Estefán Miranda Miranda^b, Ana Maria Ortiz de Montellano Nolasco^c

RESUMEN

Se evaluó un método antiparasitario combinado, mediante el uso de albendazol y del hongo *Duddingtonia flagrans*, en ovinos infectados con *Haemonchus contortus*. El experimento duró 90 días. Se formaron cuatro grupos de 10 corderos cada uno, infectados con *H. contortus* y recibieron los siguientes tratamientos: Grupo 1, albendazol (7.5 mg/kg), a los días 0, 30 y 60 del experimento; Grupo 2, recibió 1×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* por kg, por vía oral; Grupo 3, recibió la combinación de ambos tratamientos y que consistió en dos aplicaciones de albendazol, al día 1 y al día 60, y la administración oral de clamidosporas de *D. flagrans* diariamente del día 30 al 60, con las mismas dosis que los grupos 1 y 2; El Grupo 4, actuó como grupo testigo, sin tratamiento. Durante el experimento, se tomaron muestras de heces semanalmente para estimar el número de huevos por gramo de heces (HPG) y para la recuperación y cuantificación de larvas (L₃) por coprocultivos. El Análisis ANOVA para un modelo de mediciones repetidas, utilizando al promedio del número de larvas en coprocultivos como la variable dependiente, reveló que el albendazol tuvo una alta eficacia antihelmíntica en contra de *H. contortus* del 91 %, ($P < 0.05$); y que los tratamientos biológico y combinado mostraron reducciones promedio del 69 y 79 %, respectivamente, mostrando diferencia estadística en los tres grupos, con respecto al testigo. El método combinado es una alternativa promisoriosa en contra de la hemoncosis ovina.

PALABRAS CLAVE: Albendazol, *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*, Ovinos.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the efficacy of a combined method of parasitic control, with albendazol and *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in *Haemonchus contortus* artificially infected sheep. Forty *H. contortus* infected sheep, were used. This experiment was carried out in a 90 d period. Sheep were randomly divided into four groups of 10 animals each and received the following treatments: Group 1, albendazol at 7.5 mg/kg at d 0, 30 and 60; Group 2, received an oral treatment with 1×10^6 *D. flagrans* chlamydospores per kilogram; Group 3 received a combined treatment: albendazol was orally administered twice, at d 1 and 60 at the previously mentioned dose, and was also orally treated with *D. flagrans* chlamydospores everyday from d 30 to d 60 at the same dose than group 2; Group 4 (control group). Faecal samples were directly taken from rectum of sheep everyday during 90 days and the number of eggs per grams of feces (EPG) and the recovery and quantification of *H. contortus* larvae from coprocultures, were carried out. An ANOVA for a repeated measurements model was used ($P < 0.05$). Results showed a high anthelmintic efficacy (91 %) for albendazol; meanwhile, the biological and the combined methods resulted in 69 and 79 % larval reduction in fecal cultures; respectively and the three groups showed statistic differences with respect to the control group. The combined method using albendazol and *D. flagrans* chlamydospores is a promissory alternative against the ovine haemonchosis.

KEY WORDS: Albendazol, *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*, Sheep.

Recibido el 28 de noviembre de 2006. Aceptado para su publicación el 28 de diciembre de 2007.

^a Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Agropecuarias.

^b Unidad de Helminología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Km. 11.5 Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla. 62550 Jiutepec, Morelos. Pedromdvides@yahoo.com. Correspondencia al segundo autor.

^c Instituto Tecnológico de Chiná. Chiná, Campeche.

En las últimas décadas, la utilización de nuevas estrategias de control de las parasitosis gastrointestinales está siendo explorada⁽¹⁾. Las grandes desventajas del uso de productos químicos como los elevados costos, la presencia de resistencia antihelmíntica⁽²⁾ y su posible efecto nocivo para el medio ambiente, tiende a disminuir considerablemente en las próximas décadas al prescindir de dichos compuestos. Existe una enorme biodiversidad en el suelo compartiendo el mismo hábitat, lo que resulta en el establecimiento de importantes interrelaciones biológicas entre individuos de diferentes especies⁽³⁾. Así tenemos que algunas poblaciones se favorecen con la presencia de otros individuos, ya sea utilizándolas como una fuente directa de nutrientes, o a través de metabolitos o sustancias producidas por otros individuos que de alguna manera promueven su desarrollo. Otros organismos, en cambio, se ven afectados por individuos de otras poblaciones que pueden ser depredadores, o simplemente actúan como agentes de competencia nutricional por el mismo sustrato.

La utilización de microorganismos antagónicos naturales en el control de las parasitosis del ganado es una alternativa que en años recientes ha despertado un gran interés en la investigación en diversos países, cuyo reto es ahora, demostrar que esta metodología en forma alternada con algún antihelmíntico de uso común como el albendazol usado en forma racional, puede ser aplicada exitosamente a nivel de campo con los beneficios sobre los costos de producción, disminuyendo el uso del producto químico y como consecuencia sus desventajas, y sobre todo, evitando el deterioro ambiental que muchos productos químicos causan.

Los hongos nematófagos, son microorganismos del suelo que poseen la capacidad para desarrollar órganos especializados para capturar y destruir a los nematodos para finalmente nutrirse de sus tejidos⁽⁴⁾. Los principales órganos de captura que se observan en diferentes géneros y especies de hongos nematófagos incluyen: anillos simples y constrictores, anillos tri-dimensionales, ramas y conidias adhesivas. Los hongos pueden ser producidos en el laboratorio en medios nutritivos

In recent decades, the use of new gastrointestinal parasite control strategies is being explored⁽¹⁾. The disadvantages associated with the use of antiparasitic chemical drugs (i.e.: high costs, resistance development⁽²⁾, potential noxious effect on the environment) are likely to result in a decreased or no use of such drugs in the decades to come. Enormous biodiversity exists in the soil, with live beings sharing the same habitat. Individuals of different species are strongly biologically interrelated⁽³⁾. This way, some populations are benefited by the presence of other individuals either using them directly as a nutrient source, or through resulting metabolites which somehow can promote their development. On the other hand, some organisms are adversely affected by other populations that can either be predators or simply compete for nutrients in the same substrate.

Using natural antagonistic organisms has recently attracted the interest of researchers in different countries as an alternative for the control of livestock parasites. We are committed to show that alternating this methodology with the rational use of common anthelmintics such as albendazole can successfully result in decreased production costs, reduced drug usage, and prevent the environmental deterioration caused by chemicals in the field.

Nematophagous fungi exist in the soil and have the ability of developing organs specialized in catching and destroying the nematodes, using their tissues as a nutrient source⁽⁴⁾. The major nematode-catching organs found in different genera and species of nematophagous fungi include simple rings, constrictor rings, three-dimensional (3D) rings, branches, and adhesive conidia. Fungi can be grown in the laboratory using culture media, resulting in a fungal inoculum which can be prepared as an aqueous suspension. *Duddingtonia flagrans* has yielded the best results in the control of ruminant parasites. This specie produces a large amount of digestive process-resistant chlamydiospores which, once given to the animal, they are excreted with the feces to the environment, therefore acting *in situ* on the soil and exerting their nematode-predator effect^(5,6) Recent studies in Mexico, have found that after given to the animals, *D. flagrans*

para producir un inóculo fungal que puede ser preparado en forma de suspensión acuosa. La especie que ha producido mejores resultados en el control de parásitos de rumiantes es *Duddingtonia flagrans*; esta especie, produce una gran cantidad de clamidosporas resistentes a los procesos digestivos, y una vez que han sido administradas en los animales, son finalmente eliminadas al ambiente junto con las heces, desarrollando *in situ* y ejerciendo su efecto depredador de nematodos^(5,6). Estudios recientes llevados a cabo en México, en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, han evaluado el uso de clamidosporas del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans*, y se ha reportado que éstas al ser administradas en los animales y después de pasar a través del tracto gastrointestinal y ser eliminadas al medio ambiente, colonizan la materia fecal capturando y destruyendo a la población de larvas de nematodos *in situ*^(5,7), rompiendo el ciclo biológico de estos parásitos e impidiendo la diseminación de larvas infectantes en los potreros, y finalmente disminuyendo considerablemente las cargas parasitarias en los animales^(8,9). Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización alternada de *D. flagrans* y albendazol de uso comercial, en la reducción de la población de larvas infectantes de *H. contortus* en cultivos fecales de corderos experimentalmente infectados con el parásito.

El trabajo fue realizado en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), perteneciente INIFAP, situado en Jiutepec, Morelos, México. Se utilizaron 40 ovinos entre machos y hembras de la raza Pelibuey/Kathadin de 2 a 4 meses de edad, procedentes de una granja ovina en Tepoztlán, Mor., con pesos aproximados de 18 kg. Se realizó un estudio coproparasitológico al llegar los animales al Instituto, para verificar que estuvieran libres de parásitos. Todos los animales se infectaron cuatro veces en forma experimental con una dosis inicial de 350 larvas infectantes (L₃) de *H. contortus* y tres re-infecciones de 175 L₃ de *H. contortus* por kilogramos de peso vivo, cada 30 días a partir del inicio del experimento. La presencia de la infección en los animales se comprobó mediante la realización de exámenes copropara-

chlamydiospores pass through the gastrointestinal tract to the environment, colonize the fecal material, catch and destroy nematode larval populations *in situ*^(5,7), thus disrupting the biological cycle of these parasites and preventing infectant larval dissemination in the grasslands, with the final result of considerably decreasing the parasite loads in the animals^(8,9). The purpose of this research was to evaluate the alternate use of *D. flagrans* and albendazole to decrease the population of infective *H. contortus* larvae in fecal cultures from experimentally-infected lambs.

The study was conducted at CENID-PAVET, INIFAP, Jiutepec city, State of Morelos, Mexico. Forty short haired Pelibuey/Kathadin, 2-4-mo-old sheep, both males and females from a farm in Tepoztlán, Morelos, and weighing ~ 18 kg were used. Coprological analyses were performed in all animals at arrival, in order to assure that they were free of parasites. All sheep were experimentally infected four times with an initial dose of 350 *H. contortus* infective larvae (L₃), followed by three further infections using 175 L₃ *H. contortus* per kilogram weight at 30-d intervals from experiment start. Additional coprological analyses were performed to verify the infection. In this confined study, *H. contortus* was used as a model, since this nematode is considered as a major parasite due to its high pathogenicity. Sheep were randomly allocated into four groups of 10 animals each (T groups) and they were housed in separate pens (T1-T4). All animals were fed an alfalfa hay/concentrate-based ration. Feed and water were available *ad libitum* throughout the experiment.

Four weeks after infection, coprological analyses showed that all animals had heavy parasitic loads (mean=10,000 *H. contortus* eggs per gram of faeces [epg]) then all groups were treated as shown in Table 1. The experiment lasted 90 d after treatment.

After treatment, 12 weekly fecal samples were collected directly from the rectum for egg counts, and then incubated for 15 d for larval counts.

The following equation was used to determine epg/larval percentage reductions⁽¹⁰⁾:

Cuadro 1. Diseño experimental

Table 1. Experimental design

Group	Treatment	Control method	Dose rate	Periodicity
T1	Chemical	Albendazole	7.5 mg / kg live weight	One dose per month
T2	Biological control	<i>D. flagrans</i> (aqueous suspension)	1x10 ⁶ Chlamydozoospores per kg live weight	Daily dose for 3 mo
T3	Combination Chemical + Biological control	Albendazole + <i>D. flagrans</i>	7.5 mg / kg live weight + (1x10 ⁶ chlamydozoospores) per kg live weight	One dose mo 1 and 3 + Daily dose throughout mo 2
T4	Control	No treatment	- - -	- - -

sitoscópicos. En este experimento en condiciones de confinamiento, se utilizó *H. contortus* como modelo de estudio, debido a que este nematodo es considerado como uno de los de mayor importancia por su patogenicidad. Se formaron cuatro grupos de diez animales cada uno en forma aleatoria y se confinaron en corrales individuales por grupos, designándoseles un número del 1 al 4. Todos los animales recibieron alimentación a base de alfalfa achicalada, alimento concentrado y agua *ad-libitum*, durante todo el experimento. Los grupos de animales recibieron un tratamiento como se indica en el Cuadro 1.

Los tratamientos, fueron aplicados cuando se verificó que todos los animales se encontraban positivos a la hemoncosis; esto se comprobó realizando exámenes coproparasitoscópicos. A partir de que todos los animales se encontraban con altas cargas parasitarias con un promedio de 10 mil HPG:

$$\% \text{ Reduction} = \frac{X_c - X_t}{X_c} \times 100$$

Where: Xc = average larval (or egg) numbers recovered from fecal cultures (or Mc Master's counts) in the controls; Xt = average larval (or egg) numbers recovered from fecal cultures (or Mc Master's counts) in the treated group.

Results were analyzed using the General Linear Model (GLM) ANOVA procedure for a repeated measurement model⁽¹¹⁾. Treatment groups were compared using the SIDAK multiple comparison test.

Results (egg and larval counts) are shown in Table 2. The highest numbers were found in both the control group (T4, 3,646 ± 512 epg; 132.6 ± 33.09 larvae) and the biological control group (T2, 4,615 ± 567 epg; 41.2 ± 8.50 larvae), while the lowest counts were found in the chemical group (T1, 216 ± 32 epg; 11.8 ± 2.17 larvae) and the

Cuadro 2. Promedios y errores estándar del número de huevos por gramo de heces (HPG) y de larvas obtenidas a partir de cultivos fecales (Larvas)

Table 2. Average and standard errors of *Haemonchus contortus* eggs per gram (epg) of feces and larval counts from fecal cultures

Variables	Treatment groups			
	T1 Chemical	T2 Biological control	T3 Combination	T4 Controls
epg	216.6 ± 32.9	4615.4 ± 567.3	980.3 ± 284.5	3646.76 ± 512.40
larval counts	11.8 ± 2.17	41.2 ± 8.50	28.3 ± 6.88	132.6 ± 33.09

hecho que ocurrió a la 4ª semana pos-infección; se procedió a dar inicio a los tratamientos descritos anteriormente; la duración del experimento fue de 90 días post-tratamiento.

Los muestreos consistieron en la toma de muestras de heces recolectadas directamente del recto para determinar el número de huevos por gramos de heces (HPG), y para la realización de cultivos fecales que se incubaron durante 15 días para obtener y cuantificar el número de larvas en los diferentes tratamientos. Se llevó a cabo un registro de estos parámetros durante 12 muestreos semanales a partir del inicio de los tratamientos.

Para obtener los porcentajes de reducción del HPG y de la población larvaria en cultivos fecales se llevó a cabo la siguiente fórmula⁽¹⁰⁾:

$$\% \text{ Reducción} = \frac{X_c - X_t}{X_c} \times 100$$

Donde: X_c = Número promedio de larvas (o huevos) recuperados a partir de cultivos fecales (o Mc Master) en el grupo Testigo; X_t = Número promedio de larvas (o huevos) recuperados a partir de cultivos fecales (o Mc Master) en el grupo Tratado.

Los resultados fueron analizados por el procedimiento General Linear Model (GLM), ANOVA para un modelo de mediciones repetidas⁽¹¹⁾ y la comparación de tratamientos se realizó con la prueba de comparación múltiple de SIDAK.

Los resultados del presente estudio en relación a las variables: huevos por gramo de heces (HPG) y

combination group (T3, 980 ± 284 epg; 28.3 ± 6.88 larvae).

No epg statistically-significant differences ($P < 0.05$) were found between the chemical (T1) and the combination (T3) groups. Likewise, no epg differences were observed between the controls (T4) and the biological controls (T2). Regarding larval counts, no statistical differences ($P < 0.05$) were found between the 3 treated groups (T1, T2, T3) and the controls (T4).

Percent reductions in both epg and larval counts in all four treatment groups are shown in Table 3. Epg reductions of 94 and 73 % can be seen in T1 and T3, respectively, as compared to the controls, while no reduction was found in the biological controls (T2). Larval count reductions were 91, 69 and 79 % for the chemical (T1), biological control (T2), and combination (T3) groups, respectively, as compared to the controls (T4).

Results in this study show that the drug treatment (T1) had the highest efficiency in terms of decreasing egg counts. Nevertheless, no difference was found in larval counts among treatments, in agreement with results obtained elsewhere⁽¹²⁾. Efficacy of the anthelmintic drug was 94 %, which is within acceptable limits⁽¹³⁾. The biological control had no effect on percentage epg reduction, consistent with other findings⁽⁶⁾, since this method is not intended for adult parasite control inside the animals. Its effect is only limited to catching, destroying and eating nematode larvae in the feces.

Cuadro 3. Porcentajes de reducción del número de huevos por gramo de heces y de larvas obtenidas a partir de cultivos fecales

Table 3. Reduction percent of *Haemonchus contortus* eggs per gram (epg) of feces and larval counts from fecal cultures

Variables	Groups			
	T1 Chemical	T2 Biological control	T3 Combination	T4 Control
epg	94	0	73	- - -
larval counts	91	69	79	- - -

($P < 0.05$)

número de larvas (Larvas), se muestran en el Cuadro 2, donde los valores más altos del promedio de HPG correspondieron tanto al grupo Testigo con 3646 ± 512 , como al grupo de Control biológico 4615 ± 567 , siendo los más bajos el grupo Químico con 216 ± 32 y Combinado con 980 ± 284 . De la misma manera los mayores promedios observados en cuanto a la variable Larvas correspondieron a los grupos Control Biológico y Testigo con valores de 41.2 ± 8.50 y 132.6 ± 33.09 , respectivamente; y los menores promedios se encontraron en los grupos Químico y Combinado con valores de 11.8 ± 2.17 y 28.3 ± 6.88 respectivamente.

Los resultados del HPG mostraron que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos Químico y Combinado; de igual forma tampoco se observaron diferencias entre el grupo de Control Biológico con respecto al grupo Testigo. A lo que se refiere a larvas, el análisis determinó que los tres grupos tratados resultaron diferentes al grupo Testigo ($P < 0.05$).

Los porcentajes de reducción de HPG y Larvas en los cuatro tratamientos se muestran en el Cuadro 3, donde se observa una reducción del 94 y 73 %, respectivamente, con respecto al grupo Testigo, mientras que en el grupo correspondiente al Control Biológico no se observó ninguna reducción. Los resultados de la reducción de la población larval en los cultivos fecales por acción de los diferentes tratamientos mostraron reducciones del 91, 69 y 79 % para los grupos Químico, Control Biológico y Combinado con respecto al grupo Testigo.

Los resultados del presente estudio muestran que el grupo Químico fue el que tuvo la mayor eficiencia en cuanto a la disminución de HPG; sin embargo, sobre el número de larvas no se encontró diferencia entre los tratamientos, lo que concuerda con lo encontrado en otros estudios⁽¹²⁾. La eficiencia que se obtuvo con el antihelmíntico fue de una reducción del 94 % de HPG, lo cual está en los límites aceptables⁽¹³⁾. La utilización del control Biológico no tuvo efecto sobre el porcentaje de reducción de HPG, lo que concuerda con lo encontrado⁽⁶⁾, ya que este método no está dirigido hacia un control de los parásitos adultos dentro de los animales;

So far, the use of nematophagous fungi seems to be a good alternative to chemical anthelmintics with the advantage of being totally innocuous for plants, animals and humans. They also have a beneficial effect on the environment due to decreased drug usage. Nematophagous fungi are an invaluable tool for the biological control of gastrointestinal parasites in ruminants.

The results of this research show that using *D. flagrans* in combination with a conventional anthelmintic can have a beneficial effect in decreasing *H. contortus* larval populations in nearly 80 % in sheep feces, thus decreasing the number of chemical treatments and retarding resistance development.

The combined use of albendazole and chlamydo spores of the nematophagous fungus *D. flagrans* in the control of ovine haemonchosis successfully decreases the population of *H. contortus* infectant larvae in artificially-infected sheep held in confinement. Additional studies to evaluate the combination of biological control with other non-drug methodologies can enlighten us with viable alternatives for the reduction of anthelmintic resistance while obtaining the benefits of biological control not only in terms of decreased costs, but also to promote a more sustainable livestock production.

End of english version

sino que su efecto se limita exclusivamente a capturar, destruir y alimentarse de las fases larvales de los nematodos en las heces.

La utilización de hongos nematófagos hasta ahora parece ser una buena alternativa al uso de los antihelmínticos de naturaleza química con la ventaja de ser totalmente inocuos para plantas, animales y el hombre y su impacto sobre el medioambiente al reducir el uso de antihelmínticos de naturaleza química los convierten en una invaluable herramienta de control biológico de las parasitosis gastrointestinales en rumiantes.

MÉTODO DE CONTROL DE LA HEMONCOSIS OVINA

Los resultados de la presente investigación muestran que la utilización de *Duddingtonia flagrans* en forma combinada con un antihelmíntico convencional puede lograr un efecto benéfico reduciendo la población larvaria de *Haemonchus contortus*, en casi un 80 %, en heces de ovinos y disminuyendo el número de tratamientos químicos, retardando la aparición de resistencia antihelmíntica.

El uso combinado de un método de control con Albendazol y clamidosporas del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans*, en el control de la hemoncosis ovina reduce eficazmente la población de larvas infectantes *H. contortus*, de ovinos en confinamiento infectados artificialmente. Otros estudios en los que se evalúe la combinación del uso del control biológico junto con otras metodologías diferentes al empleo de un antihelmíntico comercial, pueden también proveer de una alternativa viable para reducir la resistencia antihelmíntica y obtener los beneficios del control biológico, no sólo en el aspecto de costos, sino que en pro de una producción sustentable.

LITERATURA CITADA

1. Waller WP. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *Internat J Parasitol* 1999;29:155-164.
2. Köler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Internat J Parasitol* 2001;31:336-345.
3. Tribe HT. Prospects for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Parasitology* 1980;81:619-639.
4. Duddington CL. Fungi that attack microscopic animals. *Botanical Review* 1955;21:377-439.
5. Mendoza de Gives P, Flores Crespo J, Herrera Rodriguez D, Vazquez Prats V, Liébano Hernandez E, Ontiveros Fernandez GE. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores to sheep. *J Helminthol* 1998;72:343-347.
6. Ojeda-Robertos N, Mendoza de Gives P, Torres Acosta JF, Rodriguez Vivas RI, Aguilar-Caballero AJ. Evaluating the effectiveness of a Mexican Strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *J Helminthol* 2005;118:61-69.
7. Llerandi-Juarez JRD, Mendoza-de Gives P. Resistance of nematophagous fungi chlamydo spores to the digestive processes of sheep in México. *J Helminthol* 1998;72:155-158.
8. Waller WP, Faedo M. The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. *Internat J Parasitol* 1996;26:915-925.
9. Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology* 2000;120:S121-S131.
10. Mendoza de Gives P, Davies KG, Clark S, Benke JM. Predatory behavior of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology* 1999;119:95-104.
11. Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) para Windows, versión 10.0.7 en español (Software de computadora). 2000 Chicago, EEUU. SPSS Inc.
12. Paraud C, Pors I, Chartier C. Activity of *Duddingtonia flagrans* on *Trichostrongylus colubriformis* larvae in goat feces and interaction with a benzimidazole treatment. *Small Rum Res* 2004;55:199-207.
13. Bowman DD, Lynn RC. *Georgis Parasitología para veterinarios*. Octava ed. Madrid, España: Editorial Elsevier; 2004.