



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESPECIALIDAD EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO
TRABAJO FINAL INTEGRADOR

TÍTULO: TÉCNICA DE INMUNOFLORESCENCIA PARA IDENTIFICACIÓN DE HUEVOS DEL GÉNERO *HAEMONCHUS* OVINOS.

ALUMNA: CERUTTI JULIETA

DIRECTOR: Dr. SANABRIA RODRIGO

CODIRECTOR: Dr., MSc, ANZIANI OSCAR S

FECHA: 8 de ABRIL de 2017

ÍNDICE

A) INTRODUCCIÓN.....	Pág. 3
B) PLANTEAMIENTO DE TEMA/PROBLEMA.....	Pág. 5
C) DESARROLLO.....	Pág. 6
D) DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	Pág. 8
E) BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 16

A) INTRODUCCIÓN

Los trichostrongíldeos son nematodos del tracto digestivo de los rumiantes, lagomorfos, aves, ungulados y roedores. Dentro de la superfamilia *Trichostrongyloidea*, se encuentran los nematodos del abomaso e intestinos de los rumiantes, productores de las gastroenteritis verminosas, siendo los parásitos internos más comunes e importantes que afectan a los animales de producción. El ciclo evolutivo de los mismos es directo y comprende una fase de vida parasitaria y una de vida libre influenciada por las condiciones medioambientales. El animal parasitado aloja los nematodos adultos en el tracto gastrointestinal, donde machos y hembras copulan y dan comienzo a la oviposición, los huevos son eliminados con las heces y en el ambiente con temperaturas óptimas (22 a 25°C) y porcentajes de humedad entre 80-90% se desarrolla la fase larvaria hasta el tercer estadio (L3), con una duración de 12 a 15 días. Las L3 migran y se dispersan en la pastura gracias a la acción de las lluvias, éstas son infectivas para un nuevo hospedador y una vez ingerida en rumen o abomaso pierden la vaina que las protege y continúan su desarrollo hasta llegar a adultos.

Entre los parásitos mencionados, los miembros del género *Haemonchus* se encuentran en el abomaso de rumiantes y tienen un tamaño que oscila entre 10 y 30 mm según la especie (Figura 1). En el extremo anterior del gusano se encuentra la cápsula bucal, armada con una lanceta que le permite alimentarse de sangre del hospedador, prevalece en climas cálidos, limitando su desarrollo ambiental con menos de 11°C de temperatura media; en áreas con condiciones frías en forma permanente o durante un período del año, no es posible el establecimiento de estos géneros parasitarios o la presentación de los mismos es estacional (Romero y Boero, 2001). Son parásitos de alto poder biótico, una hembra puede eliminar al ambiente 5.000 a 10.000 huevos diariamente con la materia fecal del huésped (Giudici y col., 2013). Las poblaciones de *Haemonchus contortus* adquiridas por infección natural pueden llegar a extraer a diario hasta una quinta parte del volumen eritrocitario de los corderos; si la velocidad de pérdida de sangre supera la capacidad hematopoyética del hospedador, la anemia progresiva acaba siendo rápidamente mortal (Bowman, 2004).

La patogenicidad del género y el alto poder biótico, conlleva a una alta infectividad de las pasturas con elevado ofrecimiento larvario, por lo que el control depende de la aplicación masiva a todo el grupo animal de drogas antihelmínticas.

Durante los últimos 40 años y al igual que en la mayor parte del mundo, esta tecnología de insumos, favorecida por su practicidad y alta eficacia, ha sido ampliamente adoptada por los productores de todo el país (Anziani y Guglielmone, 2007). Sin embargo, la emergencia y rápida dispersión de parásitos resistentes a los antihelmínticos, representa un problema mundial para los sistemas pastoriles de rumiantes.

Es entonces, que para evitar el uso indiscriminado de los mismos, se pretende profundizar la búsqueda de algunos parámetros clínicos que ayuden a seleccionar animales parasitados y sólo de esta forma realizarles tratamientos a ellos y no a la totalidad de los mismos; por ejemplo en pequeños rumiantes el grado de anemia producido por la especie *H. contortus* puede medirse observando la mucosa

conjuntival de los animales, utilizando una cartilla denominada FAMACHA, desarrollada a inicios de la década de los noventa por investigadores africanos (Bathy col., 1996). La cartilla originariamente se desarrolló para la especie ovina pero también se aplica a explotaciones caprinas ante la necesidad de establecer sistemas más eficientes de control y manejo (Suarez y col., 2014). El método permite realizar tratamientos selectivos a los animales más afectados y a su vez, en forma indirecta, realizar una selección de individuos resistentes a esta patología, reduciendo el uso de los antiparasitarios. En la Provincia de Córdoba, un estudio realizado en el año 2010-2011 de 16 majadas situadas en el norte de la provincia, en los departamentos de Ischilín, Sobremonte, Río Seco y Tulumba revelaron resistencia a las drogas más comúnmente utilizadas para el control de éstas parasitosis, como son la ivermectina y bencimidazoles (febendazole). De las larvas recuperadas a través de cultivo, entre el 82 % y el 98 % de ellas pertenecieron al género *Haemonchus* y el resto a *Trichostrongylus* spp. (Caffe, 2013).

Existen diferencias sutiles en la morfología de los huevos de los parásitos que producen las gastroenteritis verminosas y a excepción de *Nematodirus* spp., es imposible diferenciar género y especie; pero los huevos en sus superficies están cubiertos por diferentes azúcares que hacen posible determinar los géneros específicos ya que se pueden unir a distintas moléculas marcadas con colorantes fluorescentes y al observarlos en un microscopio con fuente de luz ultravioleta, éstos remiten color y nos permiten su clasificación.

Las moléculas comúnmente utilizadas son lectinas, proteínas que tienen gran afinidad a los carbohidratos de la superficie de los huevos, provenientes mayoritariamente de plantas y se han testeado numerosas que producen reacción con distintos géneros parasitarios. Desde los últimos diez años, se describen trabajos que evidencian dicha unión a través de fluorescencia (Colditz y col., 2002; Hillrich y col., 2012; Umair y col., 2016); particularmente con la especie *H. contortus* y la afinidad de sus monosacáridos con una aglutinina específica derivada del maní (PNA) que sólo se une a dicho parásito (Palmer y McCombe, 1996; Jurasek y col., 2010).

Sin embargo, actualmente, el diagnóstico más utilizado de estas parasitosis sigue siendo el conteo de huevos de los parásitos por gramo de materia fecal (hpg) y la técnica tradicional de cultivo de las heces para obtener las L3 y clasificarlas de acuerdo a sus características morfológicas. Este proceso requiere de tiempo y de entrenamiento específico del operador, existiendo también diferencias en el desarrollo de las distintas especies de parásitos en los cultivos, lo que a veces llevaría a diagnósticos erróneos (Colditz y col., 2002).

El objetivo de este trabajo es validar una técnica basada en una Inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando una aglutinina proveniente del maní marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC labeled peanut – (PNA)) para diagnosticar de manera rápida parasitosis gastrointestinales en rumiantes, específicamente para *H. contortus* en la especie ovina; y realizar una comparación de los resultados con la técnica tradicional.

Así mismo, se pretende sentar un precedente para otros estudios que, *a posteriori*, permitan la identificación de otros géneros y especies.

B) PLANTEAMIENTO DE TEMA/PROBLEMA

Las infecciones de parásitos gastrointestinales de ovinos generalmente son mixtas y antes de llevar a cabo un adecuado tratamiento o estrategia de control es necesario un diagnóstico de la etiología. Las metodologías actuales para el diagnóstico se basan en el cultivo de la materia fecal durante 10 a 12 días, seguido de la clasificación de 100 larvas por características morfológicas.

Dichos cultivos presentan algunos inconvenientes, por ejemplo, la diferente supervivencia de las especies de larvas (Dobson y col., 1992) y la competencia entre ellas durante el mismo (Wooster, 1987). Además de las cuestiones inherentes al cultivo fecal, debe recordarse el retardo que implica el mismo y la subjetividad en la clasificación taxonómica de las L3, algunas veces con poca concordancia entre los operadores. Durante ese lapso sigue habiendo cambios de importancia económica en la morbilidad y la productividad de los animales infectados.

Debido a lo expuesto anteriormente, sumado a la patogenicidad, a la prevalencia y abundancia de *H. contortus* en la región, es que se busca un método de diagnóstico que clasifique las especies o géneros de los huevos en las heces. Esto podría presentar ventajas de una mayor velocidad de diagnóstico y, potencialmente, una mayor precisión que los métodos actuales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Validar una técnica de IFD para la identificación de huevos del género *Haemonchus* en ovinos.

Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de huevos del género *Haemonchus* que emiten fluorescencia al observarlos en el microscopio óptico de luz ultravioleta.
- Realizar la técnica de cultivo larvario tradicional y determinar el porcentaje de larvas pertenecientes al género *Haemonchus*.
- Comparar resultados obtenidos en ambas técnicas diagnósticas.
- Evaluar ventajas y desventajas de los dos métodos de diagnóstico.

HIPÓTESIS

La técnica de IFD para la identificación de parasitosis gastrointestinales producidas por el género *Haemonchus* facilita la rapidez en el diagnóstico y sus resultados son comparables con la técnica de cultivo larvario tradicional.

C) DESARROLLO

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Quince corderos de 6 meses de edad situados en la EEA INTA RAFAELA, naturalmente infectados con nematodos gastrointestinales.

PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

Se realizaron conteos en cámara de huevos por gramo a través de técnica de Mc Master modificada (Robert y O 'Sullivan, 1949) (Figura 2), y se agrupó la materia fecal proveniente del total de los animales en 5 pools. A cada pool se le realizaron 3 repeticiones (designadas como A, B y C) de la técnica de inmunofluorescencia y un coprocultivo.

Paralelamente se procesó una muestra de materia fecal de bovinos, parasitados con otros géneros distintos a *Haemonchus* que se utilizó como control negativo.

➤ TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA. (Figuras 3 a 6)

La técnica desarrollada en el presente trabajo consiste en una modificación a la descrita por Palmer y McCombe (1996), donde utiliza la aglutinina derivada del maní para la identificación rápida de huevos de *H. contortus* en ovejas. Más tarde el autor realizó algunas modificaciones a la técnica (comunicación personal), tal como se describe a continuación:

Se maceraron 2 gramos de materia fecal en 5 ml de agua corriente. Dicho macerado se filtró por cuatro tamices de distintas aberturas de malla (1000 µm, 149 µm, 88 µm y 37 µm). Los huevos se recuperaron en el último tamiz y se trasvasaron con solución sobresaturada de cloruro de sodio a un tubo de 50 ml para luego colocarlos en un frasco de cultivo celular y realizar la incubación del mismo durante 60 minutos en heladera. Transcurrido el tiempo se eliminó el líquido y se agregó 1 ml de PBS al frasco para agitar vigorosamente y recolectar todos los huevos adheridos de la pared del tubo y trasvasarlo a uno de 1,5 ml.

Al material recuperado se le agregó solución de formol al 5% para su conservación. Luego se centrifugó 5 minutos a 1350 rpm y se removió el sobrenadante hasta dejar 250 µl.

Para marcar los huevos con el conjugado, se agregó al material 5 µl de lectina marcada (FITC labeled peanut, o PNA lectin, Sigma Aldrich, USA), quedando en una dilución 1:50, y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad 45 a 60 minutos mezclando regularmente. Se completó con PBS hasta llegar a un volumen de 1,5 ml y se mezcló por inversión, luego se centrifugó durante 5 minutos a 1350 rpm y se eliminó el sobrenadante para posterior observación del sedimento.

Por cada muestra se examinaron 100 huevos marcados en un microscopio de luz transmitida y fluorescencia marca Carl Zeiss modelo Axiostar Plus, procediendo al recuento de aquellos que emitieron fluorescencia. Solo se contabilizaron los huevos que emitían fluorescencia en toda su superficie y resaltada en su contorno (Umair, 2016).

➤ TÉCNICA DE CULTIVO Y RECUPERACIÓN DE LARVAS (Henriksen y Korsholm, 1983)

Se colocó la materia fecal proveniente de los distintos pooles en recipientes plásticos con cámara húmeda y se mantuvieron en cultivo a 25°C durante 12 a 15 días (Figura 7). Luego de recuperar las larvas se las identificó morfológicamente por microscopía óptica, mediante las claves de Van Wyk y Mayhew (2013).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los conteos de huevos de *Haemonchus* por IFD, y los recuentos de larvas obtenidas por coprocultivo fueron expresados en porcentaje. Se estableció la correlación entre ambos métodos mediante el coeficiente de correlación de Pearson, luego de una simulación de 1000 repeticiones por el método bootstrap (Efron, 1979). Luego, tomando las primeras 100 muestras del modelo simulado (IFD y su correspondiente coprocultivo), se construyó una curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve), a fin de determinar la exactitud diagnóstica del método. Para ello, se utilizaron los resultados de coprocultivos como variable clasificatoria, determinando éstos como “positivos” cuando el porcentaje de L3 de *Haemonchus* fue superior al 90%, en tanto los valores de IFD fueron tomados como variable dependiente. Los datos fueron analizados a través del programa estadístico IBM SPSS ver 22.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la técnica de inmunofluorescencia mostraron en todos los pooles y en las respectivas repeticiones (A, B y C), en promedio un 89% (Rango: 80 – 98%) de fluorescencia, lo cual indica pertenencia al género *Haemonchus* (Tabla 1) (Figuras 8, 9 y 10).

Con respecto a los coprocultivos todos los pooles evidenciaron más del 90% larvas pertenecientes al género *Haemonchus* (Figura 11) siendo las restantes del género *Trichostrongylus* (Tabla 2).

Al analizar la correlación de Pearson, se obtuvo un coeficiente de $r = 0,16$ ($p = 0,57$); luego de aplicar el modelo bootstrap se obtuvo un $r = 0,11$ ($p < 0,001$).

El análisis ROC arrojó un área bajo la curva (AUC) (error estándar), de 0,606 (0,057), para la mejor combinación de sensibilidad y especificidad, lo cual implica que, para este caso, existe un 60% de probabilidad, para la técnica de inmunofluorescencia de clasificar correctamente el diagnóstico realizado con la técnica de coprocultivo.

Las muestras procedentes de bovinos procesadas como controles negativos, no evidenciaron huevos fluorescentes y en el coprocultivo no se encontraron L3 de *Haemonchus* spp.

TABLA 1. HPG promedio de pooles (n=3 muestras por pool) y porcentajes de huevos fluorescentes en las distintas repeticiones (A,B y C) de la técnica de inmunofluorescencia.

IDENTIFICACIÓN (POOL)	HPG PROMEDIO	PORCENTAJE DE HUEVOS FLUORESCENTES		
		A	B	C
1	413	80	90	90
2	450	80	86	90
3	430	85	94	98
4	473	90	85	90
5	493	96	90	86

TABLA 2. Porcentaje de larvas recuperadas en coprocultivos de los distintos pooles.

IDENTIFICACIÓN (POOL)	<i>Haemonchus</i> spp.(%)	<i>Trichostrongylus</i> spp.(%)
1	90	10
2	95	5
3	95	5
4	95	5
5	94	6

D) DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La técnica de inmunofluorescencia empleada permitió efectivamente la detección de huevos del género *Haemonchus* utilizando la aglutinina derivada del maní marcada con isotiocianato de fluoresceína. Estos resultados son compatibles con autores como Palmer y McCombe (1996) quienes probaron varias lectinas y observaron que la aglutinina del maní fue la que mejor resultados ofreció en cuanto a especificidad con respecto a éste género parasitario, permitiendo así su diferenciación con el resto.

Jurasek y col.(2010), obtuvieron correlaciones finales positivas en muestras obtenidas en sus ensayos ($R^2= 0.72$, $p<0,001$), al mismo tiempo demostraron la pequeña variabilidad de resultados en operadores que leen la misma muestra. Solo en pocas muestras obtuvieron correlaciones bajas, al comparar el coprocultivo con la técnica de inmunofluorescencia y las mismas se atribuyeron a las diferencias de supervivencia y desarrollo de las larvas durante los coprocultivos y no a fallos de la técnica de inmunofluorescencia.

Estudios recientes utilizaron dicha aglutinina e incorporaron dentro de sus herramientas diagnósticas la metodología para la identificación de *H. contortus* dentro de una población parasitaria, acelerando la obtención de resultados (Holm y col., 2014). Otros autores exploraron este método para la identificación de diferentes estadios parasitarios, a partir de la unión de diferentes lectinas a carbohidratos en las superficies de adultos, huevos y L3 envainadas y desenvainadas de *Teladorsagia circumcincta* y *H. contortus*. Los mejores resultados fueron los obtenidos con los huevos, siendo un complemento útil para la determinación de las larvas, pero no de gran consistencia (Hillrichs y col., 2012). Si bien el objetivo del presente trabajo no fue diferenciar los distintos estadios, en otros estudios realizados en la Universidad Católica de Córdoba hemos observado que el estadio larvario también otorgaba fluorescencia, siendo un posible trabajo para evaluar en un futuro próximo.

Otros trabajos utilizaron soluciones de azúcar para las flotaciones de los huevos (Jurasek y col., 2010); así como también la purificación de los mismos luego de teñirlos a través de flotaciones en percoll (Holm y col., 2014). Este último se utiliza para separar moléculas por densidad, siendo una buena alternativa a la hora de manejar muestras de rutina.

Colditz y col. (2002) evaluaron intensidad de la fluorescencia bajo distintas condiciones y observaron que aumentaba a mayor dosis de lectina y tiempo de incubación. Contrariamente, a mayor número de huevos y volumen de incubación, la intensidad de fluorescencia observada disminuyó. Otros estudios han evaluado muestras conteniendo huevos frescos o almacenados antes del procesamiento a distintas temperaturas y tiempos, observando disminución de la fluorescencia a partir de las 48 horas a 4°C y negativizándose tras su congelado (Umair y col., 2016).

La preservación de los huevos en formol al 5% luego de su purificación, no interfirió con la intensidad de fluorescencia, datos que concuerdan con Jurasek y col. (2010), y Colditz y col. (2002).

Esta técnica presenta baja subjetividad y podría ser una buena alternativa diagnóstica por su rapidez para el diagnóstico de parasitosis gastrointestinales en ambientes o épocas donde predomina el género *Haemonchus*, facilitando tomar medidas de control y/o tratamiento rápidos y eficaces. Posteriormente, otros géneros parasitarios con diferentes fluorescencias podrían incorporarse, para así poder contar con un método rápido de detección de, al menos, los géneros más frecuentes.

En comparación, la técnica de cultivo larvario requiere de escasos materiales para llevarla a cabo y los mismos tienen bajo costo, siendo esto una ventaja muy importante; por otra parte lleva tiempo el desarrollo larvario sin poder modificarse debido al proceso natural de crecimiento de los parásitos y realizar taxonomía larvaria requiere de un exhaustivo entrenamiento por parte de los operadores.

El coeficiente de correlación de Pearson en el presente trabajo fue bajo, mejorando algo al aplicar métodos de remuestreo. Se podría atribuir esto a las diferencias de sensibilidad y especificidad de las técnicas estudiadas, no obstante un mayor número de muestras podría mejorar inicialmente los resultados. Esta baja correlación entre métodos se vió reflejada en los resultados del análisis de curva ROC. Una posible

explicación podría ser que solamente se contabilizaron los huevos fuertemente teñidos, pudiendo considerar falsos negativos a aquellos que por algún motivo, no reflejaron la intensidad deseada. Tal vez ajustes en la técnica para incrementar la fluorescencia puedan aumentar la sensibilidad. La adición de controles positivos, a partir de monocultivos específicos de *H. contortus*, también agregaría precisión a la misma.

En conclusión, de acuerdo a los estudios realizados, la técnica de inmunofluorescencia podría ser válida en nuestro medio para el diagnóstico de parásitos del género *Haemonchus*. No obstante su comparación con la técnica de referencia hasta el momento, el coprocultivo, no arrojó resultados comparables, debiendo ser necesarios más ensayos de este tipo para su puesta a punto en forma definitiva.

Figura 1. Ejemplares adultos de *H. contortus*.



Figura 2. Cámara de Mc Master.



Figura 3. Filtrado de la materia fecal y agua con tamices.

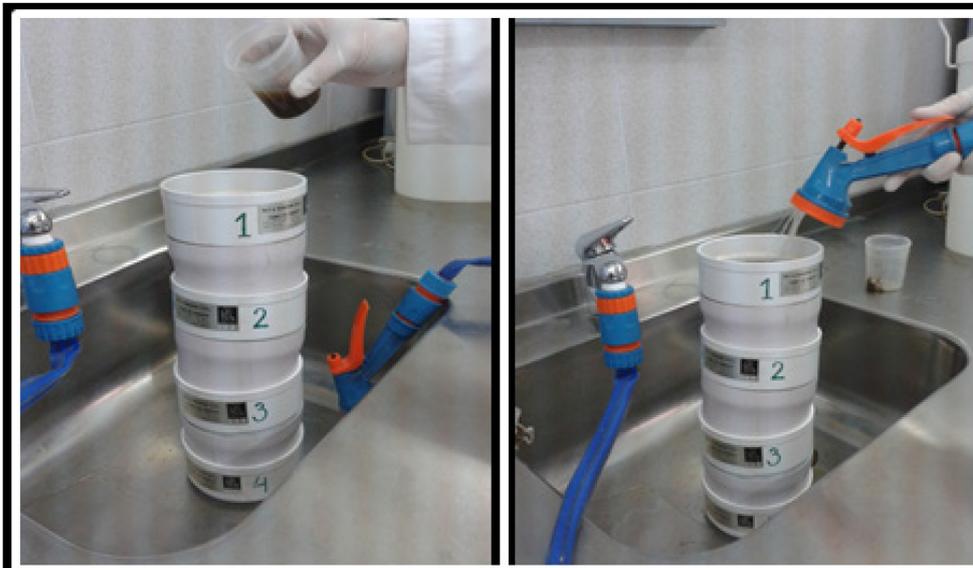


Figura 4. Recuperación del material retenido en el último tamiz.



Figura 5. Frascos de cultivo celular y conservación en solución formolada.

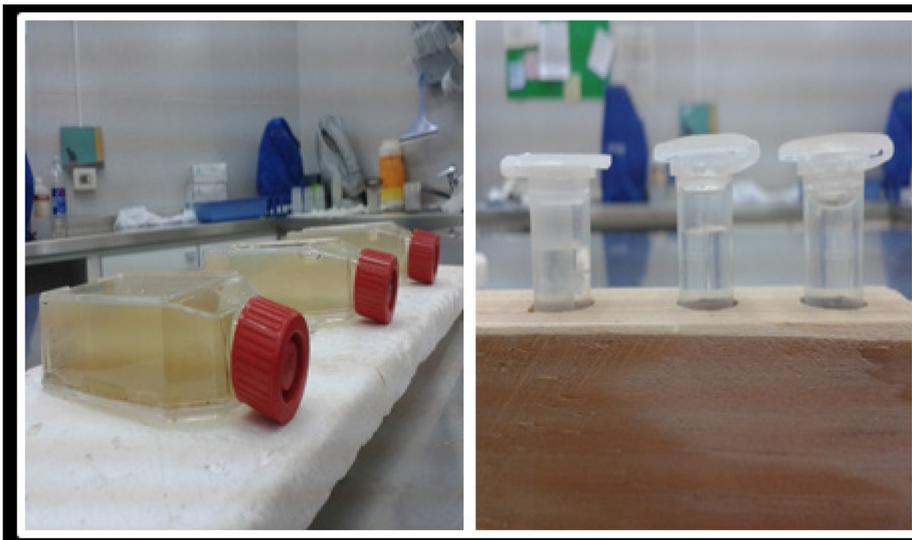


Figura 6. Huevos del género *Haemonchus* visualizados con fuente de luz ultravioleta.

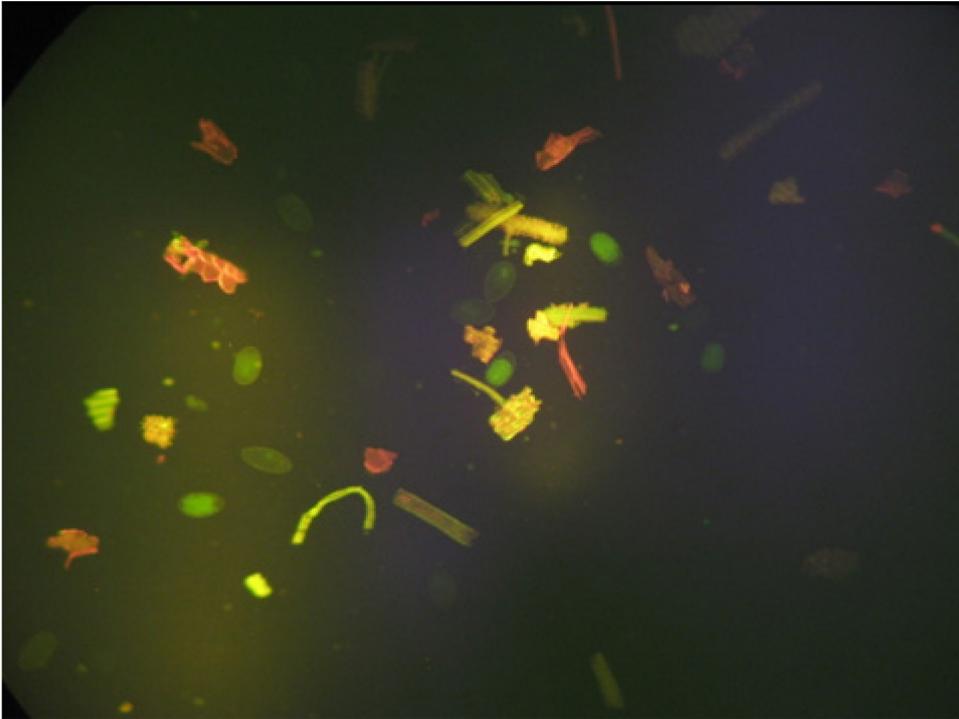


Figura 7. Recipientes plásticos para cultivo y cámara.



Figura 8. Las flechas indican huevos del género *Haemonchus*. Imagen con fuente de luz blanca (izquierda) y fuente de luz ultravioleta (derecha).

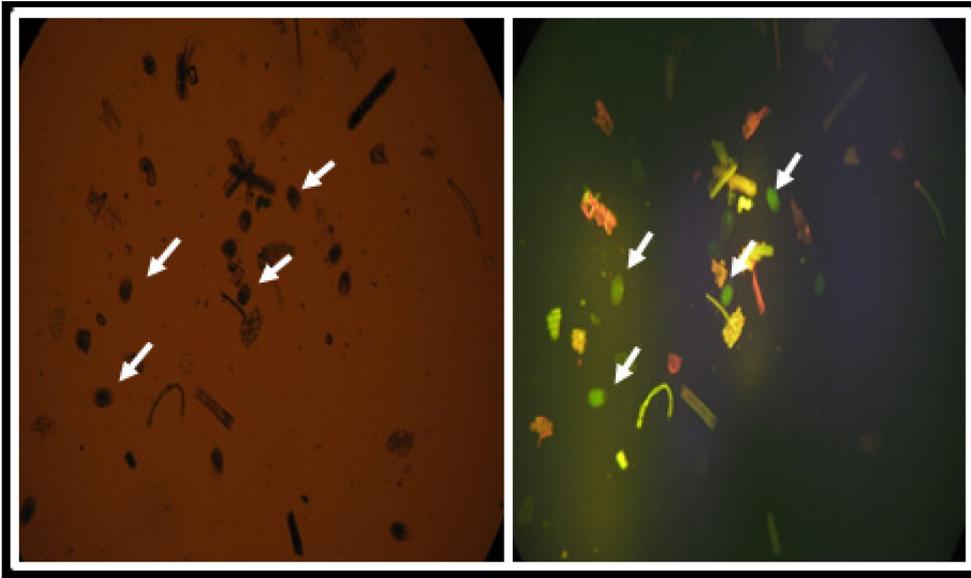


Figura 9. Huevos del género *Haemonchus*. Imagen con fuente de luz blanca.



Figura 10. Huevos del género *Haemonchus*. Imagen con fuente de luz ultravioleta.

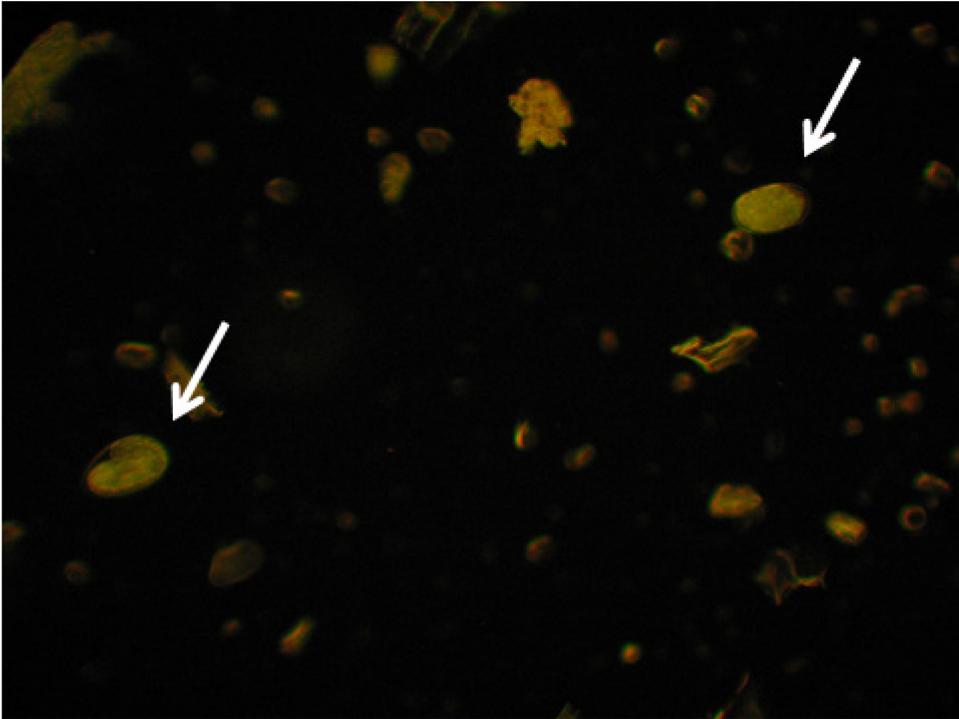
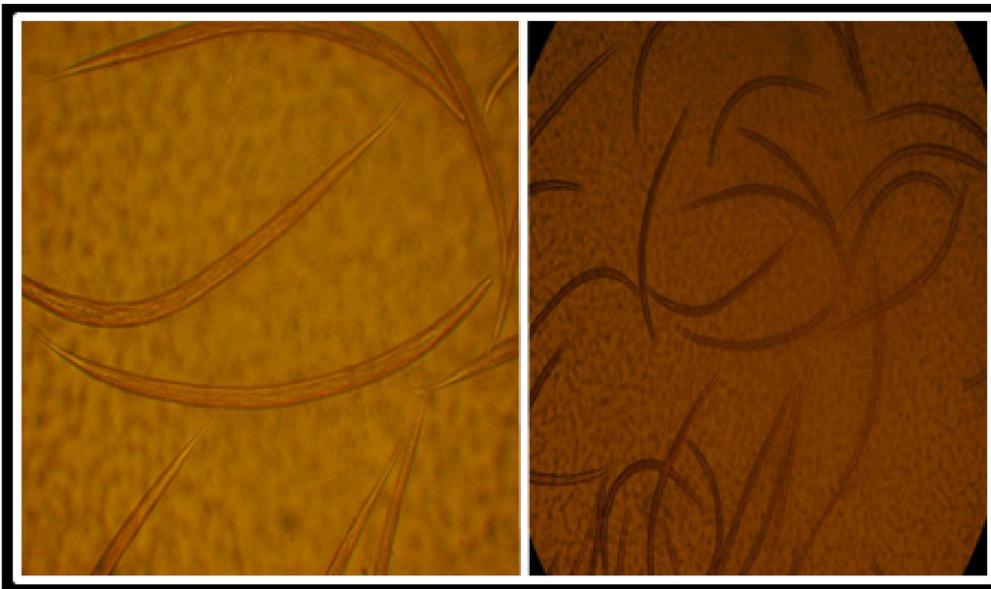


Figura 11. Larvas 3 del género *Haemonchus*.



E) BIBLIOGRAFÍA

Anziani, O. S., Guglielmo, A.A. 2007. Resistencia a los antiparasitarios. En: M San Larrea A., Boggio, J. Antimicrobianos y Antiparasitarios en Medicina Veterinaria. Ed Inter-Médica, Buenos Aires. 749 pp.

Bath, G. F., Malan, F. S., Van Wyk, J. A. 1996. "The "FAMACHA" ovine anemia guide to assist with the control of haemonchosis". Proceedings of the 7th Annual Congress of the Livestock Health and Production Group of the South African Veterinary Association, Port Elizabeth, South Africa.

Bowman, D., Lynn, R., Eberhard, M. 2004. *Georgis Parasitología para veterinarios*. Octava edición. Ed Elsevier Madrid.

Caffe, G., Cervilla, N., Cooper, L., Aguilar, S., Cerutti, J., Ramallo, R., Marchetti, J., Anziani, O. 2013. Informe de Actividades Hospital Clínico Veterinario. UCC. Caprinos: Resistencia a los antihelmínticos. Resúmenes del 1° Congreso Argentino de Producción Caprina, Agosto de 2013, La Rioja, Argentina.

Colditz, I., Le Jambre, L. F., Hosse, R. 2002. Use of lectin binding characteristics to identify gastrointestinal parasite eggs in faeces. *Vet Parasitol*, 105: 219–227.

Dobson, R. J., Barnes, E. H., Birclijin, S. D., Gill, J.H. 1992. The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. *Int J Parasitol*. 22: 1005–1008.

Efron, B. 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann. Statist.* 7 (1): 1-26.

Giudici, C., Entrocasso, C., Steffan, P. 2013. Biología, fisiología e inmunidad de los nematodos gastrointestinales y pulmonares. En: Fiel, C., Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Ed Agropecuaria Hemisferio Sur, Buenos Aires. , p. 3 – 28.

Henriksen, S.V., Korsholm, H. 1983. A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. *Nord Vet Med.*; 35:429-430.

Hillrichs, K., Schnieder, T., Forbes, A.B., Simcock, D.C., Pedley, K.C., Simpson, H.V. 2012. Use of fluorescent lectin binding to distinguish *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* eggs, third-stage larvae and adult worms. *Parasitol Res.*; 110 (1): 449-58.

Holm, S.A., Sørensen, C., Thamsborg, S.M., Enemark, H.L. 2014. Gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in Danish goat herds. *Parasite* ; 21, 37. Accedido el (3 de marzo) en www.parasite-journal.org.

Jurasek, M.E., Bishop-Stewart, J.K., Storey, B.E., Kaplan, R. M., Kent, M.L. 2010. Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. *Vet Parasitol*. 169: 209–213.

Palmer, D. G. and McCombe, I.L. 1996. Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: Rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *Int J Parasitol.* 26 (4): 447-450.

Roberts, F., O'Sullivan, P. 1949. Methods for egg counts and larval culture for strongyles infesting gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agric Res.*; 1: 99-102.

Romero, J. R., Boero, C.A. 2001. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la argentina. *Analecta Vet.*; 21(1): 21-37.

Suárez, V. H., Fondraz, M. , Viñabal, A. E., Salatin, A. O. 2014. Validación del método FAMACHA© para detectar anemia en caprinos lecheros en los valles templados del noroeste argentino. *Rev Med Vet*; 95 (2): 4 – 11.

Umair, S., McMurtry, L.W. , Knight, J.S. , Simpson, H.V. 2016. Use of fluorescent lectin binding to distinguish eggs of gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Vet Parasitol.* ; 217:76-80.

Van Wyk, J. A. y Mayhew, E. 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res.*;80(1): 14 pages.

Wooster, M.J. 1987. Interactions between *Trichostrongylus colubriformis* and *Trichostrongylus vitrinus*. PhD thesis. University of New England, Armidale, NSW, Australia.

