



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Sensibilidad y Especificidad de la técnica de Flotación y Microscópica Directa usando heces de ovino infectadas con ooquistes de *Eimeria* spp y huevos de *Haemonchus contortus*.

T E S I S

Para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

Roberto Pérez Arias.



ASESORES

Dra. Evangelina Romero Callejas.
MC. Claudia Irais Muñoz García.

México, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mi madre por todo el apoyo que me brindo durante todo este tiempo, por su comprensión y sobre todo su cariño.

A mi hermana quien siempre me ha apoyado.

A mi gran amigo Jacinto quien siempre ha confiado en mí y me ha dado un gran apoyo.

A mi novia Arely que desde que llego a mi vida me ha apoyado muchísimo.

Gracias a todos esas personas que siempre han estado apoyándome incondicionalmente y que siempre han estado cuando los necesite.

AGRADECIMIENTO

Muchas gracias a la Dra. Evangelina Romero Callejas por todo el apoyo que me dio, por guiarme durante el estudio, por los jalones de oreja cuando era necesario y las facilidades que me otorgo para llevar a cabo este trabajo en el laboratorio de diagnóstico parasitológico.

Gracias a la MC Claudia por su apoyo y consejos durante este trabajo.

Gracias a todas las personas que estuvieron ayudándome en el laboratorio de distintas formas.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. Importancia del diagnóstico parasitario en ovinos	3
3. Hipótesis	6
4. Objetivo general	6
5. Objetivos específicos	6
6. Material y métodos	7
7. Análisis estadístico	10
8. Resultados	11
9. Discusión	17
10. Bibliografía	20

Sensibilidad y Especificidad de la técnica de Flotación y Microscópica Directa usando heces de ovino infectadas con ooquistes de *Eimeria* spp y huevos de *Haemonchus contortus*.

1. INTRODUCCIÓN

La técnica de flotación ha sido utilizada desde el año de 1968 en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Fue publicada por Taracena y Quiroz en el primer manual de Prácticas de la materia de Parasitología Veterinaria.¹ Dicha técnica se ha seguido utilizando en la FMVZ sin modificaciones hasta la actualidad, publicándose en las diferentes ediciones del manual de Parasitología veterinaria en los años: 1978², 1987³ y 2006⁴.

La técnica de flotación examina microscópicamente las heces con la finalidad de efectuar el diagnóstico etiológico de diversas infecciones parasitarias de ovinos y otros animales. Además de dicha técnica de flotación, existen otras técnicas coprológicas que tienen la misma finalidad como la microscópica directa, que se utiliza para la búsqueda de diversas formas parasitarias como son ooquistes, huevos y larvas. Tiene la ventaja de ser rápida y de utilizar poco equipo, pero la desventaja de ser poco confiable debido a la pequeña cantidad de heces que se utiliza. Es una técnica fácil de realizar ya que solo se coloca una porción de heces sobre un portaobjetos se adicionan unas gotas de solución salina fisiológica (S.S.F.), se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio.⁴

La técnica de flotación tiene como fundamento utilizar soluciones de pesos específicos mayores que el agua (1,200 – 1,300) en donde los huevos y ooquistes de menor peso flotan. Se pueden observar ooquistes de protozoarios, huevos de helmintos y huevos de algunos artrópodos. Para esta técnica se utiliza la solución saturada de cloruro de sodio (S.S.NaCl). Es la técnica más usada para el diagnóstico parasitológico.⁴

Existen técnicas cualitativas como la Microscópica Directa y la de Flotación y otras técnicas que son cuantitativas como la técnica de McMaster. Esta última es útil en la cuantificación del número de ooquistes y/o huevos por gramo de materia fecal.⁴

La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM ha establecido, documentado, implementado y mantiene un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC), el cual mejora continuamente su eficacia de acuerdo con los requisitos de la Norma NMX-CC-9001-IMNC-2008. El Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico (LDP) se encuentra dentro de este SGC desde el año 2010 y tiene como finalidad ofrecer apoyo en la identificación de los parásitos que se presentan en la práctica clínica mediante el análisis de muestras biológicas. Dentro de los objetivos del SGC destaca el utilizar métodos de prueba o técnicas analíticas validados para la realización de los servicios.⁵

La técnica de flotación es la más solicitada en el LDP para el diagnóstico parasitológico en muestras fecales, por lo que cobra importancia la validación de la misma como parte de una mejora continua del mismo laboratorio, dentro la

validación de una prueba se incluye la determinación de su sensibilidad y especificidad.⁶

Los laboratorios de diagnóstico deben aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos o las calibraciones dentro de su alcance. Estos incluyen el muestreo, la manipulación, el transporte, el almacenamiento y la preparación de las muestras.

SENSIBILIDAD: Proporción de animales de referencia infectados que se sabe que dan resultado positivo en la prueba.¹⁰

ESPECIFICIDAD: Proporción de animales de referencia no infectados que se sabe que presentan un resultado negativo en la prueba.¹⁰

Las pruebas realizadas sobre muestras de individuos o poblaciones tienen varios propósitos, tales como ayudar a documentar la ausencia de una determinada enfermedad en un país o región, evitar su propagación a través del comercio, erradicar una infección de una zona, confirmar el diagnóstico de los casos clínicos, estimar la prevalencia de una infección para facilitar análisis de riesgo, identificar los animales infectados con vistas a desarrollar medidas de control.

Para llevar a cabo valoraciones de sensibilidad, los resultados de las pruebas tienen primero que reducirse a la categoría de positivo o negativo.¹⁰

2. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO PARÁSITARIO EN OVINOS.

La intensidad del parasitismo no es similar en todos los borregos de un rebaño, ya que la agregación de los parásitos en el seno de la población de hospedadores es

un hecho común que se traduce en que tan solo una minoría de los individuos parasitados concentran las mayores cargas de vermes, lo cual está asociado a diversos factores, que dependiendo de la interacción entre las condiciones ambientales y la receptividad del hospedador determina la existencia de diversos niveles de infección al interior de un rebaño.¹³

En los animales de producción las infestaciones por parásitos ocasionan graves pérdidas económicas al provocar diarreas, anemia, baja de peso y a veces la muerte. Los mecanismos por los cuales se presentan estos cuadros son debidos a los daños que los parásitos ocasionan primordialmente en los tejidos intestinales.¹⁶

En los animales de producción los parásitos gastrointestinales reducen la producción de carne, leche, lana y otros productos para el consumo. La información generada en las investigaciones, hallazgos clínicos de campo, en rastros y reportes de clínicas y laboratorios, es de suma importancia en el diagnóstico de situación de las principales enfermedades en los animales domésticos. Esta información permite tener elementos para sentar las bases para el diseño de programas de prevención, control y erradicación de las enfermedades en diferentes regiones.¹⁴

Los estudios en ovinos en crecimiento infectados naturalmente con parásitos gastrointestinales (PGI) durante el pastoreo muestran reducciones en la ganancia de peso de hasta un 50%.⁶

Dentro de los parásitos del orden Strongylida que afectan a los rumiantes, el género *Haemonchus* ha sido reportado con mayor frecuencia. Su característica

principal es causar un estado de anemia, porque tanto las larvas de cuarto estadio como los adultos son hematófagos y se calcula que en un animal la pérdida media de sangre puede ser de hasta 0.05 ml por parásito por día.¹⁷ Y al igual que *Haemonchus*, la coccidiosis puede comprometer la salud del animal y por ende su producción.

En México se han descrito cuatro especies de *Eimeria* en ovinos, dichas especies y sus características se detallan en el cuadro 1.¹⁷

Cuadro 1. *Eimerias* de ovinos en México.

ESPECIE	HUÉSPED	LOCALIZACIÓN	TAMAÑO DEL	PERIODO
			OOQUISTE (m)	PREPATENTE
<i>E. faurei</i>	Ovino	Intestino Delgado	22 – 33 x 19 – 24	12 - 15
<i>E. intricata</i>	Ovino	Intestino Delgado y Ciego	40- 56 x 30 - 41	20 – 27
<i>E. ovina</i>	Ovino	Intestino Delgado	23 – 36 x 16 - 24	19
<i>E. ovinoidalis</i> *	Ovino	Colon	17 – 25 x 13 - 20	10 - 15

*Especie más patógena *Eimeria ovinoidalis*.¹⁸

3. HIPOTESIS

La técnica de flotación y microscópica directa descritas en los manuales de la FMVZ-UNAM son adecuadas para la realización del diagnóstico parasitológico de huevos de *Haemonchus contortus* y ooquistes de *Eimeria* spp en heces de ovinos.

4. OBJETIVO GENERAL

Se determino la sensibilidad y especificidad de la técnica de flotación y microscópica directa en muestras fecales de ovinos negativas a cualquier parásito colectadas de animales estabulados en el CEPIPSA y positivas a huevos de *Haemonchus contortus* y ooquistes de *Eimeria* spp de un animal infectado experimentalmente en estabulación.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica de flotación.

Calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica de microscópica directa.

Identificar sí existe o no diferencia estadística entre las técnicas de flotación y microscópica directa.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras fecales de ovinos que fueron divididas en dos grupos: heces positivas a huevos del nematodo *Haemonchus contortus* y ooquistes de coccidias (*Eimeria* spp.), y heces negativas a cualquier tipo de huevo u ooquiste. El primer grupo de heces fueron obtenidas de un individuo de 3 meses de edad, con un peso de 12 Kg. El ovino se mantuvo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, fue infectado experimentalmente con *Haemonchus contortus* inoculado cada 3 meses con 15000 larvas y con 3000 ooquistes esporulados de *Eimeria* spp (Fig. 6).



Fig. 6 Colecta de heces en el ovino positivo

El segundo grupo de heces se obtuvo de un grupo de 10 ovinos negativos (Fig. 7). Dichos ovinos fueron desparasitados en el CEPIPSA que es uno de los centros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM., los ovinos del CEPIPSA fueron desparasitados cada 6 meses y a todas las muestras fecales procedentes de ellos se les realizó la prueba de flotación en el LDP previamente a ser utilizadas para el estudio.^{9,10}



Fig. 7. Ovinos negativos

Todas las muestras fueron preparadas, verificadas y cuantificadas por el personal del Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico (LDP). La carga parasitaria fue calculada mediante la técnica de McMaster, contando huevos por gramo de heces (h/g/h) y ooquistes por gramos de heces (ooq/g/h). El presente fue un estudio ciego, por lo que sólo el personal del LDP conocía cuales muestras eran positivas y cuales negativas. Las muestras fueron preparadas semanalmente utilizando heces frescas (defecadas en un periodo menor a 24 hrs.) y se conservaron en refrigeración (4°C) por un tiempo máximo de 4 días. Adicionalmente, las muestras

positivas se categorizaron en base a su carga (h/g/h), dividiéndose en heces con carga alta (*H. contortus*, 800 – 1200 huevos, h/g/h y *Eimeria* spp., 350 – 1000 ooquistes ooq/g/h) y baja (*H. contortus*, de 50- 800 huevos, h/g/h y *Eimeria* spp., de 50 – 300 ooquistes, ooq/g/h).^{14,15}

Las muestras preparadas por el personal fueron procesadas por la técnica de flotación descrita en el manual de prácticas de la FMVZ. Sin embargo, debido al amplio rango de volumen de SSNaCl y peso de la muestra fecal que es posible utilizar, se hicieron subdivisiones de la misma técnica como se detalla en el Cuadro 3. Lo anterior para determinar así el volumen y peso (SSNaCl y heces respectivamente) ideales a utilizar en la realización de la técnica.

Cuadro 2. Variación de la Técnica de Flotación

Variante de Flotación	Volumen de la SSNaCl (ml)	Peso de la muestra fecal (g)
Flotación 1	45	3
Flotación 2	45	5
Flotación 3	100	3
Flotación 4	100	5

Con la finalidad de comparar la flotación con otro método coproparasitoscópico, todas las muestras se procesaron además por la técnica de microscópica directa siguiendo la metodología descrita en el manual de parasitología de la FMVZ.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la sensibilidad y especificidad de cada variante de la técnica de flotación y de la microscópica directa.³ Para saber si existieron diferencias significativas entre ambas técnicas (flotación y microscópica directa) y entre las variantes de la técnica de flotación se utilizó la prueba de χ^2 con ayuda del programa estadístico SPSS 12.0.^{7,24}

Verdaderos Positivos

$$\text{Sensibilidad (Se)} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

Verdaderos negativos

$$\text{Especificidad (Es)} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

8. RESULTADOS

Se analizaron un total de 182 muestras fecales. El 51.1% (93) de las flotaciones realizadas fueron positivas a *Haemonchus contortus* y a *Eimeria* spp. y el 48.9% (89) restante fueron negativas a cualquier tipo de parásito. En el cuadro 3 se detalla el número total de flotaciones realizadas y se desglosa la cantidad de muestras procesadas con relación a la variante de la técnica de flotación empleada.

Cuadro 3. Número de flotaciones realizadas

Variante de flotación	Verdadero Negativo	Verdadero Positivo	Total
Flotación 1	23	23	46
Flotación 2	20	24	44
Flotación 3	24	22	46
Flotación 4	22	24	46
Total	89	93	182

La sensibilidad de la técnica de flotación para ooquistes de *Eimeria* fue del 93.5% (n=93), y la especificidad fue del 91.0% (n= 89) y para los huevos de *Haemonchus contortus* fue del 92.5% y la especificidad del 92.1%.

La sensibilidad para la técnica de microscópica directa a ooquistes de *Eimeria* fue del 69.9% (n=93) y la especificidad fue del 96.6% (n=89) y para los huevos de *Haemonchus contortus* fue del 76.3% y la especificidad del 96.6%.

Adicionalmente se calculó la sensibilidad y especificidad de cada variante de la técnica de flotación, los resultados se muestran en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Sensibilidad y especificidad de las variantes de la técnica de flotación a ooquistes de *Eimeria* spp.

	Sensibilidad	n	Especificidad	n
Flotación 1	91.3%	23	95.7%	23
Flotación 2	95.8%	24	80%	20
Flotación 3	95.5%	22	95.8%	24
Flotación 4	91.7%	24	90.9%	22

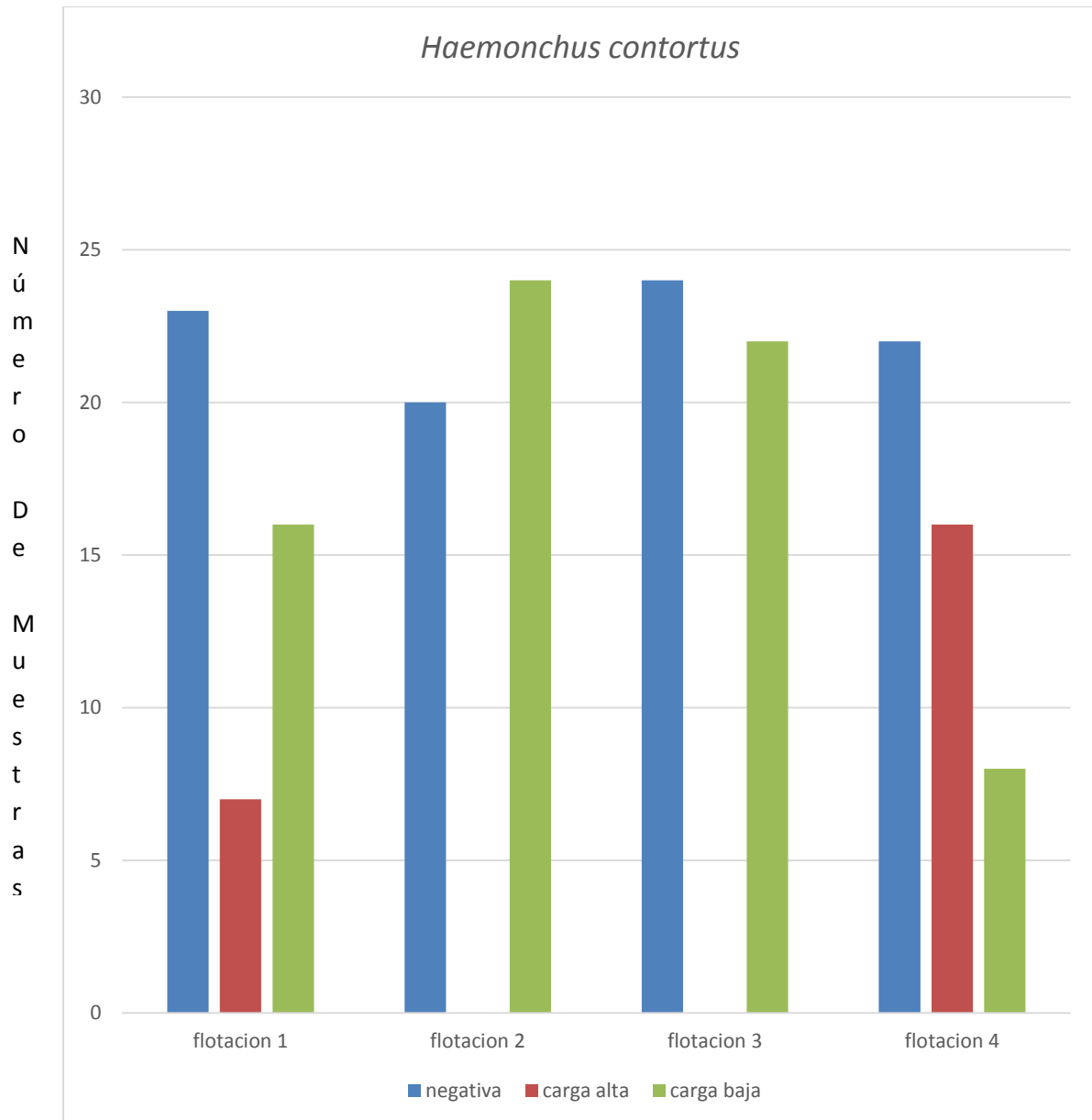
Cuadro 5. Sensibilidad y especificidad de las variantes de la técnica de flotación a huevos de *Haemonchus contortus*.

	Sensibilidad	n	Especificidad	n
Flotación 1	86.9%	23	100%	23
Flotación 2	100%	24	75%	20
Flotación 3	90.9%	22	100%	24
Flotación 4	91.7%	24	90.9%	22

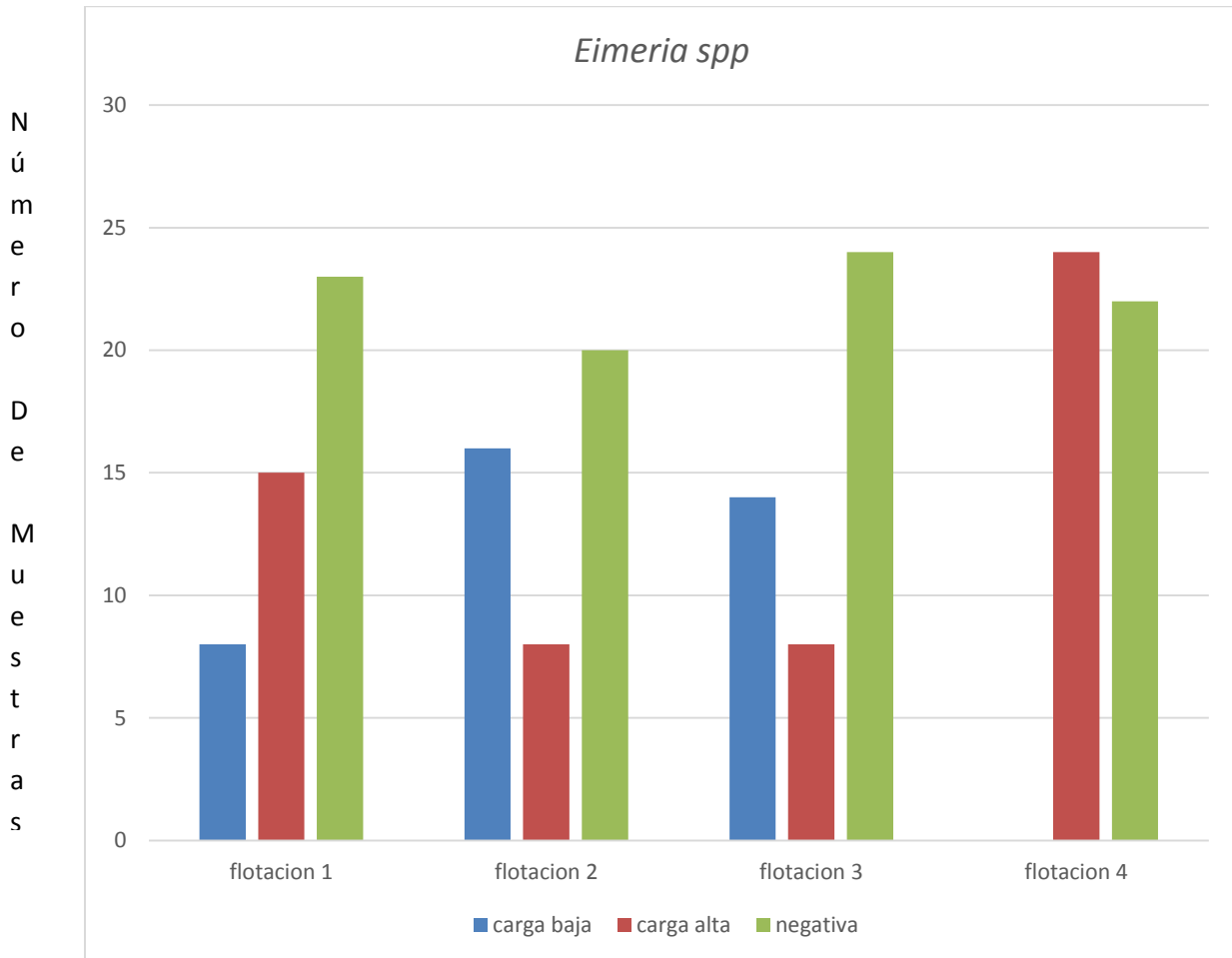
En el grupo de muestras positivas a través de la técnica de flotación, se calculó si la carga parasitaria era baja o alta. Del total de las muestras positivas a huevos de *Haemonchus contortus* el 24.7% (n=23) fueron de carga alta y el 75.3% (n=70) de carga baja. Y para el caso de las muestras positivas a ooquistes de *Eimeria* el 59.1% (n=55) fue de carga alta y el 40.9% de carga baja (n=38). En las graficas 1

y 2 se observa el total de muestras que correspondieron a cargas altas y bajas de huevos de *Haemonchus contortus* y ooquistes de *Eimeria*.

Gráfica 1. Cargas de huevos de *Haemonchus contortus* en los diferentes grupos a través de la técnica de flotación



Gráfica 2. Cargas de ooquistes de *Eimeria* spp. En los diferentes grupos analizados por la técnica de flotación y cargas



No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de flotaciones ($P= 0.93$, gl 3).

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la técnica de flotación y la técnica de microscópica directa para huevos de *Haemonchus contortus* ($P=0.00$, gl 1).

Sí se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la técnica de flotación y la técnica de microscópica directa por microscópica directa para ooquistes de *Eimeria* (P=0.00, gl 1).

No hay relación entre la carga parasitaria y el resultado de la flotación para huevos de *Haemonchus contortus* (P=0.115, gl 1).

No hay relación entre la carga parasitaria y el resultado de la flotación para ooquistes de *Eimeria* (P=0.213, gl 1).

No hay relación entre la carga parasitaria y el resultado de la microscópica directa para huevos de *Haemonchus contortus* (P=0.803, gl 1).

No hay relación entre la carga parasitaria y el resultado de la microscópica directa para ooquistes de *Eimeria* (P=0.797, gl 1).

Cuadro 6. Resultados para carga alta

Técnica de diagnóstico	Parásito	Verdaderamente positivos	Diagnosticados como positivos		Diagnosticados como negativos	
			%	n	%	n
Flotación	<i>Haemonchus contortus</i>	23	100	23	0	0
Microscópica directa			78.3	18	21.7	5
Flotación	<i>Eimeria</i>	55	90.9	50	9.1	5
Microscópica directa			70.9	39	29.1	16

Cuadro 7. Resultados para carga baja

Técnica de diagnóstico	Parásito	Verdaderamente positivos	Diagnosticados como positivos		Diagnosticados como negativos	
			%	n	%	n
Flotación	<i>Haemonchus contortus</i>	70	90	63	10	7
Microscópica directa			75.7	53	24.3	17
Flotación	<i>Eimeria</i>	38	97.4	37	2.6	1
Microscópica directa			68.4	26	31.6	12

9. DISCUSIÓN

Los métodos de concentración (también llamados de enriquecimiento) tienen la finalidad de concentrar los huevos y ooquistes haciéndolos flotar en la superficie.²²

En el presente estudio se compararon dos pruebas diagnósticas usadas por los veterinarios tanto en el laboratorio como en el campo para llevar a cabo los diagnósticos parasitológicos, las cuales son la técnica de flotación y la técnica microscópica directa, ambas técnicas arrojaron diferentes valores de sensibilidad y especificidad lo que puede explicarse por diversos factores como el tipo de solución empleada.

Para la técnica de flotación se utilizó la solución saturada de cloruro de sodio, con una densidad de 1:200, mientras que para la microscópica directa se utilizó la solución salina fisiológica. La SSNaCl es probablemente más eficaz que la segunda, debido que concentra las estructuras parasitarias en la superficie. Mientras que la solución salina fisiológica únicamente sirve como diluyente, vehículo y mantiene hidratadas las estructuras durante su observación bajo el microscopio, pero no las concentra. Por ello este y otros estudios han comprobado que la microscópica directa es poco eficaz comparada con las diferentes técnicas de concentración.²³ Aun así, es muy usada clínica y enseñanza práctica debido a su rapidez y bajo costo.

La coproscopia cualitativa continúa siendo la metodología que comúnmente se emplea en el laboratorio de parasitología con fines diagnósticos.¹⁹ Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas pruebas resultando la más confiable, la técnica de flotación, con SSNaCl comparada con la microscópica

directa. Otros estudios han encontrado resultados similares al presente, como el realizado por Dryden y colaboradores (2005), quienes determinaron una sensibilidad del 95.15% para huevos de *Ancylostoma caninum* en 206 muestras fecales procesadas por la técnica de flotación y de 27.18% por microscópica directa²⁷. *Ancylostoma caninum* posee un huevo tipo estrangilido de gran similitud al de *Haemonchus* sp., por lo que los resultados para la detección de los huevos de ambos parásitos resultan similares.²¹

Se demostró que la técnica de flotación a pesar de los años que tiene en uso (desde los años 60's); sigue siendo una prueba diagnóstica altamente efectiva, económica y rápida. Aun así existen técnicas coproparasitológicas con mayor sensibilidad y especificidad como las de concentración por sedimentación, tal es el caso de la técnica de Faust. Sin embargo, es importante resaltar que el Faust solo ha demostrado tener mayor efectividad en la detección de protozoos como *Giardia*, ya que es igualmente efectiva que la flotación en la determinación de huevos de Helminths.²² La técnica de Faust es más costosa que la flotación con SSNaCl porque requiere equipo adicional (centrifuga), utiliza soluciones como el Sulfato de Zinc que es más caro que la sal común y mayor inversión de tiempo debido a el número de lavados en la centrifuga.⁴ Las características anteriores limitan su uso en el trabajo de campo.

En el presente, se demostró que aparentemente para la técnica de flotación, no hay diferencias entre el uso de 45 ml ó 100 ml de solución saturada de cloruro de sodio, la única diferencia perceptible desde el punto de vista del observador es que usando 100 ml de la solución la muestra bajo el microscopio se observa mucho más limpia que usando una con 45 ml de solución. Es importante realizar

más estudios en el futuro con un mayor número de muestras para confirmar el hecho mencionado.

Estudios como el presente son realizados frecuentemente en el diagnóstico de endoparásitos en varias especies.¹⁶ Pero escasamente realizados en animales de producción donde la técnica mayormente utilizada es el McMaster debido a que la cuantificación de los huevos u ooquistes en heces son el parámetro más usado para valorar la efectividad de diferentes fármacos antiparasitarios. Aun así, el adecuado, económico y rápido diagnóstico de las parasitosis en ovinos es fundamental para evitar pérdidas en su producción. Por ello la técnica de flotación es una opción viable y de fácil implementación en la práctica veterinaria dedicada a la ovino cultura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Quiroz RH. Prácticas de Parasitología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México DF. 1968. Pag. 21 – 22.
2. Taracena FMM, Quiroz RH, Vega AN, Neza BR, Acevedo HA. Prácticas del Curso de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México DF. 1978.
3. Acevedo HA, Romero CE. Manual de Prácticas de Parasitología Enfermedades Parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México DF. 1987. Pag. 18 y 21.
4. Besmé MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA. Ramos ME. Manual de Prácticas de Laboratorio de Parasitología. Primera Edición. FMVZ. UNAM. México DF. 2006.
5. Enríquez EE. Manual de Gestión de Calidad. MCA-UNAM-MV-001. Edición 7. 2010. Fecha de Emisión 19-03-2010. Pag. 16-17.
6. Rodríguez V.R.I, Cob G.L.A, Domínguez A.J.L. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. Rev. Biomed 2001; 12:19-25. Pag. 20.
7. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa Wiley. 4^a Edición. 2010.
8. Méndez RI. El Protocolo de la Investigación. Editorial Trillas. Año 1991.
9. Rodriguez VRI. Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria. Segunda edición. Ediciones de la universidad Autónoma de Yucatán. Año 2005. Pag. 41 – 45.

10. Organización Mundial de la Salud Animal. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas). OIE. 2004. Quinta Edición. Volumen 1. Pag. 36.
11. Cantó AGJ. Manual de Parasitología Veterinaria. Universidad Autónoma de Querétaro.
12. Technical Manual for the Examination and Control of Parasites of Domestic Animals. Japan Livestock Technology Association. March 2001.
13. Luz A. Pino y Gustavo Morales C. Distribución y abundancia de los huevos de Estróngilos digestivos y de los ooquistes de Eimeria spp., en las heces de ovinos estabulados. Veterinaria Trop. 2002.
14. Romero JR, Boero CA. Epidemiología de la Gastroenteritis Verminosa de los Ovinos en las Regiones Templadas y Cálidas de la Argentina. Analecta Veterinaria 2001.
15. Cordero del Campillo M., Parasitología Veterinaria. Editorial McGraw Hill, Madrid, España. 1999.
16. Ibarra VF. Alcala CY. Vera MY. Parasitología Veterinaria. Protozoarios Volumen 1. Editorial ACASTDEL. Año 2009.
17. Chartiera C. Paraudc C. Coccidiosis due to Eimeria in sheep and goats.
18. Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F.J., Cámara-Sarmiento, R. Importancia del Parasitismo Gastrointestinal en Ovinos y Situación Actual de la Resistencia Antihelmíntica en México.
19. Pita Fernández, S., Pértegas Díaz, S. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España) 2003; 10: 120-124.

20. Oliveira-Sequeira TCG, Amarante AFT, Ferrari TB, L.C. Nunes. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. Vol. 103, issues 1-2, 3 January 2002, pages 19-27.
21. Olazábal MEE. *Diagnóstico y control de los helmintos en los rumiantes*. Primera edición. 2003
22. Foreyt JW. *Veterinary Parasitology. Reference Manual. Fifth Edition*. 2001.
23. Giuseppe Cringoli, Laura Rinaldi, Maria Paola Maurelli, Maria Elena Morgoglione, Vincenzo Musella, Jürg Utzinger. *Ancylostoma caninum: Calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in faecal samples of dogs*. Elsevier Inc. All rights reserved. 2011. Pag. 1 – 6.
24. SPSS Versión 12.0.0. SPSS Inc. Chicago USA. 2003.