

TÉCNICA DE QUATRO TAMISES PARA O DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO QUANTITATIVO DA FASCIULOSE DOS RUMINANTES¹

ENEIDE SANTIAGO GIRÃO² e HAKARU UENO³

RESUMO - Desenvolveu-se uma técnica de tamisação, para contagem de ovos de *Fasciola hepatica* em fezes de ruminantes, que requer 10 a 15 minutos por exame, dispensa uso de produtos químicos, vidraria, e pode ser executada em laboratório ou campo. O material consiste de um conjunto de quatro tamises, confeccionado com buchas de redução de PVC e telas metálicas de 100, 180, 200 e 250 malhas/polegada, com aberturas de 174, 96, 87 e 65 μm , respectivamente. Os três primeiros tamises permitem passagem de ovos de *F. hepatica*, retraindo fibras fecais, conforme aberturas das malhas, e o último retém estes ovos, juntamente com fibras fecais finas. Da tamisação, resulta pouco sedimento, facilitando a detecção e contagem dos ovos após coloração com verde de metila a 0,5%. Foram realizados testes para verificar a eficiência da técnica antes de sua utilização como meio de diagnóstico. Adicionaram-se 2, 4, 8, 16, 32, 200 e 400 ovos de *F. hepatica* em 74 amostras de 1 g de fezes de bovinos, verificando-se recuperação de, aproximadamente, 70%. Em fezes de ovinos, adicionando-se 2, 4, 8, 16 e 32 ovos de *F. hepatica* em 50 amostras de 1 g, recuperaram-se aproximadamente 43%.

Termos para indexação: *Fasciola hepatica*, ovinos, bovinos.

A FOUR-LAYER SIEVE TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE FECAL EXAMINATION OF FASCIOLIASIS OF RUMINANTS

ABSTRACT - A technique for quantitative fecal examination of fascioliasis of ruminants in laboratory and field levels was developed. The technique requires 10 to 15 minutes per sample, without chemical products or glassware. The kit comprises four pieces of gradually finer sieves made with plastic reduction plugs for waterworks and stainless steel wire nets of 100, 180, 200 and 250 mesh with 174, 96, 87 and 65 μm in the aperture size, respectively. The first three sieves allow *Fasciola hepatica* eggs through but retain fecal debris according to the net's aperture. The last sieve retains the eggs together with finer fecal debris. By the end of the sieving process, the eggs are counted with the aid of methyl green at 0.5%. Laboratory tests were performed to verify the efficacy of the technique. For the tests with bovine feces, 2, 4, 8, 16, 32, 200 and 400 *F. hepatica* eggs were added to 74 feces samples of 1 g and nearly 70% of the eggs were recovered. Fifty samples of 1 g of ovine feces with 2, 4, 8, 16 and 32 *F. hepatica* eggs, tested repeatedly, showed recovery rate of approximately 43%.

Index terms: *Fasciola hepatica*, ovine, bovine.

INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma trematodose que causa enormes prejuízos aos ruminantes. É de distribuição cosmopolita. Por se tratar de uma zoonose, assume também importância em saúde pública.

Os sintomas clínicos da fasciolose bovina e ovina, tais como emaciação, anorexia, anemia e perda de peso, não são característicos, sendo necessário um diagnóstico diferencial com outras enfermida-

des em que se evidenciam estas mesmas manifestações clínicas. Diversos autores, entre eles Dennis et al. (1954), Taylor (1964), Happich & Boray (1969) e Bendezu & Landa (1973), preconizam o exame coprológico como a forma mais segura para o diagnóstico da fasciolose crônica. O exame coprológico determina a presença de ovos de *Fasciola* spp., o que indica a existência de trematódeo adulto nos ductos biliares.

Várias técnicas para o diagnóstico coprológico da fasciolose encontram-se descritas na literatura. Estas técnicas se baseiam em flutuação, sedimentação e tamisação. Muitas das técnicas originais que aplicam estes procedimentos são, quase sempre, modificadas por pesquisadores que visam melhorá-las ou adaptá-las de acordo com suas necessidades e disponibilidades. As técnicas de flutuação, em que se utiliza solução com produtos químicos de alto peso específico, segundo Swanson & Hopper

¹ Aceito para publicação em 21 de janeiro de 1985.

Parte da Dissertação apresentada pelo primeiro autor para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária. Fac. Vet. UFRS.

² Méd. - Vet., M.Sc., EMBRAPA/Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Teresina (UEPAE de Teresina), Caixa Postal 01, CEP 64000 Teresina, PI.

³ Méd. - Vet., Ph.D., Prof. - Visit., UFRS, Porto Alegre, RS.

(1950), Dennis et al. (1954) e Boray (s.d.), deformam o ovo de *F. hepatica*, assumindo esta morfologia diferente, o que dificulta sua identificação. Entre as técnicas quantitativas para a detecção de ovos de *Fasciola* spp., a de tamisação de Willmott & Pester (1952), modificada por Dorsman (1956), e a de sedimentação de Boray & Pearson (1960) são consideradas por Happich & Boray (1969) como as mais eficientes. Das técnicas quantitativas de sedimentação para a detecção de ovos de *Fasciola* spp., a de Dennis et al. (1954) é uma das mais empregadas, sendo, também, segundo Ueno & Alvarez (1971), muito utilizada em estudos epidemiológicos da fasciolose e na comprovação da eficácia de anti-helmínticos.

Considerando o atual estágio dos estudos sobre fasciolose no Estado do Rio Grande do Sul, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas quantitativas adaptadas às condições locais que apresentem segurança na separação de ovos das fibras fecais, melhor visualização dos ovos, que sejam executáveis em menor espaço de tempo, e econômicas.

A presente pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de técnica prática e eficiente para o diagnóstico de fasciolose crônica de ruminantes, com o emprego de material simples e de fácil aquisição, e para ser executada também em campo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Setor de Helminthoses da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de julho a novembro de 1981.

Para a confecção dos tamises utilizou-se o seguinte material:

- Buchas de redução de PVC (tipo cano longo), com 60 mm x 40 mm (Fig. 1);
- Telas metálicas (100, 150, 180, 200, 250 e 300 malhas/polegada)⁴;
- Cola⁵.

Confecção dos tamises

A bucha de redução foi serrada no bordo da extremidade mais estreita (Fig. 2). Cortou-se a tela metálica em diâmetro igual ao desta extremidade (Fig. 3 e 6), colan-

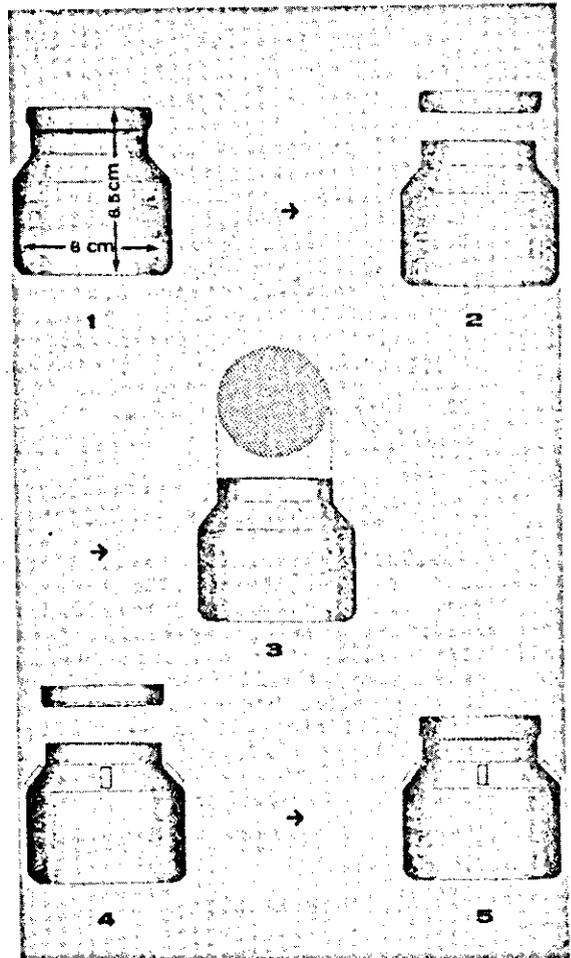


FIG. 1. Bucha de redução.

FIG. 2. Bucha de redução serrada.

FIG. 3. Bucha de redução e tela metálica.

FIG. 4. Bucha de redução com a tela colada.

FIG. 5. Tamis pronto.

do-a entre as partes serradas da bucha (Fig. 4 e 5), e deixou-se secar, colbando-se um objeto pesado sobre ela, para boa fixação. Após uma hora, colocou-se cola ao redor da tela metálica, por dentro do tamis, para vedar os espaços resultantes do processo da serração. Foram também colados quatro pequenos pedaços de material de plástico não específico na parte externa do tamis, para promover a saída do ar ao serem encaixados uns nos outros (Fig. 7). O excesso de cola, do processo de colagem, foi retirado com o uso de lixa para madeira.

Após a confecção, o tamis foi lavado com xilol, álcool e água com detergente, para limpar e desengordurar a tela metálica.

⁴ TECIMETAL (Tecidos Metálicos Ltda) - São Paulo

⁵ Araldite ultra-rápido CIBA/GEIGY S/A - São Paulo

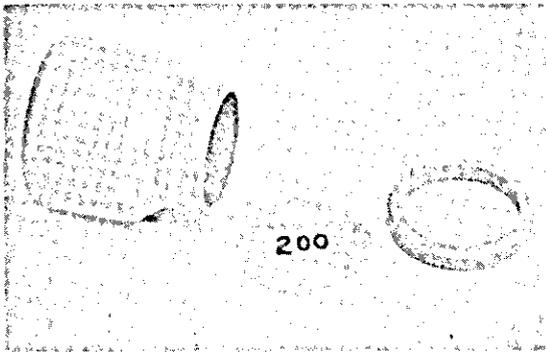


FIG. 6. Bucha de redução serrada e tela metálica.

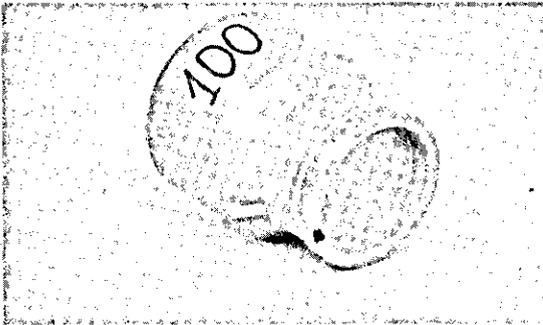


FIG. 7. Tamis pronto, mostrando partes de material de plástico coladas.

Obtenção de ovos de *F. hepatica* para teste dos tamises

Coletaram-se ovos de *F. hepatica*, segundo a técnica de Ueno & Alvarez (1971), da vesícula biliar e diretamente do útero de exemplares de fascíolas obtidas de fígados de bovinos abatidos no Frigorífico Sul Riograndense (FRIGOSUL), Canoas, RS. Após a coleta, os ovos foram colocados em água destilada e conservados em refrigerador (5°C a 7°C).

Teste para seleção dos tamises

Aproximadamente, 3.000 ovos de *F. hepatica* coletados da vesícula biliar de bovinos foram adicionados em 10 ml de água. Em seguida, foram colocados nos tamises de 100, 150, 180, 200, 250 e 300 malhas/polegada (seguinto-se do tamis de maior para o de menor abertura) e lavados em água corrente, verificando-se em quais dos tamises estes ovos passavam ou ficavam retidos. Neste teste foram selecionados quatro tamises (100, 180, 200 e 250 malhas/polegada), para serem utilizados durante o experimento.

Teste com os tamises selecionados

Como veículo para ovos de *F. hepatica*, utilizaram-se fezes de bovinos e ovinos criados em campo e comprovadamente negativos para ovos deste trematódeo, através de exames coprológicos.

Primeiro teste básico

Adicionaram-se 200 ovos de *F. hepatica* em 1 g de fezes de bovinos. Aos ovos e às fezes foram adicionados 30 ml de água da torneira e cinco gotas de solução a 10% de detergente líquido de uso doméstico⁶. Este material, após agitação, foi passado no conjunto de tamises selecionados (Fig. 8). O sedimento de cada tamis foi corado e examinado ao estereomicroscópio, em placas-de-petri. Esta operação foi repetida seis vezes.

Segundo teste básico

Neste teste foram adotados os mesmos procedimentos do primeiro, porém, adicionando-se 400 ovos em cada amostra. Usou-se, também, nestes dois testes, a técnica de Dennis et al. (1954), para comparar o número

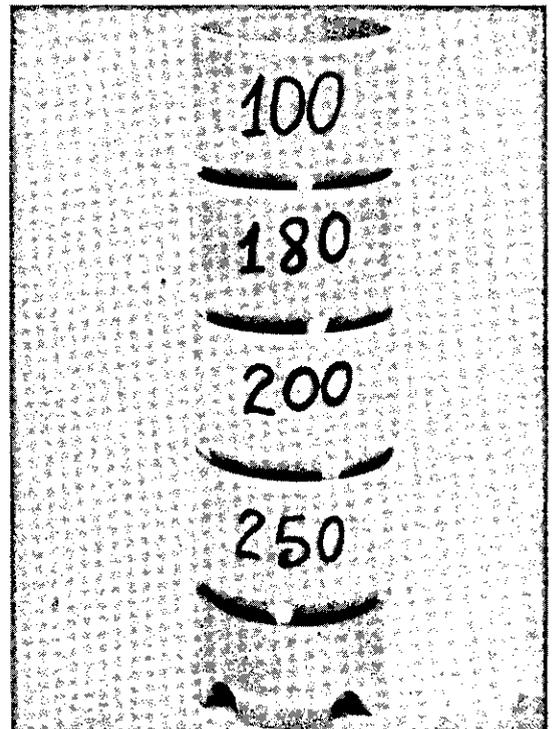


FIG. 8. Conjunto de tamises utilizados no experimento. Os números apostos nos tamises indicam malhas/polegada.

⁶ ODD - Orniex S/A - São Paulo

de ovos recuperados entre esta técnica e os tamises selecionados.

Terceiro teste básico

Consistiu de doze repetições, adicionando-se 200 ovos de *F. hepatica* a cada amostra de 1 g de fezes de bovinos. Nestes testes, as amostras foram processadas como as do primeiro, examinando-se, no entanto, somente o sedimento do tamis de 250 malhas/polegada.

Quarto teste básico

Ovos de *F. hepatica* foram adicionados em amostras de 1 g de fezes de bovinos e ovinos. A cada amostra adicionaram-se 2, 4, 8, 16 e 32 ovos. Com cada um desses valores, foram realizados exames em dez amostras de fezes de bovinos e ovinos, totalizando 100 exames.

Neste teste, examinou-se somente o sedimento do tamis de 250 malhas/polegada; o processamento das amostras foi idêntico ao dos testes anteriores.

Nos dois primeiros testes realizados, os ovos utilizados foram coletados da vesícula biliar dos bovinos, enquanto, no terceiro e quarto testes, utilizaram-se ovos retirados diretamente do útero de fascíolas adultas.

Após o término dos testes básicos, os procedimentos realizados com a utilização do conjunto de quatro tamises receberam a denominação de técnica de quatro tamises.

Técnica de quatro tamises

Materiais

- Solução detergente a 10%.
- Frasco com tampa, com capacidade de 80 a 100 ml, e bastão.
- Tamises com telas metálicas de 100, 180, 200 e 250 malhas/polegada, com aberturas de 174, 96, 87 e 65 μm , respectivamente.
- Placa-de-petri medindo 9 cm de diâmetro, riscada com linhas paralelas, com lápis de diamante.
- Pipeta Pasteur com pêra de borracha e abertura de 1,5 mm de diâmetro.
- Corante (verde de metila a 0,5%).
- Estereomicroscópio.

Procedimentos

- Pesar 1 g de fezes e colocar em um frasco com capacidade para 100 ml. Diluir em 30 ml de água da torneira, com cinco gotas de solução detergente.
- Homogeneizar o conteúdo, agitando-o por 1 ou 2 minutos. Passar no conjunto de tamises (encaixados uns nos outros).
- Lavar em água corrente lenta, descartando-se, um por um, os três primeiros tamises e recolher o material do último tamis (250 malhas/polegada) em uma placa-de-petri, utilizando-se um fino jato d'água no sentido inverso do tamis.
- Esperar 2 minutos e retirar, sem agitar o sedimento, o excesso da água da placa com pipeta Pasteur.

- Adicionar uma a duas gotas de verde de metila a 0,5%.

- Examinar ao estereomicroscópio com aumento de 20 ou 40 vezes.

A quantidade de ovos encontrada na placa representa o número de ovos por grama de fezes (o.p.g.).

Em se tratando de fezes de ovinos, primeiramente, deve-se triturá-las com bastão.

Para análise dos dados, utilizou-se a estatística descritiva (média aritmética e desvio padrão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste preliminar para a seleção dos tamises, verificou-se que os tamises de 100, 150, 180 e 200 malhas/polegada, com aberturas de 174, 119, 96 e 87 μm , respectivamente, permitiram a passagem de ovos de *F. hepatica* e os de 250 e 300, com aberturas de 65 e 56 μm , retiveram estes ovos (Tabela 1).

Optou-se pelos tamises de 100, 180, 200 e 250 malhas/polegadas, baseando-se no fato de que os três primeiros deixaram passar através de suas malhas, ovos de *F. hepatica*, e retiveram fibras fecais de tamanho variado, de acordo com as aberturas das malhas; o tamis de 250 malhas/polegada, com abertura de 65 μm , reteve estes ovos.

Nos testes realizados com a técnica de quatro tamises, observou-se que, ao se acrescentar 200 ovos de *F. hepatica*, coletados da vesícula biliar em fezes de bovinos, a recuperação de ovos nas repetições executadas variou de 63% a 76%, com uma média de 70%, aproximadamente, no tamis de 250 malhas/polegada (Tabela 2). Ao se acres-

TABELA 1. Passagem e retenção de ovos de *F. hepatica* nos tamises.

Tamises		Ovos de <i>F. hepatica</i>
Malhas/polegada	Abertura (μm)	
100	174	P
150	119	P
180	96	P
200	87	P
250	65	NP
300	56	NP

P = Passam

NP = Não passam

centar 400 ovos, a recuperação média foi de 64%, variando de 57% a 71,5%. Examinou-se, também, o sedimento de cada tamis, e verificou-se que os tamises de 100 e 180 malhas/polegada não retiveram ovos e que o tamis de 200 malhas/polegada reteve 4,9% de ovos (Tabela 2).

Quando se utilizaram estes mesmos testes empregando-se a técnica de Dennis et al. (1954), obteve-se uma recuperação média de 60%, com a adição de 200 e 400 ovos (Tabela 3).

Os resultados obtidos pela técnica de quatro tamises são semelhantes aos de Parfitt & Banks (1970) que, utilizando 24 alíquotas de uma amostra de fezes de bovino contendo uma média de 84 o.p.g., verificaram uma recuperação de 68,4%, pela técnica de sedimentação. Discordam, entretanto, dos achados de Dorsman (1956) que, utilizando a técnica de tamisação, recuperou todos os ovos de *F. hepatica* adicionados em fezes de bovinos. Nesta técnica, o autor empregou um fator de

TABELA 2. Recuperação de ovos de *F. hepatica* adicionados em fezes de bovinos, utilizando-se o conjunto de quatro tamises.

Número da repetição	Número de ovos									
	Adicionados	Recuperados				Adicionados	Recuperados			
		100*	180*	200*	250*		100*	180*	200*	250*
1	200	-	-	9 (4,5)	140 (70,0)	400	-	-	32 (8,0)	284 (71,0)
2	200	-	-	12 (6,0)	152 (76,0)	400	-	-	13 (3,3)	286 (71,5)
3	200	-	-	11 (5,5)	128 (64,0)	400	-	-	20 (5,0)	260 (65,0)
4	200	-	-	4 (2,0)	150 (75,0)	400	-	-	18 (4,5)	233 (58,8)
5	200	-	-	4 (2,0)	136 (68,0)	400	-	-	24 (6,0)	227 (56,8)
6	200	-	-	12 (6,0)	126 (63,0)	400	-	-	24 (6,0)	242 (60,5)
Total	1.200	-	-	52 (4,3)	823 (69,3)	2.400	-	-	131 (5,5)	1.543 (63,9)
Média	-	-	-	8,7	138,7	-	-	-	21,8	255,7
Desvio padrão	-	-	-	3,8	10,9	-	-	-	6,5	25,2

* Malhas/polegada

Os números entre parênteses correspondem à percentagem.

TABELA 3. Recuperação de ovos de *F. hepatica* adicionados em fezes de bovinos, utilizando-se a técnica de Dennis et al. (1954).

Número da repetição	Número de ovos			
	Adicionados	Recuperados	Adicionados	Recuperados
1	200	132 (66,0)	400	252 (63,0)
2	200	108 (54,0)	400	221 (55,3)
3	200	101 (50,5)	400	247 (61,8)
4	200	125 (62,5)	400	268 (67,0)
5	200	130 (65,0)	400	240 (60,0)
6	200	126 (63,0)	400	242 (60,5)
Total	1.200	722 (60,2)	2.400	1.470 (61,3)
Média	-	120,3	-	245
Desvio padrão	-	12,7	-	15,4

Os números entre parênteses correspondem à percentagem.

multiplicação e obteve, portanto, o.p.g. estimado, o que não ocorreu com a técnica desenvolvida na presente pesquisa, em que o o.p.g. foi encontrado examinando-se todo o sedimento.

Parfitt & Banks (1970), examinando o material descartado de cada amostra, observaram que 31,6% dos ovos de *F. hepatica* foram perdidos nos vários estádios da técnica. Whitlock (1950) observou uma perda de 10% de ovos de trematódeos na pipeta utilizada para enchimento da câmara, na técnica de flutuação por ele desenvolvida. No presente trabalho, observou-se que a pipeta usada para retirar o excesso de água na placa-de-petri, resultante da lavagem do tamis ao recolher o sedimento, reteve aproximadamente 3% dos ovos de *F. hepatica*; o tamis de 200 malhas/polegada reteve 4,9%.

Observa-se na Tabela 4 que, nos testes realizados com a adição de 200 ovos coletados do útero de fascíolas adultas, a recuperação variou de 49% a 67,5%, com uma média de 58,4%. Esta menor diferença na recuperação, comparada à verificada quando se adicionaram ovos da vesícula biliar (70%), poderá ser atribuída ao fato de que estes

TABELA 4. Percentagem de recuperação de ovos de *F. hepatica* adicionados em fezes de bovinos no tamis de 250 malhas/polegada (65 μ m de abertura).

Número da repetição	Número de ovos		Percentagem
	Adicionados	Recuperados	
1	200	115	57,5
2	200	130	65,0
3	200	130	65,0
4	200	109	54,5
5	200	98	49,0
6	200	114	57,0
7	200	101	50,5
8	200	110	55,0
9	200	106	53,0
10	200	135	67,5
11	200	133	66,5
12	200	121	60,5
Total	2.400	1.402	58,4
Média	.	116,8	.
Desvio padrão	.	12,8	.

ovos poderiam ter sido retidos no tamis de 200 malhas/polegada.

Ao se adicionar, em dez repetições, 2, 4, 8, 16 e 32 ovos de *F. hepatica* em fezes de bovinos, a recuperação variou de 50% a 75%. Ovos de *F. hepatica* foram recuperados em nove amostras contendo dois ovos e em todas as amostras contendo 4, 8, 16 e 32 ovos em fezes de bovinos. Em fezes de ovinos, houve recuperação de ovos em nove amostras das dez repetições, contendo dois e quatro ovos, respectivamente, e em todas as amostras contendo 8, 16 e 32 ovos.

A maior percentagem (75%) foi observada quando se adicionaram dois ovos nas amostras fecais. Ao se acrescentar 32 ovos, observou-se menor percentagem de ovos recuperados, aproximadamente 50% (Tabela 5). Quando se adicionou igual número de ovos em fezes de ovinos, a recuperação foi inferior à verificada em fezes de bovinos, variando de 38% a 47% (Tabela 5 e Fig. 9). Isto é atribuído ao fato de que, nas fezes de ovinos, verifica-se maior quantidade de fibras fecais (Fig. 11 e 12) do que em fezes de bovinos (Fig. 9 e 10), dificultando a visualização dos ovos, e que, na maioria das vezes, os ovos apresentavam-se sob aglomerado de fibras (Fig. 14) e só eram detectados com o auxílio de um estilete, que afastavam estas fibras, que flutuavam no líquido, possibilitando assim a contagem. Também foram vistos ovos presos às fibras (Fig. 13) e eram facilmente detectados, com a coloração do sedimento.

Happich & Boray (1969), em estudos comparativos entre a técnica de flutuação de Whitlock (1950) e a de sedimentação de Boray & Pearson (1960), adicionaram em 75 amostras de 3 g de fezes de ovinos 30, 300 e 3.000 ovos, respectivamente, examinando as amostras por ambas as técnicas. Verificaram que, pela técnica de sedimentação, aproximadamente, 1/3 dos ovos foram recuperados, enquanto que pela técnica de flutuação apenas 1%. Os autores observaram que ambas as técnicas podem ser usadas com razoável segurança se as fezes contiverem 1.000 ou mais o.p.g. Maior percentagem de recuperação, aproximadamente 40%, foi observada pela técnica de sedimentação com a adição de três gotas de detergente.

Segundo Dennis et al. (1954), o detergente põe a matéria fecal em solução mais rapidamente, des-

TABELA 5. Recuperação de ovos de *F. hepatica* em fezes de bovinos e ovinos, utilizando-se o conjunto de quatro tamises.

Número de ovos adicionados	Amostras examinadas (repetições)	Número de exames positivos	Ovos recuperados			Número de exames positivos	Ovos recuperados		
			Bovinos				Ovinos		
			Total	Média	Desvio padrão		Total	Média	Desvio padrão
2	10	9	15 (75,0)	1,5	0,7	9	9 (45,0)	0,9	0,0
4	10	10	22 (55,0)	2,2	0,6	9	15 (37,5)	1,5	1,0
8	10	10	52 (65,0)	5,2	0,6	10	37 (46,3)	3,7	0,9
16	10	10	83 (51,9)	8,3	2,4	10	66 (41,3)	6,6	1,5
32	10	10	159 (49,7)	15,9	4,7	10	151 (47,2)	15,1	3,4

Os números entre parênteses correspondem à percentagem.

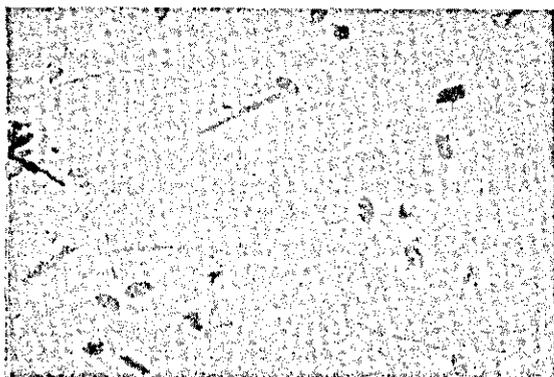


FIG. 9. Técnica de quatro tamises. Sedimento de material fecal de bovino. Campo microscópico claro. Ovos de *F. hepatica* facilmente detectados (30 x).

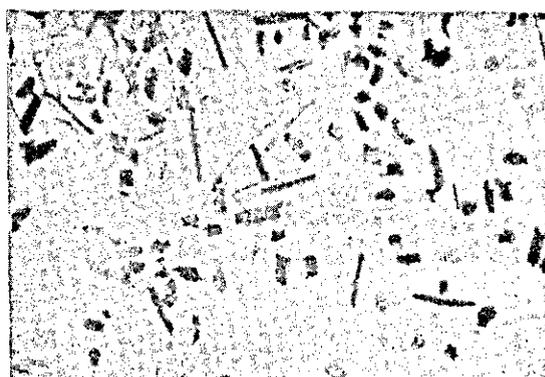


FIG. 10. Técnica de quatro tamises. Sedimento de material fecal de bovino. Ovos de *F. hepatica* e fibras fecais (30 x).



FIG. 11. Técnica de quatro tamises. Sedimento de material fecal de ovino. Maior quantidade de fibras. Ovos de *F. hepatica* presos às fibras (30 x).



FIG. 12. Técnica de quatro tamises. Sedimento de material fecal de ovino. Fibras e ovos de *F. hepatica* em placa-de-petri riscada (30 x).



FIG. 13. Técnica de quatro tamises. Sedimento de material fecal de ovino. Ovo de *F. hepatica* preso em aglomerado de fibras (70 x).

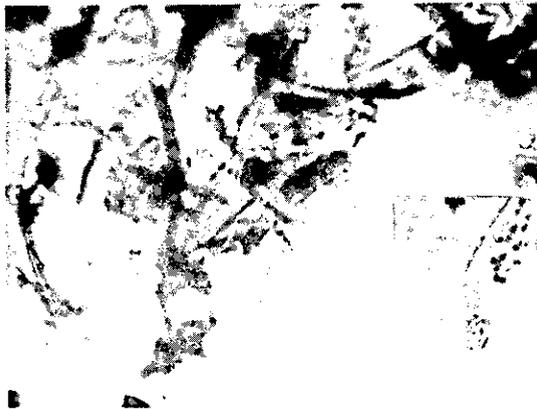


FIG. 14. Técnica de quatro tamises. Sedimento de material fecal de ovino. Ovo de *F. hepatica* sob aglomerado de fibras. Ovo de *F. hepatica* no início da oviposição (inserido) (70 x).

prende os ovos das fibras fecais e da matéria coloidal, permitindo que um número máximo de ovos seja levado pela suspensão, através do tamis.

Com base nas investigações de Happich & Boray (1969), adotou-se o uso de detergente na presente pesquisa, adicionando-se cinco gotas de solução detergente a 10% nas amostras fecais. A função do detergente, mencionada por estes autores, foi também observada no presente trabalho.

CONCLUSÕES

1. A técnica de quatro tamises mostrou-se eficiente no diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose crônica dos ruminantes.
2. A técnica de quatro tamises é adequada tanto para uso em laboratório como em campo.

REFERÊNCIAS

- BENDEZU B., P. & LANDA H., A. Distomatosis hepáticas; epidemiología y control. Bol. Div. Univ. Nac. M. San Marcos; IVITA, (14):1-32, 1973.
- BORAY, J.C. Fasciolosis in sheep. In: REFRESHER COURSE FOR VETERINARIANS, Sydney, Austrália, 1981. Refresher course on sheep. Sydney, The Univ. of Sydney, s.d.
- BORAY, J.C. & PEARSON, I.G. The anthelmintic efficiency of tetrachlorodifluoroethane in sheep infested with *Fasciola hepatica*. Aust. Vet. J., 36: 331-7, 1960.
- DENNIS, W.R.; STONE, W.M. & SWANSON, L.E. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. J. Am. Vet. Med. Assoc., 124:47-50, 1954.
- DORSMAN, W. A new technique for counting eggs of *Fasciola hepatica* in cattle faeces. J. Helminthol., 30:165-72, 1956.
- HAPPICH, F.A. & BORAY, J.C. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. Aust. Vet. J., 45: 326-8, 1969.
- PARFITT, J.W. & BANKS, A.W. A method for counting *Fasciola* eggs in cattle faeces in the field. Vet. Rec., 87(7):1802, 1970.
- SWANSON, L.E. & HOPPER, H.H. Diagnosis of liver fluke infection in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 117:127-9, 1950.
- TAYLOR, E.L. Fascioliasis and the liver fluke. Rome, FAO, 1964.
- UENO, H. & ALVAREZ, J.M.V. Manual de laboratorio para el diagnóstico de helmintos en rumiantes. Santo Domingo, Univ. Autónoma de Santo Domingo Press, 1971.
- WHITLOCK, H.V. A technique for counting trematode eggs in sheep faeces. J. Helminthol., 24(1/2):47-52, 1950.
- WILLMOTT, S. & PESTER, F.R.N. Variations in faecal egg-counts in paramphistome infections as determined by a new technique. J. Helminthol., 26:147-56, 1952.