

INTERFÉRENCE ENTRE VERMIFUGATION ET IMMUNITÉ DANS LES STRONGYLOSES GASTRO-INTESTINALES DU MOUTON

G. LUFFAU, P. PERY et C. CARRAT

Avec la collaboration technique de R. LHORTOLARY

Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, INRA, 78850 Thiverval-Grignon, France

Summary

INTERFERENCES BETWEEN ANTHELMINTHICS AND IMMUNITY IN OVINE GASTRO-INTESTINAL STRONGYLOSIS. — Groups of very similar sheep (breed, sex, age, hemoglobin type, family) were immunised against *H. contortus* by repeated infections. Self-cure and immune reactions expelled parasites but some of them still remain in the gut of animals; they have been expelled by dosage of anthelmintics. Animals were challenged; a discrepancy exists between numbers of eggs passed in each group (immune drenched animals, immune non-drenched animals and non-immune animals); the best fitting estimated equation on experimental values (or on moving average points) is used for statistical tests. Immunity vanishes partly (or totally) when animals have been drenched; a residual population of worms is thought to be responsible for immunity because of a permanent booster.

Les ruminants acquièrent progressivement une immunité contre leurs parasites comme le montre l'épidémiologie ou l'expérimentation (Urquhart, 1980; Luffau, 1981), mais cette immunité semble être fortement altérée et même disparaître à la suite de vermifugations (Armour, 1980; Gibson, 1980; Wagland *et al.*, 1967).

Des moutons faisant partie d'un lot extrêmement homogène quant à leur origine et leur patrimoine génétique ont été immunisés contre *Haemonchus contortus*, nématode dont les formes adultes vivent dans le tube digestif. La présence du parasite entraîne une réponse immunitaire locale : sécrétion d'anticorps (Charley *et al.*, 1984), modification des populations cellulaires de la lignée blanche dans la muqueuse digestive. L'immunité disparaît après une expulsion totale de la population de vers (vermifugation). La présence des populations résiduelles de vers fournit peut-être l'explication du mécanisme de la résistance observée.

Matériel et Méthodes

Animaux d'expérience

Les moutons utilisés de race Romanov, tous de sexe femelle provenaient de la SAGA-INRA, Toulouse (domaine de Langlade). A leur arrivée, ils étaient âgés de cinq mois; la différence d'âge entre chacun d'eux n'excédait pas quatre semaines. Leur parenté, leurs types d'hémoglobines étaient exactement connus. Tous les animaux, quoique indemnes de parasites, furent vermifugés systématiquement (100 mg/kg de thiabendazole) afin d'éliminer toute infestation éventuelle. Ils furent ensuite entretenus sur caillebotis, nourris de foin, d'aliments composés, de paille à volonté.

Parasites

La souche de parasites nous a été aimablement donnée (1972) par le Professeur G.M. Urquhart et le Professeur E.W. Allonby (École Vétérinaire de Glasgow, GB) puis entretenue dans notre laboratoire selon la méthode de F.J.S. Roberts et P.J. O'Sullivan (1950). En bref, les crottes prélevées sur des animaux infestés sont déposées pendant 15 à 20 jours, dans une enceinte

humide à 24 °C. Les larves sont alors récoltées à l'aide d'un appareil de Baerman.

Techniques parasitologiques

La détermination du nombre d'œufs par gramme (OPG) était effectuée selon la technique de Mac Master (Whitlock, 1948) sur des crottes prélevées directement dans le rectum des animaux.

Méthodes statistiques

Le tracé des courbes d'élimination des œufs a été obtenu par lissage selon la méthode des moyennes mobiles (Rouquette et Schwartz, 1970; Chamussy *et al.*, 1974). En bref, la méthode consiste à porter en ordonnées, au jour «i», la moyenne arithmétique «zi» entre le nombre d'œufs émis au jour «i», le nombre d'œufs émis au cours des prélèvements précédents au jour (i-1) et le nombre d'œufs émis au cours des prélèvements suivants au jour (i + 1) soit :

$$z_i = [y(i - 1) + y_i + y(i + 1)] / 3$$

Cette méthode permet de filtrer les grandes fluctuations aléatoires qui constituent le «bruit» de fond dans tous les phénomènes biologiques et de déterminer un mouvement général de croissance ou de décroissance (tendance) des variations du phénomène étudié en fonction du temps (série chronologique).

Lorsque l'élimination des œufs atteint un plateau, on compare le nombre d'œufs émis par les animaux de chacun des groupes (traités, non traités, témoins) sur les droites de régression d'élimination des œufs obtenus par la méthode des moindres carrés.

Protocole expérimental et Résultats

Des agnelles âgées de 8 mois ont été soumises à des infestations répétées (5 fois à 35 jours d'intervalle) en dehors de toutes vermifugations. A l'issue de ces infestations (la dernière dose de larves administrée était de 10 000 larves par animal), les animaux furent répartis au hasard en deux groupes : les animaux du groupe AH⁺ furent vermifugés (60 mg/kg de thiabendazole pur, Thibenzole poudre à 50 %, Merck-Sharp and Dohme, Paris, France, puis, 48 heures après, 10 ml/animal d'oxfendazole pur, Synanthic suspension à 2,26 %, Institut Mérieux, Lyon, France), tandis que ceux du groupe AH⁰ ne le furent pas. Vingt jours après la date de la vermifugation les animaux, auxquels on a joint un groupe T d'animaux neufs indemnes de tout passé parasitaire, reçoivent 10 000 L₃ (dose d'épreuve destinée à révéler l'état d'immunité des animaux après traitement); des numérations d'œufs sont alors effectuées deux fois par semaine.

Nous étudierons les taux d'élimination des œufs sur les courbes définies dans le chapitre Matériel et Méthodes — méthodes statistiques. Les résultats seront exposés :

- a) Globalement, selon que les animaux furent vermifugés (AH⁺) ou non (AH⁰).
- b) Après regroupement des animaux selon le

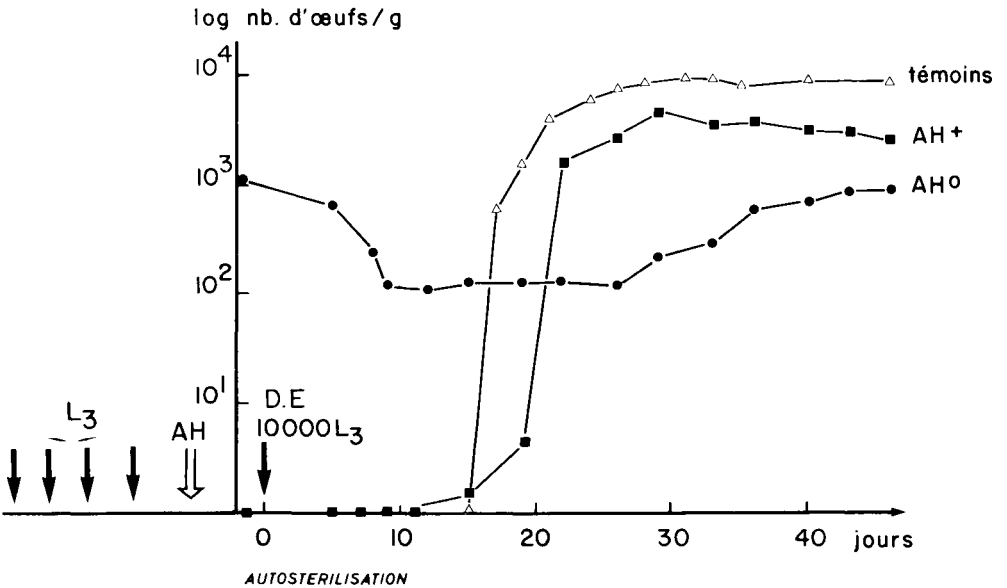


Fig. 1. — Nombre d'œufs éliminés (par gramme de crottes) par des moutons vermifugés (AH⁺) ou non vermifugés (AH⁰) puis infestés (groupe T, témoins) ou réinfestés (groupe AH⁰ et AH⁺) par *H. contortus*.

phénotype de leurs hémoglobines (Hb. AA, Hb. AB, Hb. BB) et selon qu'ils furent vermifugés ou non.

c) Après regroupement des animaux selon des familles (définies par leur ascendance paternelle) et selon qu'ils furent vermifugés ou non.

A — Comparaison du nombre d'œufs émis par les animaux des groupes AH' et des animaux des groupes AH⁰.

Chez les animaux du groupe AH⁰ (porteurs de parasites au moment de la réinfestation) le nombre d'œufs baisse rapidement après la dose d'épreuve, atteint le chiffre minimum à $j + 26$ (autostérilisation) puis augmente lentement pour atteindre une valeur stable (plateau) à partir de $j + 35$. Chez les animaux du groupe AH' (débarrassés de leurs parasites au moment de la dose d'épreuve), les premiers œufs apparaissent dès $j + 18$ puis leur nombre augmente rapidement. Chez les animaux du groupe T, les premiers œufs apparaissent à $j + 18$ et leur nombre augmente rapidement pour se maintenir en plateau à partir de $j + 25$ (fig. 1).

Les animaux préalablement infestés, vermifugés ou non (nb : 50) éliminent en moyenne moins d'œufs que les témoins (nb. d'animaux : 18) et parmi les animaux préalablement infestés, les animaux non vermifugés AH⁰ (nb : 26) éliminent en moyenne moins d'œufs que les animaux vermifugés AH' (nb. d'animaux : 24), comme cela apparaît dans le tableau 1 et dans le tableau 2 qui indiquent le degré de signification statistique.

B — Comparaison du nombre d'œufs éliminés chez les animaux des groupes AH⁰ et des groupes AH' regroupés selon le phénotype de leur hémoglobine.

Les animaux ont été regroupés selon les types de leurs hémoglobines (nb. d'animaux AA : 16 ; nb. d'animaux BB : 17 ; nb. d'animaux AB : 17). Chaque groupe comporte des animaux vermifugés (nb. : 8) et des animaux non vermifugés (nb. : 9, dont un mort dans le groupe Hb. AA).

Après réinfestation, quel que soit le groupe considéré, le nombre d'œufs éliminés est, en moyenne, moindre chez les animaux préalablement infestés non vermifugés (tabl. 1 et 2).

C — Comparaison du nombre d'œufs éliminés chez les animaux des groupes AH' et chez les animaux des groupes AH⁰ regroupés par familles.

Les agnelles se répartissaient en huit familles à l'intérieur desquelles elles étaient toutes demi-sœurs. Dans chaque famille une partie des animaux étaient vermifugés, l'autre non ; la répartition des animaux fut plus difficile et un déséquilibre entre les groupes ne put être évité. Cepen-

dant, dans chaque famille les animaux préalablement infestés (vermifugés ou non) éliminent en moyenne moins d'œufs que les témoins et les animaux non vermifugés moins que les animaux vermifugés (tabl. 1 et 2).

Nous n'avons retenu ici que deux familles : N° 645 AH⁰, 3 animaux ; AH', 6 animaux ; N° 828 AH⁰, 3 animaux ; AH', 3 animaux.

Les expériences que nous venons de relater ci-dessus ont été répétées selon le même protocole trois fois de suite chez les mêmes animaux ; les résultats obtenus sont similaires.

D — Comparaison des pourcentages des animaux qui éliminent des œufs dans le groupe AH' et dans le groupe AH⁰.

Les animaux sont affectés d'un index, I , qui tient compte du nombre d'œufs qu'ils éliminent. Si le nombre d'œufs/gramme de crottes est compris entre 0 et 100 : $I = 0$, s'il est compris entre 100 et 1000 : $I = 0,5$, s'il est supérieur à 1000 : $I = 1$. La somme des index est rapportée au nombre d'animaux dans le groupe ; on obtient ainsi le pourcentage des animaux qui éliminent des œufs.

Le pourcentage des agnelles qui éliminent beaucoup d'œufs après réinfestation est plus grand parmi les agnelles immunisées, vermifugées puis réinfestées (AH') que parmi les agnelles immunisées non vermifugées mais réinfestées (AH⁰) (fig. 3).

Discussion

Des animaux soumis à des infestations répétées deviennent de moins en moins réceptifs à ce parasite ; nos résultats montrent clairement que des moutons infestés, ici, cinq fois à cinq semaines d'intervalle par *H. contortus* puis soumis à une dose d'épreuve, éliminent moins d'œufs que des animaux neufs indemnes de tout passé parasitaire (Luffau *et al.*, 1981). Ils se sont immunisés.

L'appréciation que nous avons du phénomène est basée sur l'élimination des œufs ; nous considérons que les animaux sont d'autant plus immuns qu'ils éliminent moins d'œufs. Nous avons en effet montré (de Cara, 1983 ; Luffau *et al.*, 1983) que les phénomènes qui se développent dans l'intestin au cours de l'infestation entraînent une répression de la ponte des femelles de *H. contortus* ; les tendances (Chamussy *et al.*, 1974) qui s'expriment sur les courbes d'élimination du nombre d'œufs en fonction du temps permettent de suivre les phénomènes immunitaires et d'établir des différences entre les groupes. Il est indubitable que seul le nombre de vers qui peut encore s'installer chez un animal immu-

Tableau 1. — Nombre d'œufs (par gramme de crottes) éliminés aux jours J + 33, J + 36, J + 40 par des moutons vermifugés (AH⁺) ou non (AH⁰) puis infestés (groupe T, témoins) ou réinfestés (groupes AH⁰ et AH⁺) par *H. contortus*.

Les nombres d'œufs qui figurent sont des valeurs lissées; les chiffres () colonne J + 33 indiquent le nombre d'animaux dans le groupe.

Groupes	Animaux préalablement infestés					
	AH ⁰			AH ⁺		
	j + 33	j + 36	j + 40	j + 33	j + 36	j + 40
Tous les animaux	295 (26)	599	685	3 405 (24)	3 731	3 347
Phénotypes Hb						
AA	90 (8)	238	320	926 (8)	1 393	1 255
AB	521 (9)	794	753	5 445 (8)	5 749	5 379
BB	238 (9)	712	942	3 912 (8)	4 051	3 408
Famille						
645	0 (3)	0	16	5 166 (6)	5 263	3 727
828	425 (3)	525	1 575	2 717 (3)	2 933	2 583

Groupes	Animaux neufs		
	T		
	j + 33	j + 36	j + 40
Tous les animaux	9 475 (18)	9 587	7 846
Phénotypes Hb			
AA	7 820 (6)	8 541	8 041
AB	9 861 (6)	9 598	7 230
BB	10 743 (6)	10 621	8 266
Familles			
645	9 475 (18)	9 587	7 846
828	9 475 (18)	9 587	7 846

Tableau 2. — Appréciation par la table du t de Student des différences observées dans l'élimination des œufs entre les groupes au risque α : 20 %.

Groupes	Comparaisons groupes à groupes		
	AH ⁰ /T	AH ⁺ /T	AH ⁰ /AH ⁺
Tous les animaux	****	****	****
Phénotypes Hb			
AA	****	****	NS
AB	****	**	****
BB	****	**	*
Familles			
645	****	****	**
828	****	****	*

**** : degré de signification de 0,001;

*** : degré de signification 0,001 à 0,01;

** : degré de signification 0,01 à 0,02;

* : degré de signification 0,02 à 0,05.

NS: non significatif.

nisé donne la vraie mesure de l'immunité acquise ; cette méthode aurait supposé l'autopsie des animaux.

Par ailleurs, les animaux utilisés constituent déjà un lot très homogène quant à la race, l'origine, le sexe, les conditions d'entretien ; à l'intérieur de ce lot, des groupes ont pu être définis en tenant compte du phénotype des hémoglobines et de l'ascendance paternelle des animaux. Dès lors, des comparaisons peuvent être faites

entre animaux traités et animaux non traités soit dans le lot pris dans son ensemble, soit dans les groupes que nous venons de définir, ce qui augmente, dans l'interprétation statistique, la puissance de nos tests de comparaison en diminuant la variance.

L'immunité qui s'installe peut être altérée en différentes circonstances, la vermifugation par exemple (Gibson, 1980). L'expérience montre que parmi les animaux immunisés (les uns ayant été

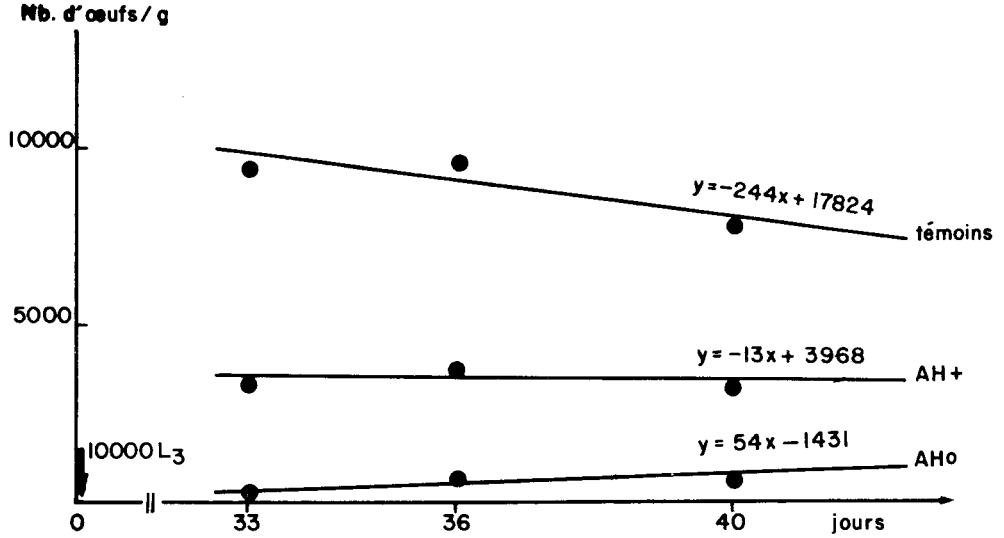


Fig. 2. — Droites de tendance (moindres carrés estimés par les moyennes mobiles de 3 valeurs pondérées des jours + 33, + 36, + 40). T témoins; AH⁺ vermifugés et réinfestés; AH⁰ non vermifugés mais réinfestés.

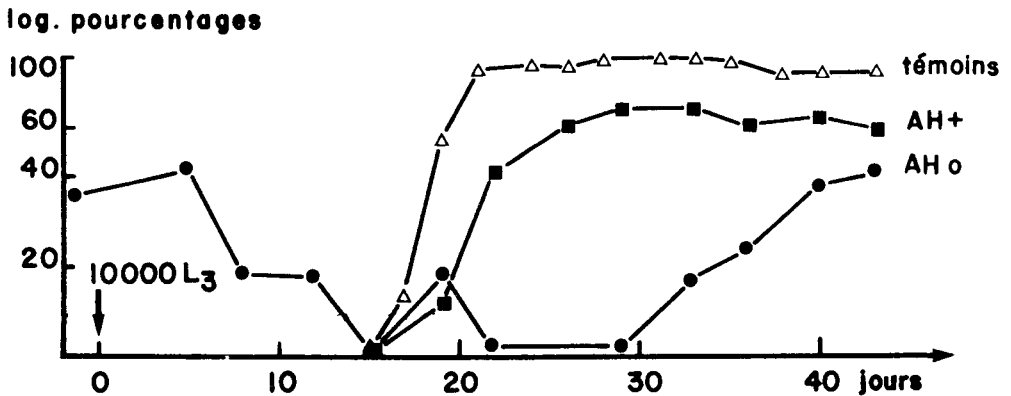


Fig. 3. — Pourcentage des moutons qui éliminent des œufs après réinfestations, selon qu'ils ont été vermifugés (AH⁺) ou qu'ils ne l'ont pas été (AH⁰).

vermifugés donc totalement débarrassés de leurs parasites, les autres ne l'ayant pas été), ceux qui ont été vermifugés perdent tout ou partie de leur immunité tandis que ceux qui ne l'ont pas été restent immuns; c'est ce que révèle la dose d'épreuve (c'est-à-dire la réinfestation). Nous ne retiendrons pas ici, pour expliquer ces résultats, les propriétés immunomodulatrices invoquées pour certaines molécules utilisées comme anthelminthique (propriétés immunostimulantes du lévamisole; propriétés anti-inflammatoires du thiabendazole: Van Arnen, 1975) car nous avons apprécié l'effet du traitement huit semaines après la vermifugation, soit cinq semaines après la dose d'épreuve; toute activité pharmacodynamique résiduelle peut être exclue. Des expériences antérieures (non publiées) nous ont montré, chez le rat infesté par *N. brasiliensis* ou chez le mouton infesté par *H. contortus*, que l'activité immunomodulatrice est négligeable dans cette situation. Par contre, on sait que dans certaines maladies bactériennes (tuberculose, brucellose) ou certaines maladies à Protozoaires (piroplasmoses s.l.) la résistance est liée à la présence (prémunition) de l'agent pathogène (Armour, 1980; Benitez-Usher *et al.*, 1977; Wagland *et al.*, 1967). L'immunité ne persisterait, dans les strongyloses gastro-intestinales, que dans la mesure où subsisteraient quelques parasites; les vermifuges actuels, de haute efficacité, éliminent la population de vers dans sa totalité et altèrent donc l'immunité acquise.

Les expériences reportées ici ne permettent pas de préjuger des mécanismes mis en jeu et de savoir si le plus important d'entre eux relève de l'activité des anticorps ou d'une immunité à médiation cellulaire. Cependant on sait que, chez les animaux parasités, la sécrétion locale d'immunoglobulines est importante (IgA chez le rat infesté par *N. brasiliensis* (Poulain, 1976); IgA et IgC chez les moutons infestés par *H. contortus* (Charley *et al.*, 1983; Smith, 1977)), mais le taux baisse rapidement en dehors de toute réinfestation; tout se passe comme si un rappel permanent (Urquhart, 1980) était nécessaire. On sait également qu'au moment du phénomène d'autostérilisation, que ce soit chez les rongeurs de laboratoire ou chez le mouton, des modifications importantes intéressent les cellules de la lignée blanche apparaissent dans la muqueuse digestive (Guy-Grand *et al.*, 1984); ces perturbations sont sous contrôle thymique par le truchement de l'activité d'interleukines (Filho *et al.*, 1983). Les réactions à médiation cellulaire apparaissent préférentiellement lorsque seules de faibles quantités d'antigène sont disponibles ce qui semble bien être le cas dans les infestations parasitaires.

Enfin si, en moyenne, lors de réinfestations le nombre d'œufs éliminés par les animaux vermifugés est supérieur à celui éliminé par les animaux

non vermifugés, la proportion d'animaux qui éliminent des œufs est également plus grande. Ce résultat est important du point de vue de l'épidémiologie: les vermifugations abusives des animaux soumis à des réinfestations permanentes (c'est-à-dire en milieu contaminé) contribuent à une augmentation du taux de contamination du pâturage.

Il est à noter que nos expériences ont été conduites chez des animaux adultes; les animaux jeunes s'immunisent difficilement avant l'âge de 7 mois (Urquhart *et al.*, 1966). Il serait donc illusoire de maintenir de jeunes agneaux sur des pâturages contaminés sans avoir recours aux mesures prophylactiques usuelles et, en particulier, aux vermifugations périodiques.

Conclusions

Des infestations répétées par *H. contortus* laissent les animaux partiellement immuns; l'expérimentation confirme les données épidémiologiques. Lors des réinfestations une partie de la population parasitaire existante est éliminée; il reste une infestation latente qui est responsable des phénomènes de résistance observés. En effet par vermifugation on supprime une partie et même la totalité de la résistance. Il s'agit donc de prémunition en effet la population de vers résiduelle entraîne des réactions immunitaires dans lesquelles sont impliqués des anticorps (IgA, IgG) et des cellules de la lignée blanche.

D'un point de vue pratique, la vermifugation des animaux au pâturage doit être un acte raisonné car il affecte l'épidémiologie de la maladie par ses répercussions sur la réceptivité des animaux et par la contamination des pâturages.

Reçu le 27 avril 1984.

Accepté le 17 mai 1984.

Remerciements

Les résultats exposés ici représentent une partie du travail entrepris dans le cadre de l'ATP: INRA - Pathologie et Génétique, 1980. M. Ricordeau, Mme Vu Tien Khang (Station d'Amélioration Génétique des Animaux, INRA, Toulouse) ont sélectionné les animaux; M. Guérin, M. Nguyen (Laboratoire de Génétique Moléculaire, INRA, Jouy-en-Josas) ont effectué la caractérisation des hémoglobines. Nous les en remercions bien vivement.

Résumé

Des moutons, répartis en lots très homogènes (race, âge, sexe, phénotypes des hémoglobines, familles) ont été immunisés contre *H. contortus* au cours d'une série d'infestations. Les populations résiduelles de vers adultes qui subsistaient après autostérilisation et réactions immunitaires ont été éliminées par vermifugation. Les animaux ont été soumis à une réinfestation (dose d'épreuve). Le nombre d'œufs éliminés avec les crottes est une mesure de l'immunité ; pour interpréter les différences de comportement entre les groupes (immunisés et non vermifugés, immunisés et vermifugés, non immunisés) on a utilisé les droites ajustées par la méthode des moindres carrés estimés sur trois valeurs pondérées journalières (moyennes mobiles) du nombre d'œufs par gramme. La vermifugation supprime tout ou partie de l'immunité acquise ; les populations résiduelles sont responsables d'un phénomène de rappel permanent dans les strongyloses gastro-intestinales des ruminants.

Références

- ARMOUR J., 1980. The epidemiology of helminth disease in farm animals. *Vet. Parasitol.*, **6**, 7-46.
- BENITEZ-USHER C., ARMOUR J., DUNCAN J.L., URQUHART G.M., GETTINBY G., 1977. A study of some factors influencing the immunization of sheep against *Haemonchus contortus* using attenuated larvae. *Vet. Parasitol.*, **3**, 327-342.
- DE CARA H., 1983. *Immunité dans l'haemonchose ovine : étude de l'influence sur la ponte des femelles de Haemonchus*. Thèse de doctorat-Vétérinaire, Toulouse.
- CHAMUSSY H., CHARRE J., DUMOLAR P., DURAND M.G., LE BERRE M., 1974. *Initiation aux méthodes statistiques en géographie*. 114-142, Masson, Paris.
- CHARLEY-POULAIN J., LUFFAU G., PERY P., 1984. Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, **14**, 129-141.
- FILHO M.A., DY M., LEBEL B., LUFFAU G., HAMBURGER J., 1983. *In vitro* and *in vivo* histamine-producing cell-stimulating factor (or IL 3) production during *Nippostrongylus brasiliensis* infection : coincidence with self-cure phenomenon. *Eur. J. Immunol.*, **13**, 841-845.
- GIBSON T.E., PARFITT J.W., EVERETT G., 1970. The effect of anthelmintic treatment on the development of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Res. Vet. Sci.*, **11**, 138-145.
- GIBSON T.E., 1980. Factors influencing the application of anthelmintics in practice. *Vet. Parasitol.*, **6**, 241-254.
- GUY-GRAND D., DY M., LUFFAU G., VASSALI P., 1984. Gut mucosal mast cells : origin, traffic and differentiation. *J. Exp. Med.*, **160**, 12-28.
- LUFFAU G., PERY P., PETIT A., 1981. Self-cure and immunity following infection and reinfection in ovine haemonchosis. *Vet. Parasitol.*, **9**, 57-67.
- LUFFAU G., DE CARA H., CARRAT C., LHORTOLARY R., PERY P., 1983. Mécanismes effecteurs de l'autostérilisation et de l'immunité dans l'haemonchose ovine. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **1**, 51-54.
- POULAIN J., LUFFAU G., PERY P., 1976. *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat : immune response in serum and intestinal secretions. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, **127C**, 215-224.
- ROBERTS F.J.S., O'SULLIVAN P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, **1**, 99-102.
- ROUQUETTE C., SCHWARTZ D., 1970. *Méthodes en épidémiologie*. Flammarion, Paris, 272 pages.
- SMITH W.D., 1977. Anti-larval antibodies in the serum and abomasal mucosa of sheep hyper-infected with *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.*, **22**, 334-338.
- TOURATIER L., 1959. Immunité dans les helminthiases au 16^e congrès mondial vétérinaire. *Bull. Mens. Soc. Vét. Prat. Fr.*, **43**, 234-237.
- URQUHART G.M., 1977. Irradiated vaccines. In A. Capron, P. Pery (eds) *Immunité et affections parasitaires*, 263-273, INSERM, Paris.
- URQUHART G.M., 1980. Application of immunity in the control of parasitic disease. *Vet. Parasitol.*, **6**, 217-240.
- URQUHART G.M., JARRETT W.F.H., JENNINGS F.N., MACINTYRE V.I.M., MULLIGAN W., 1966. Immunity to *Haemonchus contortus* infection. Relationship between age and successful vaccination with irradiated larvae. *Am. J. Vet. Res.*, **27**, 1645-1648.
- VAN ARNEN G.G., CAMPBELL W.C., 1975. Anti-inflammatory activity of tiabendazol and its relation to parasitic disease. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **33**, 303-307.
- WAGLAND B.M., DINEEN J.K., 1967. The dynamics of the host-parasite relationship. 4. Regeneration of the immune response in sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, **57**, 59-65.
- WHITLOCK H.V., 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg counting technique and apparatus. *J. Counc. Ind. Res.*, **21**, 177-180.