

Eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-bencimidazol contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos Pelibuey

Efficacy of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-benzimidazole against different stages of *Fasciola hepatica* in Pelibuey sheep

Norma Rivera Fernández**
Froylán Ibarra Velarde**
Sara Olazarán Jenkins***
Yolanda Vera Montenegro**
Rafael Castillo Bocanegra†
Alicia Hernández Campos†

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the fasciolicide activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthiloxy)-*ih*-benzimidazole called compound alpha against three day, two-, four-, six-, eight- and ten week-old flukes in experimentally infected sheep. Sixty Pelibuey free-fluke sheep were infected each with 150 metacercariae of *F. hepatica per os*. Animals were divided into 12 groups of 5 animals each. All animals were detected positive to *F. hepatica* antibodies by the ELISA test at three week postinfection. Groups 1, 3, 5, 7, 9 and 11 were orally treated with 15 mg/kg of compound alpha on days 2, 4, 6, 8 and 10 weeks postinfection, respectively. Groups 2, 4, 6, 8, 10 and 12 remained as non-treated controls. All sheep were euthanized in order to collect and count the flukes in the liver four weeks after the treatment. Efficacy was assessed as the percentage of fluke reduction in the treated groups in comparison to the control ones. Results showed that compound alpha removed 100% of the flukes in all treated groups. Mean number of flukes in non-treated groups was of 189. Maximum- and minimum number of flukes collected per animal was of 59 and 15, respectively. It is concluded that compound alpha administered *per os* at 15 mg/kg, exerted highly promising efficacy against different evolutive stages of *F. hepatica* in sheep.

Key words: *FASCIOLAHEPATICA*, *PELIBUEY SHEEP*, *TREMATODA*, *COMPOUND ALPHA*, *EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY*.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-bencimidazol denominado compuesto "alfa" contra fasciolas de tres días, dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas de edad, en ovinos infectados experimentalmente. Se utilizaron 60 ovinos de raza Pelibuey, libres de infección por *F. hepatica*. En el día cero todos los animales fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias del parásito por borrego. Los animales fueron divididos en 12 grupos de cinco animales cada uno. Los grupos 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se trataron con el compuesto alfa en suspensión a una dosis oral de 15 mg/kg a los tres días, dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas posinfección, respectivamente. Los grupos 2, 4, 6, 8, 10 y 12 fueron testigos sin tratamiento. A las cuatro semanas postratamiento,

Recibido el 8 de junio de 2001 y aceptado el 12 de septiembre de 2001.

* El presente estudio fue tema de tesis de maestría del primer autor.

** Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

*** Campo Experimental Pecuario del Estado de Puebla (CIPEP) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Hueytamalco, Puebla, México.

† Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

los animales fueron sacrificados para colectar y contar en el hígado el número de fasciolas presentes. La eficacia se midió según el número de trematodos presentes en los grupos tratados con respecto al número de parásitos en los grupos testigo sin tratamiento. Los resultados indicaron una eficacia del 100% en todos los grupos tratados. Los grupos testigo tuvieron un promedio de 189 fasciolas en la necropsia. El máximo y mínimo de trematodos colectados por animal fue de 59 y 15, respectivamente. Se concluye que el compuesto alfa mostró una eficacia altamente prometedora contra fasciolas de diversas edades en ovinos.

Palabras clave: *FASCIOLA HEPATICA*, OVINOS PELIBUEY, TREMATODOS, COMPUESTO ALFA, QUI-
MIOTERAPIA EXPERIMENTAL.

Introduction

Fasciolosis is the main parasitic disease of ruminants, caused by *Fasciola hepatica* in the hepatic parenchyma and bile ducts.¹ Its relevance lies in high economic losses that year by year decreases livestock production.^{2,3} It is estimated that one quarter of worldwide cattle graze in zones where *F. hepatica* is present. This trematode can also infect other mammalian hosts, even mankind, and also may be found as an erratic parasite in the lungs, subcutaneous tissue and in the uterus.³

In the last few years, 2,594 human fasciolosis cases were diagnosed in 42 countries including Argentina, Bolivia, Cuba, France, Peru, Portugal and Puerto Rico, therefore, this trematode is considered as an important zoonosis. When studying fasciolosis one should bear in mind epidemiological and clinical aspects; its enzootic characteristic is presented under favourable conditions when developing in intermediary hosts, namely in *Lymnaea* snails.² There are three ways to control fasciolosis: chemical treatments vs the parasite (fasciolidas), management measures and chemical treatment vs the intermediary host (mollusquicidas). It is important to know that the pathogeny of fasciolosis is presented more frequently when the juvenile stage of the parasite is migrating through the hepatic parenchyma, and not when it is allocated in the bile ducts when adult, and, therefore, the importance of having the correct components indicated vs the immature early stages of the parasite.⁴ Anthelmintic medication, control measures and mollusquicidas are used to control the liver fluke disease. The pathogenicity of this parasite is major when juvenile flukes inflicted trauma by tunneling in the liver, resulting this in highly and fatal clinical illness, so that this is the reason why one must use effective flukicides against young flukes.⁴

During several years, some studies have been carried out to design, synthesize and evaluate different biological compounds with the aim to develop an efficient flukicide.⁵⁻⁷ The 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthiloxy)-*ih*-benzimidazole named compound alpha, when administered orally at 10 and 15 mg/kg, exerted an efficacy of 81% and 87% respectively.⁸ According to these results, other chemical evaluations were carried out to test different doses of this com-

Introducción

La fasciolosis representa la enfermedad hepática parasitaria más importante en los rumiantes, se debe a la presencia y acción del trematodo *Fasciola hepatica* en el parénquima hepático, conductos biliares y vesícula biliar.¹ Esta enfermedad es de distribución mundial. Su relevancia radica en que provoca cuantiosas pérdidas económicas que año tras año merman en forma considerable la producción pecuaria.^{2,3} Se ha estimado que una cuarta parte de la población mundial de ovinos y bovinos pastorean en áreas donde *F. hepatica* está presente y el ambiente es favorable para su mantenimiento y dispersión. Puede presentarse también en caprinos, cerdos, equinos, conejos, ratas, el hombre y varios mamíferos silvestres. Como parásito errático se puede encontrar en pulmón, tejido subcutáneo y útero.³

La presencia del parásito en el hombre no debe de ser subestimada. En los últimos años se diagnosticaron 2 594 casos humanos en 42 países, entre ellos Argentina, Bolivia, Cuba, Perú y Puerto Rico. Este aumento de la prevalencia hace que se le considere como una zoonosis emergente.³ De la fasciolosis deben considerarse los aspectos epidemiológicos y clínicos; el carácter enzoótico de esta enfermedad se presenta bajo condiciones favorables al desarrollo de los hospederos intermediarios, que son caracoles del género *Lymnaea*.² El control de esta enfermedad se puede llevar a cabo mediante tres formas: Tratamientos químicos contra el parásito (fasciolidas), medidas de manejo y tratamientos químicos contra el huésped intermediario (mollusquicidas). Es importante saber que la patogenia de la fasciolosis se manifiesta más frecuentemente cuando el estado juvenil del parásito va migrando por el parénquima hepático y no cuando el verme se encuentra alojado en los conductos biliares en su estado adulto, de ahí la importancia de contar con compuestos indicados contra los estadios inmaduros tempranos del parásito.⁴ Asimismo, el tratamiento con fasciolidas es la práctica más común empleada en campo, teniendo como finalidad eliminar el agente causal de la enfermedad, interrumpir la excreción de los huevos y prevenir la infección de caracoles.⁴

+

pound in sheep⁹, as well as an adequate vehicle to formulate the drug to improve its efficacy.¹⁰

The aim of the present study was to evaluate the efficacy of compound alpha against three day, two-, four-, six-, eight- and ten week-old flukes in experimentally infected sheep.

Materials and methods

Location of the study

The study was undertaken at the Centro Experimental Pecuario del Estado de Puebla (CIPEP) of the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in Mexico.

Animals

Sixty Pelibuey free fluke sheep of indistinct sex between six months and one year of age were used.

Experimental compound

Compound alpha was administered as a 10% suspension formulated with 1.5 g pectin; 0.5 g of carboximethylcellulose (low viscosity) and 0.03 g of propilparabene.¹⁰

Conduction of the study

On day zero, all sheep were infected each with 150 metacercariae of *F. hepatica*, obtained by the infection of *Lymnaea* snails under laboratory conditions, using the method of Vera *et al.*¹¹ Then, the animals were ear tagged and divided into 12 groups of 5 animals each. Six groups (1, 3, 5, 7, 9 and 11) were orally treated with compound alpha at 15 mg/kg against three day, two-, four-, six-, eight- and ten week old flukes. The six remaining groups (2, 4, 6, 8, 10 and 12) were used as non-treated controls.

Serological diagnosis

Three week postinfection with metacercariae blood samples were obtained from the sheep in order to look for IgG antibodies using the indirect ELISA test.¹²

Fecal examination

Coprological examinations were performed, using the sedimentation test on day zero, and the days of treatment and sacrifice.

Postmortem evaluation

All sheep were sacrificed in order to collect and count the flukes in the liver. Efficacy was assessed as the number of flukes present in the liver of treated animals

Durante varios años se ha trabajado en el diseño, síntesis y evaluación biológica de diversos compuestos, con la idea de desarrollar un fasciolicida más eficiente.⁵⁻⁷ Se destaca en forma particular el 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-*ih*-bencimidazol, denominado compuesto "alfa",* que administrado a ovinos a dosis de 10 y 15 mg/kg, mostró eficacia de 81% y 87%, respectivamente.⁸ A partir de esta eficacia, se realizaron otras evaluaciones quimioterapéuticas en las que se probaron diversas dosis del compuesto alfa en ovinos,⁹ así como en la selección de un vehículo adecuado para formular el fármaco, en el cual se obtuvo una eficacia hasta de 100% contra fasciolas de cuatro y diez semanas de edad.¹⁰

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia del compuesto alfa contra fasciolas de tres días y dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas de edad en ovinos infectados experimentalmente.

Material y métodos

Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Campo Experimental Pecuario del Estado de Puebla (CIPEP) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Animales

Se utilizaron 60 ovinos de raza Pelibuey, de sexo indistinto, entre seis meses y un año de edad, libres de infección por *F. hepatica*.

Fármaco experimental

Se utilizó el compuesto alfa formulado en suspensión al 10%, conteniendo como vehículo pectina, 1.5 g; carboximetilcelulosa (baja viscosidad), 0.5 g; y propilparabeno, 0.03 g.¹⁰

Conducción del estudio

En el día cero todos los ovinos se infectaron cada uno con 150 metacercarias de *F. hepatica* que se obtuvieron en el laboratorio a partir de la infección de caracoles limnéticos, mediante el método descrito por Vera *et al.*¹¹ y se administraron en cápsulas de gelatina con una pinza dosificadora de 35 cm de longitud. Posteriormente éstos fueron aretados y divididos en 12 grupos de cinco animales cada uno para realizar los tratamientos. Seis grupos (1, 3, 5, 7, 9, y 11) recibieron tratamiento con el compuesto alfa, a una dosis oral de 15 mg/kg contra

* Patente en trámite.

in comparison to the control ones according to the formula described by Wood *et al.*¹³

Statistical analysis

A correlation analysis was used to compare the efficacy obtained between the treated groups, and the control ones. In addition, in order to detect if there were any changes attributable to treatments, the same test was used to find out if there was homogeneity in the infectivity of the metacercariae, and also in the liver weight of the treated sheep relative to the control groups.

Results

No trematodes were found in any of the treated groups (1, 3, 5, 7, 9 and 11) showing an efficacy of 100%. In the control groups (2, 4, 6, 8, 10 and 12), the number of flukes collected was of 197, 163, 165, 197, 215 and 196, respectively. These results showed a global average of 189 trematodes per group.

Compound alfa killed all stages of the flukes showing an efficacy of 100%. There was no statistical significance between the number of flukes of the treated groups (Table 1).

All serum samples analyzed by the indirect ELISA test showed anti-*F. hepatica* antibodies at three weeks postinfection. Serum samples were considered as positive when the absorbance value was equal or greater to the cutting ELISA off point (0.05).

As expected, sedimentation analysis were negative in the groups harbouring immature flukes, although there were *F. hepatica* eggs (13 and 22 eggs/5 g of feces) in the groups containing flukes aged 8 and 10 weeks. No eggs were observed at sacrifice day. The control groups had 8 and 19 eggs/5 g of feces at the day of the treatment, respectively.

The average liver weight of treated and untreated animals was of 2.15 kg and 2.23 kg, respectively. No statistical evidence was observed on this parameter between treated and non-treated groups ($P > 0.05$).

Discussion

In the search for finding novel anthelmintics, it is necessary to test a considerable amount of compounds which demands a great investment of time and money. Compound alpha was developed by modifying the structure of triclabendazole (TCB), widely recognized as one of the most effective fascioliscides directed against immature and adult trematodes.¹⁴⁻¹⁶

Results obtained in this study demonstrated that compound alpha was 100% effective against different evolutive stages of liver flukes in sheep. Furthermore,

fasciolas de tres días, dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas posinfección. Los seis grupos restantes (2, 4, 6, 8, 10 y 12) fungieron como testigos sin tratamiento.

Diagnóstico serológico

A las tres semanas posinfección con las metacercarias, se tomaron muestras de sangre de los ovinos con ayuda de equipo vacutainer para la búsqueda de anticuerpos IgG, utilizando la prueba indirecta de ELISA.¹²

Diagnóstico coprológico

Se realizaron análisis coproparasitológicos por sedimentación en los días cero (inicio del estudio), día del tratamiento (dependiendo de la edad de las fasciolas en cada grupo) y en el día del sacrificio (dos semanas postratamiento).

Diagnóstico postmortem

Los ovinos fueron sacrificados de acuerdo con las fechas previamente señaladas. A cada animal se le extrajo el hígado para colectar y contar el número de fasciolas. La eficacia del compuesto se midió con base en el número de fasciolas presentes en los grupos tratados con respecto al número de trematodos presentes en su respectivo grupo testigo, siguiendo la metodología descrita por Wood *et al.*¹³

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados empleando un análisis de varianza, en el cual se comparó la eficacia entre los grupos tratados y testigos. Asimismo, se comparó el número de fasciolas colectadas de los grupos testigo con la finalidad de observar si había homogeneidad en la infectividad obtenida con las metacercarias dosificadas a los ovinos. Adicionalmente se comparó el peso de los hígados de grupos tratados y no tratados para determinar algún posible cambio atribuible al tratamiento.

Resultados

No se encontraron trematodos en ninguno de los grupos tratados (1, 3, 5, 7, 9 y 11), esto último indica 100% de eficacia para cada uno de ellos. En los grupos testigo (2, 4, 6, 8, 10 y 12) se colectaron 197, 163, 165, 197, 215 y 196 fasciolas, respectivamente, lo que generó un promedio global de 189 trematodos por grupo.

El fármaco ejerció su efecto contra todos los trematodos inmaduros tempranos desde tres días de edad hasta estadios adultos de diez semanas, indicando con esto 100% de eficacia. No hubo evidencia estadística significativa en el número de fasciolas presentes en los grupos testigo (Cuadro 1).

this efficacy is the highest obtained since the beginning of different studies with this drug in sheep.⁷⁻⁹ Perhaps the enhanced activity exerted by compound alpha was due to the vehicle in which the compound was formulated, improving the absorption and bioavailability of the drug.

Different authors,^{5-7,17,18} have proven that many fasciolicide compounds are not efficient enough to kill all fluke evolutive stages, and if they are, the dose has to be increased substantially with the corresponding cost and risk approaching sometimes toxicity levels of the compound. Triclabendazole is the only fasciolicide, which when administered at an oral dose of 10 mg/kg, shows satisfactory efficacy against different stages of liver flukes¹⁹. Nevertheless, this activity does not always reach a 100% efficacy.

On the other hand, the cost due to flukicide treatment is important and most farmers are reluctant to treat animals since anthelmintic treatment is generally expensive. In the case of compound alpha, the cost per dose perhaps can be reduced, since it is synthesized as a national product.

En relación con el diagnóstico serológico, todos los sueros analizados mediante ELISA indirecta mostraron anticuerpos anti-*F. hepatica* indicando la positividad a la infección desde la tercera semana posinfección con metacercarias. Se consideró como positiva una muestra individual cuando su valor de absorbancia fue igual o mayor al punto de corte del ELISA (0.05).

Como era de esperarse, los análisis coproparasitológicos resultaron negativos en los grupos que contenían fasciolas inmaduras. Sin embargo, en las fechas del día del tratamiento en los grupos que contenían fasciolas de ocho y diez semanas (adultas), se observó la presencia de huevos del parásito (13 y 22 h/5 g heces), con resultados negativos en las muestras tomadas el día del sacrificio, con ello se demostró un porcentaje de reducción de huevos de 100%, en comparación con los grupos testigo que tuvieron 8 y 19 h/5 g de heces en el día del tratamiento, respectivamente.

Con referencia al peso promedio del hígado para los grupos tratados fue de 2.15 kg, y para los grupos testigo, 2.23 kg. Aun cuando los pesos registrados en los grupos testigo fueron ligeramente mayores, no se

Cuadro 1
COLECTA DE *Fasciola hepatica* DE DIVERSAS EDADES POSTERIOR AL TRATAMIENTO CON EL COMPUESTO ALFA EN OVINOS
INFECTADOS EN FORMA EXPERIMENTAL
Fasciola hepatica COLLECTED AT DIFFERENT EVOLUTIVE STAGES AFTER TREATMENT WITH COMPOUND ALPHA IN
 EXPERIMENTALLY INFECTED SHEEP

Grupos (n = 5)	Tratamiento Alfa 15 mg/kg Treatment alpha 15 mg/kg/p.o.	Mínimo de fasciolas colectadas por grupo Minimum flake number collected per group	Máximo de fasciolas colectadas por grupo Maximum flake number collected per group	Promedio de fasciolas ± DE* Average fluke number ± S.D.*	% eficacia
1	Tres días	0	0	0	100
2	Testigo	31	59	38.4 ± 14.41	
3	Dos semanas	0	0	0	100
4	Testigo	21	47	32.6 ± 10.12	
5	Cuatro semanas	0	0	0	100
6	Testigo	15	41	33 ± 10.6	
7	Seis semanas	0	0	0	100
8	Testigo	19	58	39.4 ± 14.57	
9	Ocho semanas	0	0	0	100
10	Testigo	27	51	43 ± 10.31	
11	Diez semanas	0	0	0	100
12	Testigo	25	52	39.2 ± 10.1	

* = Standard Deviation.

Further studies will have to be carried out in sheep harbouring natural or experimental infections to demonstrate if compound alpha given at 10 mg/kg/p.o. maintains this high exerted efficacy.

It is concluded that compound alpha administered *per os* at 15 mg/kg, showed a 100% efficacy against different evolutive stages of *F. hepatica* in experimentally infected sheep.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Jorge Rosete of CIPEP-INIFAP for all given support. This study was partially supported by PAEP (projects No. 009006 and PAPIT IN227998, DEGPA, UNAM).

observó evidencia estadística significativa entre los pesos de ambos grupos ($P > 0.05$).

Discusión

En la búsqueda de un nuevo fármaco es necesario realizar un escrutinio intenso de compuestos que demandan gran inversión de tiempo y dinero. En el caso del compuesto alfa, la ventaja fue que se modificó la estructura del triclabendazol (TCB), fármaco reconocido mundialmente por su actividad contra fasciolas juveniles y adultas.¹⁴⁻¹⁶

Con base en los resultados obtenidos, se determinó que el compuesto alfa es 100% efectivo contra fasciolas de diversas edades en ovinos. Este porcentaje de eficacia es el mayor que se ha obtenido a partir del inicio de diversos estudios con este fármaco en ovinos.⁷⁻⁹ Se considera que el vehículo¹⁰ en el cual se formuló al compuesto alfa en los últimos estudios, contribuyó a mejorar su absorción y biodisponibilidad, mostrando la importancia de formular al compuesto en un vehículo adecuado.

Por otro lado, diversos autores,^{5-7,17,18} señalan que la mayoría de productos fasciolicidas no son eficaces simultáneamente contra las formas juveniles y adultas de *F. hepatica*, o si lo son la dosis tiene que aumentarse, con la consecuente desventaja que se pueden alcanzar niveles de toxicidad. Adicionalmente, TCB es el único fasciolicida comercial que en ovinos muestra una eficacia satisfactoria contra todos los estadios a dosis de 10 mg/kg por vía oral.¹⁹ Sin embargo, esta eficacia no siempre alcanza 100%. La diferencia de costo por la dosis requerida de uno y otro medicamento, quizá pueda reducirse al ser el compuesto alfa producido con materias primas nacionales. Estudios futuros podrán dilucidar si el compuesto alfa evaluado a dosis de 10 mg/kg en ovinos, produce una eficacia similar o mejor a la producida por el triclabendazol.

Finalmente, el compuesto alfa ofrece un potencial altamente prometedor para controlar y eliminar infecciones por fasciolas adultas y juveniles, que junto con el triclabendazol serían los únicos fármacos en el mundo capaces de eliminar todos los estadios evolutivos de *F. hepatica*. Es importante destacar que el compuesto alfa es el primero de creación nacional con estas características. La información de este trabajo permite concluir que el compuesto alfa administrado en suspensión por vía oral a dosis de 15 mg/kg fue efectivo 100% contra estadios inmaduros y adultos de *F. hepatica* en ovinos infectados en forma experimental.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Jorge Rosete, director del CIPEP, INIFAP-Puebla, por las facilidades otorgadas para la realización de este estudio, que fue parcialmente fi-



Referencias

1. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México (DF): Limusa, 1990.
2. Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México (DF): Interamericana, 1988.
3. Nari A, Fiel C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur, 1988.
4. Quiroz RH. Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1991.
5. Ibarra VF, Vera MY, Olazarán JS, Hernández CA, Castillo BR. Fasciolinip-1: eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:171-178.
6. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR, Olazarán JS. Fasciolinip-2: eficacia fasciolicida experimental en ovinos. *Parasitología Día* 1995;19:113-118.
7. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de un compuesto experimental contra *F. hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 1996;27:119-122.
8. Ibarra VF, García SE, Fernández RM, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de dos compuestos de síntesis química *in vivo* e *in vitro* en ovinos. *Vet Méx* 1997;28:4-11.
9. Ibarra VF, García SE, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolicida del compuesto ALFA contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Méx* 1997;28:4-8.

nanciado por los proyectos PAEP núm. 009006 y PAPIIT núm. IN227998, DEGPA, UNAM.

10. Ibarra VF, Vera MY, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet Méx* 2000;31:47-51.
11. Vera MY. Comparación de la eficacia e impacto inmunológico de 2 fasciolicidas contra *Fasciola hepatica* en borregos Pelibuey infectados experimentalmente (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Ciencias. UNAM, 1994.
12. Ibarra VF, Montenegro N, Vera MY, Quiroz RH, Flores J, Ochoa P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol* 1998;77:229-236.
13. Wood IB, Amarcal NK, Barden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB, *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. *Vet Parasitol* 1995;58:181-213.
14. Turner RJ, Armour RJ. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Rec* 1984;114:31-42.
15. Ramisz A, Urban E, Balicka LA. The usefulness of Fasinex for the control of fasciolosis in sheep. *Higiény Wet* 1986;32:93-98.
16. Fawcett AR. A study of a restricted programme of strategic dosing against *Fasciola hepatica* with triclabendazole. *Vet Rec* 1990;127:492-493.
17. Castillo R, Hernández A. Estudios sobre la síntesis química *in vitro* contra *F. hepatica* en algunos derivados del bencimidazol. *Rev Mex Cienc Farmacéuticas* 1995;22:11-15.
18. Ibarra VF, Vera MY, Najera FR, Sánchez AA. Efficacy of combined chemotherapy against gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet Parasitol* 2001;99:199-204.
19. Mases L, Vanparijs O, Lauwers H, Deckers W. Comparative efficacy of closantel and triclabendazole against *Fasciola hepatica* in experimentally infected sheep. *Vet Rec* 1990;127:450-452.

