



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**DETERMINACION DEL EFECTO QUIMIOTERAPEUTICO DE
UN FASCIOLICIDA COMBINADO CON UN ANTIGENO
METABOLICO DE FASCIOLA HEPATICA EN BORREGO.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Héctor Jorge Pérez Tapia

Asesor: MVZ, DMV, PhD. Osvaldo Froylán Ibarra Velarde



México, D. F.

1986



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.

**CON PROFUNDO CARIÑO, RESPETO Y
AGRADECIMIENTO LES DEDICO ESTA
TESIS:**

A MIS PADRES

ROBERTO PEREZ D.

ADELINA T. DE PEREZ

**Quienes me dieron todo su
apoyo durante el largo ca-
minar de mi formación pro-
fesional.**

A MI PRIMA Martha M. de Mahmoudian y

SU ESPOSO Georges Mahmoudian T.

Por su gran apoyo para seguir adelante

A MIS HERMANOS

Roberto

Socorro

Victor

Aida

Benjamin

Patricia

Laura

**UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL A LA
QUIMICA ROSA MARIA ANAYA Y DAVILA GARIBI
POR SU VALIOSA AYUDA EN LA ELABORACION
DE ESTA TESIS**

AGRADEZCO A:

**Concepción Uribe Morales, su valioso
trabajo en la mecanografía de esta tesis**

A MI HONORABLE JURADO

PRESIDENTE: MVZ. Fernando Vázquez Vázquez

VOCAL: MVZ. Raúl Escalona Flores

SECRETARIO: MVZ. Laura Martínez Figueroa

1er. SUPLENTE: MVZ. Alejandro Saúl Parra C.

2°. SUPLENTE: MVZ. Jaime Ortega Polo

POR ULTIMO QUIERO AGRADECER AL DEPARTAMENTO DE FASCIOLASIS DEL INSTITUTO NACIONAL DE IN VESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS DE LA S.A.R.H. POR EL APOYO BRINDADO PARA LA - ELABORACION DE ESTA TESIS, Y MUY EN ESPECIAL AL MVZ. DMV. PhD. FROYLAN IBARRA VELARDE POR SU VALIOSA DIRECCION.

I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	10
DISCUSION.....	15
CONCLUSIONES.....	17
LITERATURA CITADA.....	18

RESUMEN

El Ranide (cuyo principio activo es el Rafoxanide), es uno de los fasciolicidas comerciales que más demanda tienen por su alta efectividad, siendo ésta principalmente contra formas adultas. Por otra parte existen trabajos donde se menciona haber obtenido cierta protección en ovinos al usar antígeno metabólico de Fasciola hepatica, por lo cual en los últimos años se ha pensado ver si la acción farmacológica se -- puede potenciar una posible respuesta inmune del huésped definitivo con el objeto de limpiarlo y protegerlo de esta importante parasitosis.

El presente trabajo se realizó con 20 ovinos de raza Tabasco o - "Pelibuey" de uno y medio a dos años de edad, los cuales fueron infec - tados con 300 metacercarias viables de Fasciola hepatica divididas - éstas en cinco reinfecciones realizadas a intervalos de 21 días entre cada dosis. Los animales fueron divididos en 4 lotes para sus respec - tivos tratamientos: I con Rafoxanide (1.5 mg/kg vía S.C.), II con an - tígeno metabólico (30 mg de proteína/animal vía I.P.), III con Rafoxa - nide (1.5 mg/kg vía S.C.) y antígeno metabólico (30 mg de proteína/ani - mal vía I.P.) simultáneamente, quedando el lote IV como testigo. Los - datos fueron trabajados estadísticamente por Andeva y prueba de Duncan, no encontrando diferencia significativa ($\alpha > 0.05$) entre el lote I y -- III, pero sí entre el lote I y II, esto hace suponer que la acción del Rafoxanide fue superior.

INTRODUCCION

La Fasciolosis, enfermedad causada por cualquier parásito del género Fasciola, especies: hepatica, gigantica, magna e indica (45), es un padecimiento de distribución mundial que afecta a herbívoros tales como los bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, conejos, etc., e incluso al hombre, produciéndoles trastornos digestivos y de la nutrición, ya que se aloja en el parénquima hepático, conductos biliares y vesícula biliar. En ocasiones se le encuentra como parásito errático en pulmones, tejido subcutáneo y otros órganos (1,10,32 y 42).

Se pueden distinguir clínicamente dos formas de la enfermedad, - la forma aguda y crónica. La forma aguda se presenta sobre todo en - ovinos jóvenes y se debe a la ingestión de un gran número de metacercarias, con la consiguiente invasión repentina y la migración de una multitud de fasciolas jóvenes en el parénquima hepático, causando hemorragias y rupturas del hígado produciendo la muerte súbita sin manifestaciones clínicas. La forma crónica es de evolución lenta y se caracteriza por pérdida de peso, emaciación, edema submaxilar, anemia, debilidad, diarrea y ascitis (1, 37).

La importancia de la enfermedad estriba en que provoca grandes -- pérdidas económicas en muchas partes del mundo, las cuales podemos dividir en pérdidas directas y pérdidas indirectas (10).

Las primeras consisten esencialmente en pérdidas por muertes repentin_{as}; este tipo de pérdidas son ampliamente superadas por las indirectas.

tas las cuales se derivan de la acción menos severa del parásito adulto alojado en los conductos biliares, entre éstas tenemos: hígados decomisados, baja producción y mala calidad de la leche, bajas tasas de crecimiento y mala conversión alimenticia, baja producción y mala calidad de la lana, trastornos reproductivos, costos por tratamiento y gastos médicos (37). Al analizar ambos tipos de pérdidas, es fácil determinar que las segundas ocasionan sangrías más severas a la industria pecuaria, ya que son más frecuentes y menos notorias por lo que generalmente no se les dá la importancia que realmente tienen (10,37).

Actualmente el control de esta helmintiasis ha estado basada fundamentalmente en el uso de sustancias químicas que actúan contra el agente etiológico, sin embargo, su utilización tiene desventajas muy serias como son: resistencia al fármaco de parte del parásito, el tratamiento se administra una vez que el daño ya está hecho y la posible acumulación de residuos en carne y productos de origen animal (9, 39, 45).

Se tienen datos desde 1881 cuando por primera ocasión se descubre un remedio contra Fasciola hepatica, al comprobarse que los extractos del helecho macho (Aspidium felix-mas) además de su actividad contra Ancylostoma duodenale tenían efectos fasciolicidas (45).

Actualmente existen en el mercado nacional varios productos que han demostrado su eficacia contra Fasciola hepatica en su estado adulto como son: Bilevon, Gufin, Disto-5, Valbazen, Trodax y Ranide (3). De todos los fármacos, el Ranide es uno de los que más demanda tiene y que

mayor número de veces ha demostrado su eficacia en evaluaciones que se han realizado tanto en infecciones naturales como experimentales (3,14, 15, 22, 35, 36).

Trabajos realizados in vitro han demostrado que el Rafoxanide actúa como potente desacoplador de la fosforilación oxidativa dentro del ciclo energético, dando como resultado daños irreversibles en los tejidos del parásito (19,20,21,41,47). Este compuesto fue descubierto por Morozik y Col. en 1969, su efectividad contra formas parasitarias adultas y jóvenes se ha comprobado en ovinos y ratas blancas (13, 28).

Campbell, (18), trabajó con borregos usando Rafoxanide a dosis de - 7.5, 10 y 15 mg/kg por vía oral, y obtuvo alta eficacia contra parásitos de 6, 4 y 2 semanas respectivamente, en 1975 Campbell (17), comparó las vías de administración oral, intrarruminal e intra abomasal encontrando que la más efectiva fue la intrarruminal a dosis de 3.75 mg/kg contra infecciones por parásitos jóvenes. En tanto que Calderón (15) en México - utilizó dosis de 5, 7.5 y 10 mg/kg por vía oral dando una efectividad de 81.12, 100 y 100% respectivamente contra parásitos adultos. Posteriormente Anaya y Col. (2) utilizaron dosis de 3 mg/kg por vía SC y obtuvieron un 95.3% de efectividad contra parásitos adultos y juveniles. En lo que se refiere a la inmunología de la fasciolosis, diversos autores han trabajado con diferentes estructuras que forman parte de los agentes que infectan al hombre y los animales; esto se considera de suma importancia ya que permite determinar cuál o cuales "antígenos" son relevantes para

establecer pruebas de diagnóstico o producción de vacunas (38). La estructura de los agentes infecciosos se hace más compleja a medida que avanza la escala filogenética; así por ejemplo, un metazoario tiene más antígenos que un protozoario, bacteria o virus. (38). En general los antígenos parasitarios pueden ser: proteínas, proteínas conjugadas a carbohidratos, polisacárido o haptenos (4).

Los antígenos de Fasciola hepatica por lo general se agrupan en: - a) Antígenos somáticos o estructurales, que por lo regular son extractos crudos de todo el parásito y b) Antígenos metabólicos o productos de excreción/secreción, que son el resultado de la actividad fisiológica del parásito mantenido in vitro (7).

La capacidad antigénica de las estructuras que forman parte de la Fasciola hepatica, se pueden manifestar en dos formas:

- 1) En el curso de las infecciones naturales o experimentales se producen anticuerpos contra algunos de sus antígenos.
- 2) Por medio de la hiperinmunización de animales experimentales con extractos u homogenizados del parásito es posible producir anticuerpos contra todo espectro de sus antígenos (46).

Dragneva al inmunizar conejos con antígenos somáticos liofilizados de F. hepatica, no observó protección significativa, en cambio sí la hubo al utilizar antígeno metabólico como agente inmunizante (24). Langs trabajó con ratones de 16 días inmunizados con antígeno metabólico y an-

tígeno somático por vía intraperitoneal, al desafiar 30 días después - observó protección en los animales vacunados con antígeno metabólico, no así en aquellos inmunizados con el antígeno somático (31). Davies inmunizó ratas con antígeno metabólico de Fasciolas recién desenquistadas más adyuvante completo de Freund por vía subcutánea; posteriormente infectó a los animales con metacercarias, en los resultados no hubo diferencia significativa entre los animales inmunizados y los testigo -- (23). Oldham afirma que la cantidad de antígeno, el número de aplicaciones y la vía de administración son factores determinantes para que se genere protección contra el parásito (40).

Bautista y Col. (4,7), indican haber obtenido cierto efecto protector en borregos inmunizados, por vía I.P., con antígeno metabólico de fasciolas adultas de origen bovino en adyuvante completo de Freund, mas no observaron protección en ovinos inunizados con antígeno somático de fasciolas adultas en adyuvante completo de Freund. Estos autores sugieren que la vía I.P. es posiblemente la más apropiada para provocar inmunidad protectora contra la infección por F. hepatica. Todos estos resultados llaman la atención ya que a pesar de haber buena respuesta de anticuerpos contra fasciola en ovinos no existe una respuesta inmune protectora, (8,29,34,43,44), esto pudiese explicar el porqué de la prolongada permanencia del parásito (de 8 hasta 11 años) en borregos después de una infección experimental única. (25). Por esto en los últimos años se ha pensado ver si una respuesta inmune en el huesped parasitado ayuda (potencializando) a la actividad de un fármaco (27).

OBJETIVO

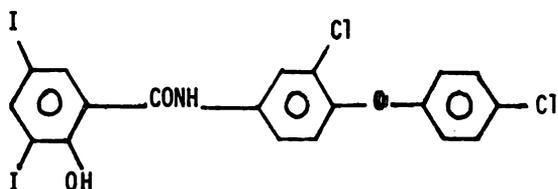
El objetivo de este trabajo fue determinar si mediante la administración combinada de Rafoxanide y de un antígeno metabólico de Fasciola hepatica adultas de origen bovino es posible reducir el número de parásitos presentes en el hígado de borregos infectados artificialmente.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 20 ovinos de raza Tabasco o "Pelibuey" de uno y medio a dos años de edad, libres de Fasciola hepatica procedentes de Tizimín, Yucatán, los cuales se alimentaron con dieta de mantenimiento - producida en la fábrica de alimentos del INIFAP.

Todos los animales fueron infectados con 300 metacercarias de F. hepatica viables, divididas éstas en cinco infecciones (60 metacercarias por cada infección) a intervalos de 21 días entre una infección y otra. Las metacercarias fueron depositadas en cápsulas de gelatina y administradas por vía oral. Todas las metacercarias requeridas para este estudio fueron obtenidas en el laboratorio de infecciones con miracidios de origen bovino en caracoles del género Lymnaea bulimoides. El antígeno metabólico fue producido a partir de ejemplares adultos de Fasciola hepatica en hígados de bovinos traídos del rastro. La técnica empleada fue la descrita en el manual de prácticas del laboratorio de inmunología del INIFAP (5). La determinación de la proteína contenida en el antígeno metabólico se obtuvo por el método de Lowry, utilizando el reactivo de folin-cicalteu (33).

Se utilizó como fasciolicida un producto comercialmente denominado Ranide, cuyo principio activo es el Rafoxanide o Mk-990, es producido por los laboratorios Merck Sharp and Dohme, cuya fórmula química es (3,5-diiodo-3 cloro-4P-clorofenoxi salicilanilida) y su fórmula desarrollada es la siguiente:



es un polvo blanco soluble en acetona e insoluble en agua, su punto de fusión es de 168 a 170°C, se absorbe bien por el intestino y no es metabolizado por la vaca y la oveja, presenta una vida media biológica de 5 a 10 días en la oveja (13,28).

A partir de las 12 semanas de la primera infección con metacercarias, se realizaron exámenes coproparasitológicos por sedimentación, para determinar la presencia de huevecillos del parásito en cada uno de los borregos. Una vez confirmado el diagnóstico, los animales se dividieron al azar en 4 grupos de 5 animales cada uno, los tratamientos correspondientes fueron llevados a cabo como se muestra en el siguiente diseño experimental:

GRUPO	No. DE ANIMALES	TRATAMIENTOS
I	5	Rafoxanide 1.5 mg/kg S.C.
II	5	Ag. Met. 30mg Prot/Anim. I.P.
III	5	Rafoxanide 1.5 mg/kg S.C. Ag. Met. 30mg + Prot/Anim. I.P.
IV	5	Testigo

La administración del antígeno metabólico se realizó 12 semanas después de la primera infección con metacercarias, la aplicación fue por vía intraperitoneal a razón de 30 mg Prot/Animal, tal como lo muestran los trabajos realizados por Bautista et al (6). El fasciolicida se administró en la semana 14 después de la primera infección con metacercarias, la dosis usada fue 1.5 mg/kg vía subcutanea siendo ésta la mitad de la dosis recomendada por el fabricante.

Veintiun días después del tratamiento con Rafoxanide todos los animales fueron sacrificados mediante choque eléctrico. Enseguida se procedió a separar el hígado de cada animal para disectar cuidadosamente el parénquima y los conductos biliares con la finalidad de contar los parásitos y medir su longitud.

La evaluación del presente estudio se llevó a cabo estadísticamente por ANDEVA y prueba de Duncan con la finalidad de saber si existió diferencia significativa entre los diferentes grupos tratados.

RESULTADOS

En el grupo 1, tratado con Rafoxanide a dosis de 1.5 mg/kg se recuperó un total de 37 fasciolas, el cual corresponde a un porcentaje de reducción de fasciolas por grupo de 89.6. En este grupo el número mínimo y máximo de parásitos recuperados por animal fue de 5 y 9 respectivamente. La media de longitud obtenida en el grupo fue de 7.3mm como lo muestra el cuadro 1.

CUADRO No. 1

EFICACIA ANTIHELMINTICA EN EL GRUPO 1 TRATADO CON RAFOXANIDE (1.5mg/kg S.C.) EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 300 METACERCARIAS

No. DE ANIMAL	No. DE FASCIOLAS RECUPERADAS	TAMAÑO \bar{X} DE PARASITOS RECUPERADOS
1	5	8.6
2	7	7.7
3	8	7.2
4	8	6.3
5	8	5.6
TOTALES	$\Sigma = 37$	$\bar{X} = 7.3$

Con relación al grupo 2 tratado con antígeno metabólico a razón de 30 mg de proteína/animal se obtuvo un total de 282 fasciolas por grupo, en el cual resulta un porcentaje de reducción parasitaria de 26.5. En dicho grupo el número mínimo y máximo de fasciolas recuperadas es de 15 y 84 respectivamente. El promedio del tamaño obtenido por grupo fue de 23.1mm, como se presenta en el cuadro 2.

CUADRO No. 2

EFICACIA ANTIHELMINTICA EN EL GRUPO 2 TRATADO CON ANTIGENO METABOLICO, (30 mg de proteina/animal I.P.) EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 300 METACERCARIAS.

No. DEL ANIMAL	No. DE FASCIOLAS RECUPERADAS	TAMAÑO \bar{X} DE PARASITOS RECUPERADOS
1	15	21.2
2	52	24.8
3	62	20.5
4	69	22.3
5	84	26.6
TOTALES	$\Sigma = 282$	$\bar{X} = 23.1$

La administración combinada de antígeno metabólico a dosis de 30 mg de proteína/animal más Rafoxanide dosificado a razón de 1.5 mg/kg en el grupo 3, dio un total de 23 parásitos recuperados, lo cual equivale a un porcentaje de 93.5 en la reducción parasitaria. El número mínimo y máximo de fasciolas encontradas fue de 6 y 2 respectivamente con una longitud promedio de 7.3 mm. Esto se puede observar en el cuadro No. 3.

CUADRO No. 3

EFICACIA ANTIHELMINTICA OBTENIDA EN EL GRUPO 3 TRATADO CON ANTIGENO METABOLICO (30 mg de proteina/animal I.P.) Y RAFOXANIDE (1.5 mg/kg S.C.) EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON 300 METACERCARIAS.

No. DEL ANIMAL	No. DE FASCIOLAS RECUPERADAS	TAMAÑO \bar{X} DE PARASITOS RECUPERADOS
1	2	7.5
2	5	5.4
3	5	8.2
4	5	7.2
5	6	8.6
TOTALES	$\Sigma = 23$	$\bar{X} = 7.3$

Estos resultados, obtenidos de los grupos experimentales 1, 2 y 3 son con relación al grupo IV que fungió como testigo, el cual no recibió ningún tratamiento.

Los datos generales obtenidos por grupo se encuentran sintetizados en el cuadro número 4.

Los parámetros tomados en cuenta para el presente estudio fueron; número de parásitos hallados a la necropsia y longitud de los mismos.

Al hacer el análisis de varianza para el número de parásitos obtenidos se encontró una diferencia significativa ($\ll 0.05$) como lo muestra el cuadro No. 5.

CUADRO No. 5

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE PARASITOS ENCONTRADOS A LA NECROPSIA

Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.
Entre grupo	17344.15	3	5781.38	13.74*
Error	6730.8	16	420.67	
Total	24074.95	19		

* Indica diferencia significativa ($\ll 0.05$).

CUADRO No. 4

EFICACIA ANTIHELMINTICA OBTENIDA POR GRUPO EN LA ADMINISTRACION DE ANTIGENO METABOLICO Y RAFOXANIDE EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON Fasciola hepatica

GRUPO DE 5 ANIMALES	TRATAMIENTO DOSIS Y VIA	No. DE PARASITOS POR GRUPO	\bar{X} + D.S. EN NUM. PARASITOS POR GRUPO	\bar{X} + DS EN TAMAÑO DE PARASITOS	% DE REDUCCION**
I	Rafoxanide 1.5mg/kg S.C.	37a*	7.4 + 1.52	73 + 1.17	89.6
II	Ag. Met. (30mg Prot. por animal I.P.	282b*	56.4 + 25.91	23.1+2.56	26.5
III	Rafoxanide 1.5mg/kg S.C. + Ag.Met 30mg Prot/animal I.P.	23a*	4.6 + 1.52	7.3+1.24	93.5
IV	Testigo	352b*	71.4 + 28.38	24.2+3.00	0.0

* Tratamientos con letras diferentes son desiguales ($\alpha < 0.05$)

** De Fasciolas con respecto al control

El cuadro 6 muestra el análisis de varianza para la longitud de los parásitos encontrados, los cuales presentaron diferencia estadística significativa de ($\alpha < 0.05$).

CUADRO No. 6

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA LONGITUD DE PARASITOS HALLADOS A LA NECROPSIA

Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M.	F.
Tratamientos	69.62	1	69.62	14.38*
Semana de infección	2784.92	4	696.23	143.85*
Interacción	102.68	4	25.67	5.30*
Error	2700.00	557	4.84	
Total	5657.22	566		

* Indica diferencia significativa ($\alpha < 0.05$).

DISCUSION

El periodo prepatente de Fasciola hepatica en ovinos es de 43 a 55 días (30), por esta razón el trabajo se programó para 120 días reinfec-tando cada 21 días entre una infección y otra con el objeto de tener pa-rásitos de diversas edades y poder evaluar de esta manera el posible - efecto de la combinación entre el fármaco y el antígeno, contra el pará-sito en cualquiera de sus estadios dentro del huesped definitivo.

Sabemos que existen muchos factores que influyen en la efectividad de la droga administrada, tales como vía de administración, manejo del - fármaco antes de su uso, condición física del animal tratado, la suscep-tibilidad del parásito de acuerdo a su edad etc.; esto lo podemos notar al analizar lo siguiente: Borrows (11) utilizó Rafoxanide por vía oral a dosis de 5 mg/kg y obtuvo 90-95% de reducción para formas parasitarias maduras, estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente tra-bajo utilizando 1.5 mg/kg vía S.C. se obtuvo una reducción parasitaria de 89.6 para formas maduras, esto se pudo comprobar al medir los parásitos recuperados a la necropsia. Campbell (16) y Mejía (35) utilizaron 5mg/kg vía oral obteniendo 95 y 63.8% de efectividad, al analizar estos resulta-dos vemos que difieren considerablemente por lo que cabe mencionar que - el manejo de la vía de administración es muy importante. Anaya y col. - (2) obtuvieron 95.3% de efectividad al administrar 3 mg/kg vía S.C., en cambio se obtuvo 89.6% de efectividad en este trabajo al utilizar 1.5 mg /kg vía S.C., como podemos ver los resultados son muy parecidos a pesar de haber trabajado con la mitad de la dosis lo cual tiene repercusión - económica considerable.

CONCLUSION

- De acuerdo a los resultados de este trabajo se ve un efecto muy parecido al utilizar 3 mg/kg por vfa S.C. y 1.5 mg/kg por vfa S.C. de Rafoxanide por lo cual convendría ampliar los conocimientos respecto al manejo de dosis ya que la reducción de ésta sin afectar la actividad se vería reflejada en una disminución en el costo del fasciolicida, lo -- que beneficiaría a grandes ganaderos.
- Sería interesante profundizar en cuanto a la metodología para hacer el antígeno, la vfa de administración, la edad óptima del huésped para ser vacunado etc., con el fin de lograr realmente una protección en el animal y poder así disminuir pérdidas indirectas de esta importante parasitosis.
- Como en este trabajo experimental la acción del antígeno no tuvo un efecto satisfactorio en la administración combinada del fármaco y el antígeno, se recomienda realizar nuevos experimentos en los que se utilicen fasciolicidas que actúen contra formas inmaduras o bien que sean menos potentes ya que son menos caros y así se justificaría la administración de la combinación; sin embargo sería importante determinar si esto es redituable económicamente dado el alto costo actual de producción de antígenos parasitarios.

LITERATURA CITADA

- 1) Acha N.P. y Sayfres B. (1984) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera Edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington, E.U.A.
- 2) Anaya R.M. D.G., Milián S.F., Alcibar M.P., (1983). Comparación del efecto de los fasciolidas comerciales, disponibles en México, en ovinos. *Téc. Pec. Méx.* 45, pág. 95-99.
- 3) Arellano, S.J., (1973). Valoración de la efectividad del MK-990 (Rafoxanide) sobre Fasciola hepatica en bovinos. Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zootec. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 4) Barriga, O.O., (1981). *The immunology of parasitic infections.* University Park Press, Baltimore. E.U.A.
- 5) Bautista G.R., Gómez A., Ruiz N.A., Santillán P.A. y Morilla G.A., (1982). Inmunización experimental de borregos contra Fasciola hepatica con antígenos somático o metabólico del parásito adulto. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México.* México, D.F., 102.
- 6) Bautista, G.R. y A. Morilla (1981). *Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio.* Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C., México, D.F.
- 7) Bautista, G.R., (1986) *Inmunización Artificial. Fasciolosis Vol. Conmemorativo del Centenario del descubrimiento del Ciclo de Fasciola hepatica.* Editores Raúl Flores Crespo, Héctor Quiroz Romero y Froylán Ibarra Velarde. INIFAP- Sector Pecuario, Palo Alto.
- 8) Boray J.C., (1967). Studies on experimental infections with Fasciola hepatica, with particular reference to acute fasciolosis in sheep. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 61: 439.
- 9) Boray J.C. (1969) *Experimental Fasciolosis in Australia.* *Adv. in Parasit.* 7: 96-210.

- 10) Borchert A. (1964). Parasitología Veterinaria. Tercera Edición, Editorial Acribia. Zaragoza España.
- 11) Borrows R, B., (1973), Humans and Veterinary Athelmintics (1965-1971). Prog. Drug. Res. 17: 108-204.
- 12) Burden, D.J., Harnes, E. y Hammet, N.C. (1962) Fasciola hepatica: Attempts to immunise rats and mice with metabolic and somatic antigens derived from juvenile flukes. Vet. Parasitol., 9: 261.
- 13) Brander G.C., Pugh, D.M. Bywater, R.J. (1982) Veterinary Applied Pharmacology and therapeutics. Baillire Tindall London pp. 500-1.
- 14) Brechu, F.J., (1974) Efectividad comparativa de seis fasciolicidas en ovinos, Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM, México.
- 15) Calderón, C.J.F. (1973) Eficiencia de Rafoxanide contra Fasciola hepatica en ovinos. Tesis de licenciatura, Fac. Med. Vet. Zoot. - UNAM, México, D.F.
- 16) Campbell N.J., R.V. S.C., and M.D. Brotowidjoyo, D.V.M. (1975). The efficiency of clixoxide and Rafoxanide against Fasciola hepatica in sheep by diferent routes of administration. Australian Vet. Journal, Vol. 51, 1975.
- 17) Campbell, N.J., and Hotson, I.K., 1971, The anthelmintics efficiency of clixoxide and Rafoxanide against Fasciola hepatica and Haemonchus contortus in sheep, Aust. Journal 47: 5-8.
- 18) Campbell, W.C. Ostlind D.A., and Yakstis, J.J., (1970) The efficacy of 3,5-diiodo-3'-chloro-4'(P-chlorofenoxy)-salicylanilide against immature Fasciola hepatica in sheep. Res. Vet. Sci., II. 99.
- 19) Corbett, J.R. and Goose, J. (1971). A possible biochemical mode of action of the fasciolicides nitroxynil, hexachlorofene and oxiclo-sanide. Presticide Science 2, 119-21.
- 20) Corbett, J.R. (1974) The biochemical mode of action of Pesticides. London and New York: Acad. Press.
- 21) Cornish, R.A. and Bryant, C. (1976). Changes in energy metabolism due to anthelmintics in Fasciola hepatica mantained in vitro. International Journal for Parasitology 6: 393-8.

- 22) Davalos, N., (1974). Estudio comparativo de cinco fasciolidas en bovinos bajo condiciones de campo. Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 23) Davies, C., Richard, M.D., Smith, J.D., y Hughes, D.L. (1979). Attempts to immunise rats against infection with Fasciola hepatica using in vitro culture antigens from newly excysted metacercariae. Res. Vet. Sci., 26: 259.
- 24) Dragneva, I.V. (1972). Vaccination against Fasciola hepatica with adult fluke antigen in Freund's adjuvant: influence of antigen batch, antigen dose
- 25) Durban, C.G., (1952). Lougevity of the liver fluke, Fasciola hepatica in sheep. Proc. Helminth. Soc. Wash., 19: 120.
- 26) Hall, R.F. y Lang, B.Z. (1978). The development of an experimental vaccine against Fasciola hepatica in cattle. Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Buffalo, New York, 29 October to 3 November 1978. Richmond, Virginia U.S.A. 56.
- 27) Ibarra V.O.F., (1983) Chemotherapeutic studies on parasitic Helminths. PhD. Thesis Brunel University Great Britain. pp 141-168.
- 28) Kimura, S. and Shimizu, A., (1974). Studies on the treatment of Fascioliasis. Anthelmintic effect of Rafoxanide against immature Fasciola sp specially worms at early stages of infection, in rabbits, Japan, Journal Parasitol, 23: 397.
- 29) Kelly, J.D. y Campbell N.J. (1979) The effect of route of infection on acquired resistance to Fasciola hepatica in the rat and sheep. Res. Vet. Sci. 27: 205.
- 30) Kendall, S.B. and Peirce, M.A. (1969). Synergism in the chemotherapy of Fascioliasis. Br. Vet. 6, 125, 82.
- 31) Langs, B.Z., (1976). Host-Parasite relationships of Fasciola hepatica in the white mouse. VII. Effects of anti-worms incubate sera on transferred worms and successful vaccination with a crude incubate antigen. J. Parasitol., 62: 232.

- 32) Lapage, G., (1971) Parasitología Veterinaria. Tercera Edición, - Edit. CECSA. México, D.F.
- 33) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 193, 265. Modificada por CINEVESTAV, IPN.
- 34) Meek, A.H. y Morris, R.S. (1979) The effect of prior infection with Fasciola hepatica on the resistance of sheep to the same parasite. Aust. Vet. J. 55: 61.
- 35) Mejía, G.J.R., (1974). Efecto del MK-990 (Rafoxanide) y Potenay B-12 contra la Fasciolosis bovina, Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F.
- 36) Milián, S.F., R.M. Anaya D., P. Alcibar M., (1983). Efectos del Coriban (Diamfenetide) y el Ranide (Rafoxanide) contra Fasciola hepatica de diferentes edades. Téc. Pec. Méx., 44: 92-95.
- 37) Milián S.F. (1986) Pronóstico médico y económico. Fasciolosis Vol. Conmemorativo del Centenario del descubrimiento del Ciclo de Fasciola hepatica. Editores Raúl Flores Crespo, Héctor Quiroz Romero y Froylán Ibarra Velarde. INIFAP- Sector Pecuario Palo Alto,
- 38) Mims, C.A. (1976). The pathogenesis of infectious disease. Academic Press. London.
- 39) Morilla, G.A., Bautista, G.C.R., C. Arriaga de M., Ruiz-Navarrete M.A. y Gómez A.A. (1984). Inmunología de la Fasciolosis en ovinos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México (1984), México, D.F. pp. 246.
- 40) Oldham, G. y Hughes, D.L. (1982) Fasciola hepatica. Immunization of rats by intraperitoneal injection of adult fluke antigen in Freund's adjuvant. Exp. Parasitol., 54: 7.
- 41) Prichard, R.R. (1978). The metabolic profile of adult Fasciola hepatica obtained from Rafoxanide treated sheep. Parasitology 76: 227-288.
- 42) Quiroz, R.H. (1984) Parasitología y Enfermedades parasitarias de animales domésticos. Primera Edición. Editorial Limusa. S.A. México, D.F.

- 43) Roshton, B., (1977). Ovine Fasciolosis following reinfection. Res. Vet. Sci., 22: 133.
- 44) Ross, J.G., (1967). A comparison of the resistance status of host to infection with Fasciola hepatica. Proc. 3rd Int. Conf. of World Assoc. For the Advance of Vet. Parasitol., Lyon. Francia 96.
- 45) Taylor, R.L. (1965). La Fasciolosis y el Distoma hepático. FAO. Estudios Agropecuarios No. 64 Roma, Italia.
- 46) Tiggele, L.J. Van, (1978). Host-parasite relations in Fasciola hepatica infections. Immunopatology and diagnosis of liver-fluke disease in ruminants. PhD. Thesis Rijksuniversiteit te Leiden, The Netherlands.
- 47) Williamson, R.L. and Metcalf, R.L. (1967) Saltcyanilides: a new group of active incouplers of oxidative phosphorylation. Sci. 158: 1694-5.