

VACUNACION CONTRA *Dictyocaulus viviparus* UTILIZANDO LARVAS IRRADIADAS CON 1000 GRAYS.^a

Germinal J. Cantó Alarcón^{b,c}

Collette Britton^b

Malcolm W. Kennedy^b

George M. Urquhart^b

RESUMEN

El trabajo se realizó con objeto de conocer el grado de protección conferido por larvas de *Dictyocaulus viviparus* irradiados con 1000Gy. Nueve bovinos libres de anticuerpos contra el parásito fueron divididos en tres grupos de tres animales cada uno. El grupo 1 recibió dos dosis de la vacuna comercial "Dictol" que consiste de 1000 L₃ irradiadas a 400Gy, con 21 días de diferencia. El grupo 2 recibió dos dosis de 2500 larvas irradiadas a 1000Gy los mismos que el grupo anterior y el grupo 3 permaneció como testigo del desafío. Todos los animales fueron desafiados con 30 L₃ por kilogramo de peso 21 días después de la segunda vacunación. Los resultados mostraron una disminución del 91% y del 77% en el número de parásitos recuperados de los grupos 1 y 2 respectivamente, al ser comparados con el grupo testigo, lo que indica una alta protección contra la infección; asimismo sugiere, que las larvas en el tercer estadio poseen los principales antígenos responsables de protección.

Téc. Pec. Méx. Vol. 30 No. 3 (1992)

El estadio o estadios de *Dictyocaulus viviparus* requeridos para producir resistencia contra la infección ha sido estudiado por varios investigadores. Kendall⁷ utilizando dietilcarbamazina para terminar la infección tan pronto como era posible (14 a 15 días postinfección), concluyó que los estadios jóvenes tenían un fuerte efecto en el desarrollo de resistencia, pero que no eran los responsables de una resistencia completa y que los estadios posteriores eran necesarios para ello. Por otro lado, Cornwell⁴ en un experimento similar postula que "Al tiempo en que los parásitos se han desarrollado a un estadio donde son susceptibles en gran parte a la acción de la droga, el hospedero ha sido estimulado por materiales antigéni-

cos capaces de producirle inmunidad". Posteriormente Cantó², utilizando cuyes como modelo experimental demostró que larvas de *D. viviparus* irradiadas a 1000Gy administradas en dos ocasiones con 21 días de diferencia, produjeron un grado de inmunidad tan alto como el observado con larvas normales, a pesar que este tipo de larvas no se desarrollan más allá del tercer estadio larvario.

Con objeto de conocer si los resultados observados en cuyes podrían ser similares en el hospedero natural y de esta forma conocer él o los estadios responsables de inmunidad, fue que se realizó el presente estudio.

Nueve bovinos machos, libres de anticuerpos contra el parásito y con un peso que fluctuaba entre los 137 y 172 kg se dividieron al azar en tres grupos de tres animales cada uno. Los bovinos se mantuvieron estabulados en los corrales de manejo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Glasgow y fueron alimentados con

a Recibido para su publicación el 13 de abril de 1992.

b Universidad de Glasgow. Departamento de Parasitología. Bearsden Rd. Bearsden. Glasgow, Escocia.

c Dirección actual. GENID-Fisiología. INIFAP-SARH. Ajuchitlán, Querétaro, México. Programa Nacional de Epidemiología.

concentrado comercial, paja de avena y agua *ad libitum*. Los animales del grupo 1 recibieron por vía oral y en dos ocasiones, 1000 larvas en el tercer estadio (L₃) irradiadas a 400Gy (Dictol, Intervet, England). Los becerros del grupo 2 recibieron en forma endovenosa, 2500 L₃ irradiadas a 1000Gy en los mismos días que el grupo 1. La vía de inoculación y la dosis más elevada fue debido a que se pensó, por los resultados obtenidos en cuyes, que las larvas irradiadas a 1000Gy permanecerían por menos tiempo en los pulmones; además, de que serían incapaces de atravesar la pared intestinal. Los animales del grupo 3 permanecieron como testigos para el desafío. Todos los animales se desafiaron 21 días después de la segunda vacunación con 30 L₃/kg de peso y se sacrificaron 25 días más tarde.

Durante el transcurso del experimento los animales se revisaron diariamente y se

les midió la frecuencia respiratoria. Además, todos fueron pesados al inicio del experimento, el día del desafío y un día antes del sacrificio.

Semanalmente durante el periodo prepatente se obtuvieron muestras fecales para conocer la presencia de larvas del parásito, mediante las técnicas de McMaster⁵ y Baermann⁶; posteriormente el muestreo se realizó cada día.

Semanalmente se examinaron muestras de suero para la detección de anticuerpos específicos contra *D. viviparus*, utilizando la técnica de ELISA.

Al sacrificio los pulmones y la traquea se abrieron con tijeras obteniéndose y contándose todos los parásitos adultos.

Los resultados mostraron que la frecuencia respiratoria de los animales de los tres grupos se mantuvo dentro del rango normal durante ambos regimenes de vacunación (Figura 1). Siete días después del desafío se

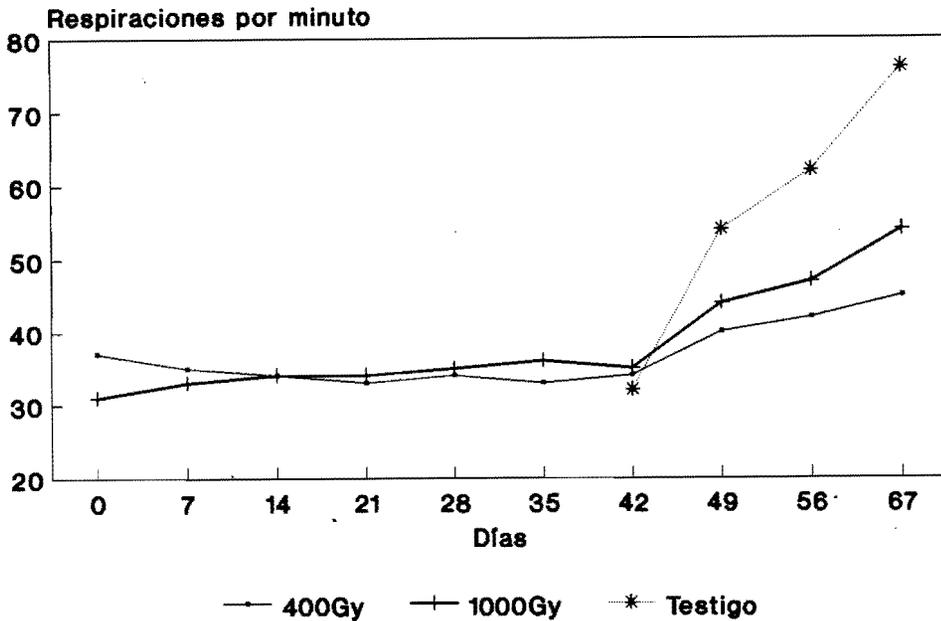


FIGURA 1. MEDIAS DE RESPIRACION POR MINUTO POR GRUPO DE BOVINOS VACUNADOS CON LARVAS DE Dictyocaulus viviparus IRRADIADAS A 400 Gy Y 1000 Gy LOS DIAS 0 Y 21 Y DESAFIADOS CON 30L₃/kg DE PESO EL DIA 42.

presentó un aumento en la frecuencia respiratoria y para el día del sacrificio las respiraciones por minuto eran de 45, 56 y 76 para los grupos vacunados con larvas irradiadas a 400Gy, 1000Gy y testigo respectivamente.

Durante el periodo de vacunación los animales ganaron peso en forma constante. Entre el desafío y el sacrificio las medias de ganancia por grupo fueron de 6 kg y 19 kg para los grupos vacunados con larvas irradiadas a 400Gy y 1000Gy respectivamente. En contraste, los animales del grupo testigo sufrieron una pérdida de peso de 17 kg en promedio. Esto último es de suma importancia, ya que aún cuando los animales testigo no murieron, su producción fue negativa, pudiendo pensarse que esto es lo que ocurre en condiciones naturales.

Los resultados de los exámenes copro-

parasitológicos de McMaster y Baermann se muestran en el Cuadro 1. En el grupo 1, solamente un animal fue positivo en Baermann en dos ocasiones. En el grupo 2, un animal fue positivo en McMaster y los otros dos en Baermann y en el grupo 3 dos animales fueron positivos en McMaster y el otro en Baermann.

El número de parásitos presentes a la necropsia en los pulmones de los animales y el porcentaje de reducción de parásitos recuperados de los grupos vacunados, comparados con el grupo testigo, se muestran en el Cuadro 2. Se puede observar que aunque un animal del grupo testigo presentó un número de parásitos muy bajo en la necropsia, es clara la alta protección que existió en contra de la infección i.e. 91.0% y 77.0% de reducción en el número de parásitos en los

CUADRO 1. RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE McMASTER Y BAERMAN DESPUS DELA VACUNACION DE BOVINOS CON LARVAS DE *Dictyoacaulus viviparus* IRRADIADAS CON 400Gy Y 1000Gy Y DESAFIADOS CON 30 L₃/kg DE PESO.

GRUPO	DIAS DESPUES DEL DESAFIO							
	21		24		25		26	
1	M*	B**	M	B	M	B	M	B
400Gy								
A	N***	N	N	1	N	N	N	1
B	N	N	N	N	N	N	N	N
C	N	N	N	N	N	N	N	N
2								
1000Gy								
A	N	N	N	1	N	N	N	1
B	N	N	N	1	N	2	100	-
C	N	N	N	N	N	1	N	1
3								
Testigo								
A	N	N	N	4	100	-	100	-
B	N	N	N	1	N	1	N	1
C	N	N	N	3	100	-	50	-

* McMaster Larvas por gramo de heces

** Baermann Larvas por gramo de heces

*** Negativo

CUADRO 2. PORCENTAJE DE REDUCCION DE PARASITOS ADULTOS OBTENIDOS DE PULMONES DE BOVINOS DESPUES DE LA DOBLE VACUNACION CON LARVAS IRRADIADAS A 400Gy Y 1000Gy Y EL DESAFIO CON 30 L₃/kg DE PESO.

GRUPO	VACUNACION	NUMERO DE PARASITOS RECUPERADOS
A	400Gy	2, 12, 168 MEDIA 60.66 REDUCCION 91.29%
B	1000Gy	97, 189, 200 MEDIA 162 REDUCCION 76.74%
C	TESTIGO	57, 729, 1304 MEDIA 696.66

grupos vacunados con larvas irradiadas a 400Gy y 1000Gy respectivamente.

En la prueba de ELISA, utilizando antígeno de L₃, no se detectaron anticuerpos en los animales del grupo 1 hasta una semana después de la segunda dosis de vacuna. Posteriormente la media de los títulos por grupo incrementó hasta el momento del sacrificio. En los animales del grupo 2, como era de esperarse por la dosis y la vía de inoculación, se observó un título bajo después de la primera vacunación que incrementó después de la segunda dosis. Posterior al desafío, los títulos se mantuvieron en el mismo nivel hasta la última semana en la que se observó un marcado incremento. En los animales del grupo testigo no se observaron títulos hasta dos semanas después del desafío (Figura 2).

Los títulos bajos de anticuerpos de la clase IgG específicos contra *D. viviparus* durante los regímenes de vacunación, concuerdan con los resultados observados por otros investigadores^{1,3,6} e indican que la especificidad de estos anticuerpos es más importante que la cantidad.

Por los resultados de este trabajo se puede concluir que la reducción en el número de parásitos del 77.0% observada al utilizar larvas irradiadas a 1000Gy, en las que su desarrollo se detiene completamente, sugiere que en la L₃ se presentan los antígenos

más importantes responsables de la protección. Esto no excluye la posibilidad de que estos antígenos pudiesen estar presentes en otros estadios del parásito; pero, siendo el tercer estadio fácil de obtener, hace que la L₃ sea considerada como la mejor fuente de antígeno para estudios dirigidos al desarrollo de una vacuna molecular.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue realizado gracias a una aportación de Wellcome Trust. El primer autor recibió becas del CONACYT, México y del Committee of Vice Chancellors and Principals del Reino Unido.

SUMMARY

The purpose of the study was to show the degree of protection conferred by *Dyctyocaulus viviparus* third stage larvae irradiated to 1000Gy. Nine calves were divided into three groups of three animal each. Group 1 was given in two occasions, 21 days apart, the commercial vaccine "Dictol". Group 2 received two doses of 2500 1000Gy irradiated larvae at the same time that the animals in group 1. Group 3 remained as a challenge control. All the animals were challenged with 30 L₃/kg of body weight 21 days after the second vaccination. The results showed reductions of 91.0% and 77.0% of recovered parasites of groups 1 and 2 respectively when compared with the control group, which indicates a high protection against challenge. In addition, they also suggest that the third stage larvae presents the major antigens responsible for protection.

Título (Inversa de la dilución)

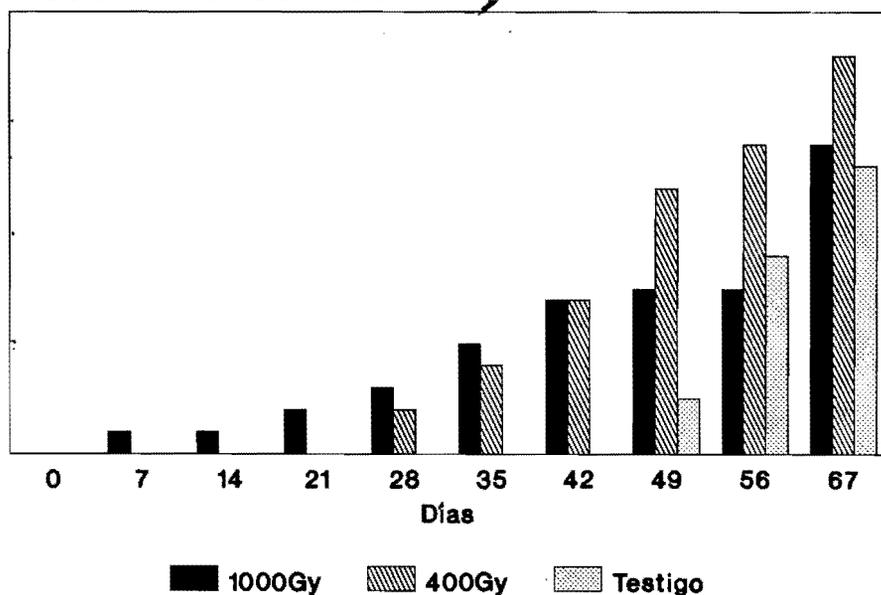


FIGURA 2. TITULOS DE ANTICUERPOS IgG CONTRA *Dictyocaulus viviparus* EN UNA MEZCLA DE SUEROS POR GRUPO DE BOVINOS VACUNADOS CON LARVAS IRRADIADAS A 400 Gy y 1000 Gy LOS DIAS 0 Y 21 Y DESAFIADOS CON 30L₃/kg DE PESO EL DIA 42.

LITERATURA CITADA

1. BOKHOUT, B.A. BOON, J.H. and HENDRICKS, J. 1979. Operational diagnosis of lungworm infections in cattle. Preliminary investigation into the usefulness of the indirect hemagglutination. *Vet. Q. (Netherlands)*. 1. 195.
2. CANTO, G.J. Immunity to *Dictyocaulus viviparus* infection. 1990. Ph.D. Thesis. University of Glasgow. Escocia.
3. CORNWELL, R.L. 1960. The complement fixing antibody response of calves exposed to challenge. *J. Comp. Pathol.* 70, 499.
4. CORNWELL, R.L. 1963. The treatment of natural and experimental *Dictyocaulus viviparus* infections in calves with diethylcarbamazine and its effect in the subsequent development of immunity. *Res. Vet. Sci.* 4. 435.
5. GORDON, H.M. and WHITLOCK, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. of the Council for Sci. and Industr. Res.* 12. 50.
6. HENRIKSEN, S.A. 1965. An improved technique for the examination of faeces for larvae of lungworms. *Nor. Vet. Med.* 17. 446.
7. KENDALL, S.B. 1965. The effect of large doses of Diethylcarbamazine on the development of resistance to reinfection with *Dictyocaulus viviparus*. *J. Comp. Pathol.* 75, 443.
8. MARIUS, V. BERNARD, S. RATNAUD, J.P. PERY, P. and LUFFAU, G. 1979. *Dictyocaulus viviparus* in calves; quantification of antibody activities in sera and respiratory secretions by immunoenzymatic analysis. *Ann. Rech. Vet.* 10. 55.