

EFFECTO DEL ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND, EQUIMUNE Y CONCAVALINA A SOBRE LA RESISTENCIA A LA INFECCION EXPERIMENTAL POR *Eimeria tenella* EN POLLOS ^a

Carlos R. Bautista Garfias ^b

Lauro Trejo Castro ^c

Edmundo Rojas Ramírez ^b

Pedro Pérez Silva ^c

RESUMEN

El objetivo del estudio fue, evaluar la capacidad de tres inmunostimulantes para inducir protección no-específica en pollos, contra la infección por *Eimeria tenella*, en comparación con una vacuna comercial. 48 pollos fueron divididos en seis grupos de ocho animales cada uno. Todas las aves en los grupos fueron inyectadas intraperitonealmente, ya sea con adyuvante completo de Freund (ACF), Concanavalina A (Con A), Equimune (EI), o solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) siete días antes de la confrontación (ac) con 5000 ooquistes infectivos de *Eimeria tenella* (cepa Zumpango) por animal, o tratados oralmente con una vacuna comercial, Coccivac (Vac) 14 días ac. Un grupo adicional de ocho animales sirvió como grupo no-infectado no-tratado (NI-NT). Una semana después de la confrontación todos los pollos fueron sacrificados para determinar el grado de lesión en el ciego («lesion scoring» LS) y el índice anticoccidial (IAC). El LS promedio \pm EEM fue de 1.2 ± 0.3 ; 1.0 ; 1.4 ± 0.2 ; 1.4 ± 0.2 ; 2.6 ± 0.4 ; y 0 para los grupos ACF, Con A, EI, Vac, SSAF y NI-NT, respectivamente. Los inmunostimulantes y la vacuna confrieron un efecto de protección similar en pollos (IAC moderado) contra la confrontación con *E. tenella*.

PALABRAS CLAVE: *Eimeria tenella*, Pollos, Inmunostimulantes, Resistencia no-específica.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 3 (1996).

La coccidiosis es causada por especies del género *Eimeria*, que afecta al ganado y las aves de corral, siendo causa importante de pérdidas económicas. En la avicultura comercial, la coccidiosis es controlada básicamente por medio de agentes quimioterapéuticos (1). En este sentido, se sabe que en México, el mercado de fármacos anticoccidiales tiene un valor aproximado de 20 millones de dólares americanos, sin considerar los tratamientos (2); sin embargo, el fenómeno de la resistencia a los fármacos, es actualmente un serio problema y la atención se está dirigiendo hacia el uso de métodos inmunoprolácticos (1,3). Por otro lado, se ha señalado que la reacción inflamatoria, observada en las parasitosis intestinales, es una consecuencia de la respuesta inmune a los parásitos, la cual es

T-dependiente (4), y que esta reacción inflamatoria del intestino, actúa de una manera esencialmente no-específica (5). A este respecto, se ha sugerido la necesidad del uso de métodos alternos para el control de infecciones tanto parasitarias como bacterianas (6). Una de estas estrategias es el uso de inmunomoduladores, los que actúan incrementando la inmunidad no-específica (6). Por ejemplo, se ha informado que el Levamisole mejora el desarrollo de resistencia en pollos a la infección por coccidias (7). En este sentido, en estudios previos se demostró que el adyuvante completo de Freund (ACF), cuando se inyecta vía intraperitoneal (i.p.) antes de la infección (a.i.) en ovejas, estimula la inmunidad protectora no-específica contra los parásitos *Haemonchus contortus* (8) y *Fasciola hepatica* (9). Recientemente, se observó que la lectina Concanavalina A (Con A) inoculada i.p., a.i., en ratones, estimula respuestas protectoras contra la infección por *Toxoplasma gondii* (10). Similarmente, se ha demostrado la capacidad de un inmunostimulante comercial (Equimune, EI, Vetrepharm, Ontario), derivado de la pared

^a Recibido para su publicación el 20 de Mayo de 1996.

^b CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP-SAGAR, A.P. 206 CIVAC 62500, estado de Morelos, México.

^c Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, Jiutepec 62550, estado de Morelos, México.

Correspondencia: Carlos R. Bautista-Garfias, CENID-PAVET, INIFAP-SAGAR, Apartado postal 206, CIVAC 62500, estado de Morelos, México.

de una micobacteria, para inducir inmunidad no-específica en ratones contra *Trichinella spiralis* (11).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad del ACF, Con A y EI para inducir protección no-específica en pollos (ausencia de mortalidad y poco daño en los ciegos), contra la infección por *Eimeria tenella*, en comparación con una vacuna comercial (Coccivac-B, Sterwin, Canada), la cual ha mostrado ser efectiva en el control de la coccidiosis en aves reproductoras (12).

Se utilizaron 48 pollos machos Vantress de un día de edad, que fueron alojados en baterías para pollos en iniciación, y distribuidos al azar en seis grupos de ocho animales cada uno. Las aves recibieron alimento comercial sin fármacos anticoccidianos y agua *ad libitum*. Cada pollo fue inyectado vía intraperitoneal (i.p.), a los nueve días de edad, como sigue: en el grupo ACF con 0.2 ml de una mezcla (vol/vol) de adyuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, Missouri), con solución salina amortiguadora de fosfatos estéril (SSAF) pH 7.2; en el grupo Con A con 20 µg de Concanavalina A (Sigma, St. Louis, Missouri), en 0.2 ml de SSAF; en el grupo EI con 0.1 ml de Equimune -una fracción de la pared celular de una micobacteria- (Vetrepharm, Ontario, Canada); y en el grupo SSAF; (testigo) con 0.1 ml de SSAF pH 7.2. Los pollos de estos grupos recibieron el tratamiento siete días antes de la confrontación experimental con 5000 ooquistes de *Eimeria tenella* (cepa Zumpango) por pollo, administrados por medio de sonda gástrica. La dosis de ooquistes para esta cepa, fué determinada en infecciones previas, obteniéndose un valor de +4 en una escala de 0 a +4, basada en el grado de LS (datos no publicados). En el grupo Vac, los pollos fueron inoculados por vía oral, a los dos días de edad, con una vacuna viva comercial contra la coccidiosis (Coccivac-B, la cual contiene *E. tenella*, *E. mivati*, *E. acervulina* y *E. maxima*) 14 días antes de la confrontación. Un grupo adicional de ocho

pollos indispensable para el cálculo del I.A.C, permaneció como no-tratado, no-infectado (NT-NI).

Siete días después de la confrontación, todos los pollos sobrevivientes fueron pesados y sacrificados, y las lesiones intestinales fueron registradas utilizando la escala de Johnson y Reid, que mide la intensidad de la lesión, la cual va de 0 a +4 (13). La significancia de las diferencias entre los grupos tratados para el grado de lesión en el intestino ($p < 0.05$), se determinó por medio de análisis de varianza (14) y la prueba de rangos múltiples de Duncan (15). Los conteos promedio diarios de ooquistes eliminados por los pollos, se determinaron de acuerdo a métodos estándar (16). Las ganancias de peso, producción de ooquistes, mortalidad y los registros de las lesiones cecales se utilizaron para calcular el índice anticoccidiano para cada grupo, como se sugiere en el boletín Merck sobre amprolium (17).

Los pollos en los grupos ACF, Con A, EI, y Vac mostraron menos daño en los ciegos (lesion score promedio), que aquellos en el grupo no-tratado infectado (SSAF, testigo) (Cuadro 1). Las ganancias promedio de peso de los grupos ACF, EI y Vac fueron muy similares numéricamente, a la observada en el grupo testigo no-tratado no-infectado (Cuadro 1). En este caso, no se cuenta con los datos individuales, motivo por el cual no se practicó un análisis estadístico en esta variable. Los animales tratados con los tres inmunoestimulantes y la vacuna mostraron ganancias promedio de peso total de por lo menos 50 g/ave, con respecto a los pollos del grupo SSAF. Esta ganancia promedio de peso fue de 112 g, 52 g, 118 g y 124 g en los grupos ACF, Con A, EI y Vac, respectivamente (Cuadro 1), y fue ligeramente menor de la observada en pollos del grupo no-tratado no-infectado (25 g, 85 g, 19 g, y 13 g para los grupos ACF, Con A, EI, y Vac, respectivamente) (datos no mostrados).

Las aves en los grupos ACF, Con A, Vac y SSAF comenzaron a eliminar ooquistes de

CUADRO 1. PROTECCION CONTRA LA CONFRONTACION CON *Eimeria tenella*^A POR MEDIO DE LA INMUNIZACION ORAL (COCCIVAC) O INYECCION INTRAPERITONEAL DE INMUNOMODULADORES (ACF, CON A, EI) EN POLLOS.

Grupo ^B	Tratamiento (días a.i.) ^C	<i>E. tenella</i> infección	Lesion score ^D	ganancia de peso (g/ave) ^E	DPG ^F
ACF	-7	+	1.2 ± 0.3 ^a	630	112
Con A	-7	+	1 ± 0 ^a	570	52
EI	-7	+	1.4 ± 0.2 ^a	636	118
Vac	-14	+	1.4 ± 0.2 ^a	642	124
SSAF	-7	+	2.6 ± 0.4 ^b	518	—
No infectado no tratado	-	-	0 ± 0 ^c	655	137

^A Infección con 5000 ooquistes de *E. tenella* (cepa Zumpango)/ave. Ocho pollos por grupo.

^B ACF = Adyuvante completo de Freund, Con A = Concanavalina A, EI = equimune, Vac = Coccivac B, SSAF = Solución salina amortiguadora de fosfatos.

^C a.i. = antes de la infección.

^D Ver el texto para el método de registro. Los valores son medias ± EEM;

^{a,b,c} Las medias con un superíndice común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

^E Medias de los pollos pesados en grupo al final del experimento. No se tienen los datos individuales.

^F Diferencia de peso en gramos con respecto al grupo SSAF (infectado no tratado).

E. tenella en las heces el día cinco después de la infección (d.i.), mientras que los animales en el grupo EI lo hicieron el día seis d.i. (Cuadro 2); los ooquistes eliminados en los días uno y dos en el grupo Vac, probablemente provenían de las especies atenuadas de *Eimeria* que constituyen la vacuna.

Los grupos ACF, Con A, EI y Vac exhibieron un índice anticoccidiano moderado (Cuadro 3).

La información obtenida en el estudio indica que el ACF, la Con A y el inmunoestimulante comercial (EI), cuando se inyectan siete días antes de la infección (a.i.) con *Eimeria tenella* y con base en el I.A.C. calculado, inducen un efecto moderado no-específico en contra del parásito, similar al generado por una vacuna específica administrada 14 días a.i. (Cuadro 1). Esta observación, sugiere que un mecanismo local común de los pollos actuó contra *E. tenella*. En este sentido, es probable que los inmunoestimulantes activen células T cooperadoras del tipo TH₁ (inflamatoria) (18), y que las células NK las que a su vez, a través

de la liberación de citocinas como IL-2 e IFN- γ , activen macrófagos (19) y participen en una respuesta inflamatoria intestinal que afecta a los parásitos. Al respecto, los macrófagos activados liberan una gran variedad de mediadores, de las cuales las citocinas de las familias de la interleucina 1 (IL-1) y del factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor TNF), parecen ser primordiales para iniciar la siguiente serie de reacciones protectoras (20). En este contexto, se ha demostrado el papel esencial del IFN- γ y del TNF en la defensa contra patógenos intracelulares (21); por ejemplo, la administración intravenosa de sobrenadantes de linfocitos estimulados con Con A, redujeron la producción de ooquistes, tanto en pollos infectados con *E. acervulina* como con *E. tenella* (22). Estos mismos sobrenadantes fueron también capaces de inhibir la reproducción de los parásitos en cultivos celulares (22). Al respecto, el interferon- γ se ha implicado en la inmunidad en infecciones por coccidias (23). En ratones, el IFN- γ es responsable de mediar respuestas

CUADRO 2. CONTEO DIARIO DE OOQUISTES EN HECES DE POLLOS TRATADOS CON ACF, CON A, EI, VAC Y SSAF, DESPUES DE LA INFECCION CON 5000 OOQUISTES DE *Eimeria tenella* (CEPA ZUMPANGO)/POLLO.

Grupo ^a	Tratamiento (días a.i.) ^b	OPG ^c (x 1000) en los días pos infección						
		1	2	3	4	5	6	7
ACF	-7	0	0	0	0	1.5	61.2	160.8
Con A	-7	0	0	0	0	0.2	7.2	171.6
EI	-7	0	0	0	0	0	33.6	227.4
Vac	-14	2.1	0.9	0	0	0.5	51.6	212.4
SSAF	-7	0	0	0	0	0.7	54.0	473.4
No infectado	-	0	0	0	0	0	0	0
No-tratado								

^a ACF = Adyuvante completo e Freund, Con A = concanavalina A, EI = equimune, Vac = Coccivac, SSAF= Solución salina amortiguadora de fosfatos. Ocho pollos por grupo.

^b a.i. = antes de la infección.

^c OPG = número promedio de ooquistes por gramo de heces en la jaula. Toda la materia fecal de la jaula se homogeneizó y a partir de 10 gramos de ésta se contaron los ooquistes para determinar el número promedio (16).

CUADRO 3. INDICE ANTICOCCIDIANO (I.A.C.) EN POLLOS TESTIGOS Y TRATADOS CON ACF, CON A, EI, VAC O SSAF ANTES DE LA INFECCION CON *Eimeria tenella*^A

Grupo ^B (n=8)	% Aves sobre- vivientes	% G.P.R. ^C	I.L. ^D	I.O. ^E	I.A.C. ^F
ACF	100	96	12.5	8.9	175
Con A	100	87	10	9.5	168
EI	100	97	13.8	12.5	171
Vac	100	98	13.8	11.7	173
SSAF	88*	79	25	40.0	102
TESTIGO	100	100	0	0	200

^A 5000 ooquistes de *E. tenella* (cepa Zumpango)/pollo. Ocho pollos por grupo.

^B ACF = Adyuvante completo de Freund, Con A = Concanavalina A, EI = Equimune,

Vac = Coccivac B, SSAF = Solución salina amortiguadora de fosfatos, TESTIGO = no-tratado no-infectado.

^C % G.P.R.=Ganancia de peso relativa = $\frac{\text{ganancia de peso grupo experimental} \times 100}{\text{ganancia de peso grupo testigo}}$

^D I.L. = Indice de Lesión = $\frac{\text{lesiones totales en el grupo} \times 10}{\text{número de aves}}$

^E I.O.=Indice de Oquistes = $\frac{\text{No. de ooquistes en el grupo} \times 0.4 \times 100}{\text{No. promedio de ooquistes en el grupo testigo}}$

^F I.A.C. = (% de sobrevivientes + % G.P.R.) - (I.L. + I.O.)

< 160 = Pobre, 160-180 = Moderado, > 180 = Bueno.

* Un pollo murió por coccidiosis.

protectoras primarias a la infección por *Eimeria*. La depleción de IFN- γ endógeno, utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ , dio por resultado incrementos en la eliminación de ooquistes y en la mortalidad durante la infección primaria por *E. vermiformis* (23). Pollos inmunosuprimidos con dexametasona, mostraron una producción disminuida de IFN- γ e IL-2, y una susceptibilidad aumentada a la infección por *E. mivati* (24), lo cual sugiere que estas linfocinas podrían también mediar la inmunidad contra coccidias en pollos. En este marco de referencia, se ha informado que las células NK son una fuente importante de IFN- γ *in vivo*, y que el IFN- γ derivado de las células NK, ha mostrado ser importante en los estadios tempranos de la inmunidad protectora contra la infección intracelular, en la inmunodeficiencia combinada severa (severe combined immunodeficiency SCID) en ratones (19). Los datos obtenidos en la presente investigación son preliminares, y por esta razón otros estudios son necesarios para dilucidar los mecanismos responsables de la respuesta inmune no-específica observada. Sin embargo, los resultados sugieren la posibilidad de usar inmunomoduladores para el control de la coccidiosis aviar.

EFFECT OF FREUND'S COMPLETE ADJUVANT, EQUIMUNE AND CONCANAVALIN A ON THE RESISTANCE AGAINST AN EXPERIMENTAL *Eimeria tenella*-INFECTION IN CHICKENS.

SUMMARY

The objective of the study was to evaluate the capacity of three immunostimulants to induce non-specific protection against *Eimeria tenella* experimental infection in chicks as compared with a commercial vaccine. Forty eight, one day-old chicks were allotted in six groups of eight animals each. All the birds in each group were injected intraperitoneally with Freund's complete adjuvant (FCA), Concanavalin A (Con A), Equimune (EI), or phosphate buffered saline (PBS) seven days before inoculation (bi) with 5000 *Eimeria tenella* (Zumpango strain) infective oocysts per animal, or treated orally with a commercial vaccine, Coccivac (Vac) 14 days bi. An additional group of eight animals served as non-infected non-treated control group (C). One week after inoculation, all chicks were sacrificed to determine the lesion score (LS) in the ceca, and the anticoccidial index (ACI). The

mean LS \pm SEM were 1.2 \pm 0.3; 1.0; 1.4 \pm 0.2; 1.4 \pm 0.2; 2.6 \pm 0.4, and 0 for groups FCA, Con A, EI, Vac, PBS and C, respectively. Both the immunostimulants and the vaccine conferred similar protection effect (moderate ACI) against *E. tenella* challenge.

KEY WORDS: *Eimeria tenella*, Chickens, Immunostimulants, Non-specific resistance.

REFERENCIAS

- 1 Wallach M, Smith N C, Braun R, Eckert J. Potential control of chicken coccidiosis by maternal immunization. *Parasitol. Today*, 1995, 11:262.
- 2 Garza del Pozo E. Historia de anticoccidiales en México. Alternativas presentes y futuras. En: Memoria del curso de actualización sobre coccidiosis aviar. ANECA, México, D.F. 1994:59.
- 3 Shirley M W. Coccidiosis Research - COST Effective. *Parasitol. today*, 1995, 11:89.
- 4 Miller H R P. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1984, 6:167.
- 5 Kennedy M W. Immunologically mediated, non-specific interactions between the intestinal phases of *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis* in the mouse. *Parasitology*, 1980, 80:61.
- 6 Masih K N. Cytokines and immunomodulators: Promising therapeutic agents. *Parasitol. Today*, 1994, 10:1.
- 7 Rahman S A, Adel F, Jagannath M S. Role of levamisole in the induction of cell mediated immunity in experimental caecal coccidiosis of chickens. *Indian Vet. J.* 1989, 66:706.
- 8 Bautista Garfias C R, Flores Hernández O, Quiróz Romero H. Non-specific resistance of sheep against *Haemonchus contortus* with Freund's complete adjuvant. *Parasite Immunol.* 1991, 13: 565.
- 9 Bautista Garfias C R, Gómez Arroyo A, Morilla González A, Vera Montenegro Y, Ibarra Velarde F. Inducción de resistencia inespecífica contra la infección por *Fasciola hepática* en ovinos con adyuvante completo de Freund. *Rev. Mex. Parasitol.* 1992, 3:1.
- 10 Bautista Garfias C R, Daza Fragosó H, Ixta Rodríguez O, Martínez Gómez F. Inducción de resistencia contra *Toxoplasma gondii* en ratones NIH tratados con concanavalina A. *Vet. Mex.* 1995, 26:113.
- 11 Bautista Garfias C R, Zerón Bravo F, De la Jara Alcocer F, Flores Castro R. Effect of three immunostimulants on the resistance against *Trichinella spiralis* infection in mice. (Preliminary Report). *Arch. Med. Res.* 1995, 26:91.
- 12 Ruiz H, Tamasaukas R. Inmunoprotección: una alternativa contra la coccidiosis aviar. *Parasitol. al Día.* 1995, 19:37.
- 13 Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 1970, 28:30.
- 14 Daniel W W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a. Ed. México: Limusa, 1987:283.
- 15 Duncan D B. Multiple range and multiple-F tests. *Biometrics.* 1955, 11:1.
- 16 Long P L, Joyner L P, Millard B J, Norton C C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.* 1976, 6:201.
- 17 Merck and Co., 1960. Technical Bulletin, Amprol., 56 p.
- 18 Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A, Coffman L. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986, 136:2348.
- 19 Garside P, Mcl. Mowat A. Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune

- defence? Immunol. Today. 1995, 16:220.
20. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol. Today. 1994, 15:74.
 21. Kaufmann S H E. Immunity to intracellular microbial pathogens. Immunol. Today. 1995, 16:338.
 22. Lillehoj H S, Kang S Y, Keller L, Sevoian M. *Eimeria tenella* and *E. acervulina* lymphokines secreted by an avian T cell lymphoma or by sporozoite-stimulated lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. Exp. Parasitol. 1989, 69:54.
 23. Rose M E, Wakelin D, Hesketh P. Gamma interferon controls *Eimeria vermiformis* primary infection in BALB/c mice. Inf. Immun. 1989, 57:1599.
 24. Lillehoj H S, Trout J M. CD8+ T cell-coccidia interactions. Parasitol. Today. 1994, 10:10.