OBSERVAÇÕES SOBRE A APLICAÇÃO EXPERIMENTAL
DE UMA VACINA IRRADIADA CONTRA A DICTIOCAULOSE
BOVINA (*Dictyocaulus viviparus*)

SOLANGE MARIA GENNARI

Orientador: ARISTEU MENDES PEIXOTO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1982

. . .

Aos meus pais,

Olivia e Arlindo

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço a todos que contribuíram para a reali
zação deste trabalho, e em especial às seguintes pessoas, e
instituições:

Ao Prof. Dr. *Aristeu Mendes Peixoto*, pela orientação segura na
execução do trabalho;

Ao Prof. Dr. *Eneas Salati*, Diretor do Centro de Energia Nuclear
na Agricultura (CENA), pelas facilidades para a realização des
sa pesquisa;

Ao Dr. *Antonio de Oliveira Lobão*, Responsável pela Divisão de
Ciências Animais do CENA, pela orientação, incentivo e colabo
ração;

À *Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA)*, na pessoa
do Dr. *Peter B. Vose* pelo apoio financeiro;

À *Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)* e ao *Conselho Na*
cional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro;

Ao *Instituto de Zootecnia, da Secretaria da Agricultura e Abas*
tecimento, em Nova Odessa e particularmente à *Estação Experimen*
tal de Zootecnia de Colina, SP, pela doação dos animais e fe
no, e pelo uso de suas dependências para a realização de parte
do trabalho;

.iii.

Aos Profs. *W. Mulligan, G.M. Urquhart* e *J. Duncan*, pela colaboração e sugestões de parte do trabalho;

Ao Prof. *Humberto de Campos*, pela orientação nas análises estatísticas;

Aos estagiários *Adibe Luiz Abdalla, Ana Maria de S. Almeida* e *Vangri de B. Gomes* pela valiosa ajuda na execução do experimento;

À pesquisadora *Dorinha M.S.S.V. Marcondes* e aos funcionários *Lécio Aparecido Castilho, José Cleto da Silva Filho* e *Alidor Gonçalves*, pela amizade e auxílio sempre que foi necessário;

Aos colegas médicos veterinários *Cláudia R. Pozzi* e *Edison H. de Castilho*, pelo auxílio no abate e exame dos animais.

Í N D I C E

Página

1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Observações sobre a dictiocaulose sob condi- ções naturais e experimentais.	3
2.2. Imunização.	5
2.3. Vacinas irradiadas	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.	17
EXPERIMENTO 1.	17
3.1. Local.	17
3.2. Animais.	18
3.3. Delineamento experimental e análise estatísti- ca.	18
3.4. Preparação das vacinas.	19
3.4.1. Cultura de larvas	19
3.4.2. Obtenção da suspensão de larvas	21
3.4.3. Irradiação das larvas e preparo das do- ses de vacinas	22
3.5. Períodos experimentais	22
3.5.1. Período de vacinação	22
3.5.2. Período do teste de desafio.	26
3.5.3. Abate dos animais e exame dos pulmões	27
EXPERIMENTO 2	29

	.v.
3.6. Local.	29
3.7. Animais	29
3.8. Delineamento experimental e análise estatística. .	30
3.9. Preparação das vacinas	30
3.10. Períodos experimentais.	30
3.10.1. Período de vacinação	30
3.10.2. Período do teste de desafio.	32
4. RESULTADOS.	34
EXPERIMENTO 1.	34
4.1. Número de vermes encontrados nos pulmões	34
4.2. Porcentagem de larvas infestantes ministradas no teste de desafio que atingiram a maturidade . . .	35
4.3. Peso corporal	36
4.4. Observações clínicas.	36
4.4.1. Frequência respiratória	38
4.4.2. Exame de fezes	40
EXPERIMENTO 2.	40
4.5. Número de vermes encontrados nos pulmões.	40
4.6. Porcentagem de larvas infestantes ministradas no teste de desafio que atingiram a maturidade . . .	41
4.7. Peso corporal.	42
4.8. Observações clínicas	44
4.8.1. Frequência respiratória.	44
4.8.2. Exame de fezes	44
5. DISCUSSÃO.	47

5.1. Número de vermes encontrados e porcentagem de <i>D. vivíparus</i> que se estabeleceram nos pulmões.	48
5.2. Peso corporal.	50
5.3. Observações clínicas	52
5.3.1. Frequência respiratória	53
5.3.2. Exame de fezes	54
6. CONCLUSÃO.	56
7. LITERATURA CITADA.	57
8. APÊNDICE 1.	64
9. APÊNDICE 2.	71

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Fotografia de bezerro doador com sacola coletora de fezes.	20
2. Fotografia das larvas infestantes de 3 ^o estágio (L3) de <i>Dictyocaulus viviparus</i> (320 x).	20
3. Fotografia da fonte de cobalto-60, emissora de raios gama, utilizada na elaboração das vacinas.	23
4. Fotografia de <i>Dictyocaulus viviparus</i> , verme adulto.	28
5. Peso médio dos animais durante o período experimental nos tratamentos vacina Dictol, vacina CENA e controle.	37
6. Média da frequência respiratória por minuto, durante o período experimental dos animais nos tratamentos vacina Dictol, vacina CENA e controle	39
7. Peso médio dos animais durante o período experimental dos grupos vacina CENA e controle.	43
8. Média da frequência respiratória por minuto, durante o período de desafio dos animais do grupo vacina CENA e controle.	45

OBSERVAÇÕES SOBRE A APLICAÇÃO EXPERIMENTAL DE UMA
VACINA IRRADIADA CONTRA A DICTIOCAULOSE BOVINA

SOLANGE MARIA GENNARI

Orientador: *ARISTEU MENDES PEIXOTO*

RESUMO:

A imunização de bezerros contra a dictiocaulose, mediante o uso de vacinas irradiadas, foi testada em dois experimentos de laboratório, conduzidos na Divisão de Ciências Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

No primeiro experimento, 18 bezerros foram divididos em 3 grupos homogêneos de modo que o tratamento A recebeu a vacina britânica Dictol, o tratamento B, a preparada no CENA com radiação gama, ambas via oral, e o tratamento C permaneceu como controle. Um mês após a segunda dose, todos foram desafiados com 60 larvas infestantes por quilograma, e 5 semanas mais tarde foram abatidos.

O número de *Dictiocaulus viviparus* estabelecidos nos pulmões foi contado. Observou-se que os tratamentos A e B não diferiram entre si, porém foram significativamente

inferiores ao C, havendo uma redução de 84% no número de vermes estabelecidos nos pulmões para o tratamento A e 86% para o tratamento B, quando comparados ao controle.

O experimento 2 foi realizado para confirmar as observações do primeiro teste quanto ao uso da vacina preparada no CENA.

Dois grupos de 8 bezerros cada um foram utilizados, de modo que o tratamento A recebeu a vacina-CENA e o tratamento B permaneceu como testemunha. Seis semanas após a segunda dose, os animais foram desafiados com larvas normais de *D. vivíparas* (60 L3/kg), um mês mais tarde abatidos, e o número de vermes adultos estabelecidos nos pulmões foi contado. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos sendo que o grupo de vacinados reduziu em 93,37% o número de vermes nos pulmões, quando comparados aos controles.

Os sintomas clínicos da verminose estiveram presentes nos vacinados em ambos os testes, porém foram mínimos quando comparados aos controles.

Concluiu-se que as duas vacinas foram eficazes na imunização de bezerros contra o *D. vivíparas*, dentro dos pa^{ra}metros utilizados nos dois testes.

STUDIES ON THE EFFICIENCY OF AN IRRADIATED VACCINE
AGAINST *Dictyocaulus viviparus*

SOLANGE MARIA GENNARI

Adviser: ARISTEU MENDES PEIXOTO

SUMMARY

Studies on the immunization of calves against *Dictyocaulus viviparus* using irradiated vaccines were carried out in two experiments at the Animal Sciences Division of Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

In the first experiment 18 calves were divided into 3 groups. Group A received the British commercial vaccine "Dictol", Group B received the gamma irradiated vaccine prepared at CENA, both orally, and Group C was the unvaccinated control. One month after the second dose, the calves were challenged with normal *D. viviparus* infective larvae at the rate of 60 larvae per kg body weight and 5 weeks later all animals were killed.

The number of lungworms was then determined and it was noted that there was no difference between treatments A and

B, but results were significantly greater in relation to treatment C, with 84% and 86% reduction for Dictol and CENA vaccine respectively when compared with controls.

The second experiment was carried out to confirm the first results with CENA vaccine.

Two groups with 8 calves each were used. Group A received CENA vaccine and Group B was used as unvaccinated control. Six weeks after the second vaccination, both groups were challenged with normal *D. viviparus* larvae (60 L3/kg). The animals were killed 4 weeks after the challenge. A statistically significant difference in the number of lungworm burden was noted between treatments, with a decrease of 93.37% as a result of vaccination.

Clinical symptoms in vaccinated calves remained after challenge in the 2 experiments, but were minimal when compared with their respective controls.

Considering the parameters used in the tests, the conclusion was that the two vaccines were efficient in the immunization of calves against *D. viviparus*.

1. INTRODUÇÃO

A bronquite parasitária é uma importante doença de bovinos causada pelo *Dictyocaulus vivíparus*, um nematóide amplamente distribuído pelo mundo. Acomete principalmente animais jovens, levando a distúrbios respiratórios e, muitas vezes, à morte. As primeiras ocorrências relatadas sobre este parasito, vêm de épocas da Grécia e Roma antigas.

As observações da dictiocaulose feitas em campo e experimentalmente mostraram que bezerros uma vez expostos à infestação com o *D. vivíparus* desenvolveram um alto grau de imunidade e que, numa reinfestação, os animais mais jovens tor

navam-se particularmente resistentes, sem nenhuma larva nas fezes.

Dessas observações surgiu uma vacina irradiada comercial preparada com raios X contra a dictiocaulose bovina, a qual vem sendo amplamente utilizada, com grande sucesso, em várias partes do mundo, em particular na Grã-Bretanha e no continente europeu.

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. obter uma vacina irradiada contra a dictiocaulose bovina em nosso meio.
2. testar e comparar a vacina produzida no CENA e a comercial britânica - Dictol - fabricada por Allen & Hanbury's Ltd., Ware, United Kingdom.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Observações sobre a dictiocaulose sob condições naturais e experimentais.

Em estudos sobre a epizootiologia do *Dictiocaulus viviparus*, TAYLOR (1951), na Inglaterra, e GREGOIRE (1951), na Bélgica, já haviam sugerido a proteção dos animais a uma reinfestação por esse parasito.

JARRETT *et alii* (1954), observando por um ano 40 fazendas na Escócia, onde a dictiocaulose é um grave problema, notaram que animais uma vez expostos à infestação, quando sobreviviam acabavam por desenvolver um alto grau de imunidade que os protegia numa reinfestação.

Outros autores demonstraram, sob condições experimentais, uma resposta autoimune do organismo a reinfestações por *D. vivíparus*.

MICHEL (1954) demonstrou que quando bezerros previamente infestados recebiam uma segunda dose com um número de larvas infestantes maior que a primeira, a reinfestação não se tornava patente e larvas não apareciam nas fezes, embora sintomas clínicos ocorressem na maioria dos animais uma a duas semanas após o desafio. Chamou de auto-cura esta observação, nome este já sugerido em 1929 por Stole para vermes do trato digestivo. MICHEL, em 1955, ministrou larvas infestantes de *D. vivíparus* a 14 bezerros já recuperados de uma bronquite parasitária, e abatendo-os a intervalos que variaram de 24 a 279 dias, concluiu que, embora a segunda reinfestação não levasse a um quadro clínico da doença, vermes imaturos foram encontrados nos pulmões desses animais após vários meses.

RUBIN & LUCKER (1956) também fizeram a mesma observação, quando infestaram animais experimentalmente para estudar as fases da doença, concluindo que estes se tornavam resistentes e protegidos de forma mais marcante nas reinfestações.

2.2. Imunização

TAYLOR (1951) e SOLIMAN (1952) tentaram aplicar a técnica de soro-aglutinação para detectar anticorpos contra a dictiocaulose, e concluíram não ser ela eficaz como meio de diagnóstico da doença.

A primeira tentativa experimental de induzir uma imunidade à bronquite parasitária, foi realizada por JARRETT *et alii* (1955), utilizando soro hiperimune de animais infestados e já recuperados da doença. A fração globulina de soro desses animais era ministrada via intra-peritonal em bezerros susceptíveis que após 2 a 5 dias eram desafiados com 4000 larvas infestantes de *D. vivíparus*. Um mês depois os animais foram abatidos e seus pulmões examinados, observando um certo grau de proteção quando comparados ao grupo controle. No mesmo experimento, usando a técnica de fixação de complemento, anticorpos foram detectados e titulados.

JARRETT *et alii* (1957), tentando uma imunização ativa, testaram injeções intramusculares de antígeno, verme adulto, mais adjuvante, porém os resultados mostraram a necessidade de um esquema de vacinação que dificilmente poderia ser implantado a campo e portanto, de valor limitado.

WEBER (1958), ao estudar um modo de imunizar susceptíveis contra a dictiocaulose, e na tentativa de conse

guir uma técnica auxiliar de diagnóstico da doença usou a fixação de complemento e observou que os anticorpos aparecem por volta da segunda semana após o desafio, persistem por aproximadamente 50 dias, com os títulos mais altos sendo observados nos animais que sofreram reinfestação.

CORWELL & MICHEL (1960), confirmaram as observações de WEBER (1958), de que o nível de anticorpos permanecia estável quando os animais não eram mais desafiados com larvas infestantes.

Após o uso de técnicas visando a uma imunização passiva com soro hiperimune e uma tentativa de imunização ativa com vacinação, mediante o uso de antígeno morto mais adjuvante, os autores citados voltaram sua atenção para uma vacina viva, atenuada pela irradiação.

2.3. Vacinas irradiadas

O emprego das radiações como um modo de atenuar larvas de parasitos foi primeiramente mostrado por Tuzzer e Honeij em 1916 (In: BENITEZ-USHER, 1975), usando radio-irradiação com larvas de *Trichinella spiralis*. Aqueles autores testaram a atenuação das larvas irradiadas, alimentando camundongos e observando seu desenvolvimento. Alguns anos mais tarde, SCHWARTZ (1921) repetiu o experimento e observou que estas lar

vas, quando irradiadas e encistadas nos músculos estriados de porcos, fracassaram no seu desenvolvimento ou produziam adultos estéreis, quando ingeridas por ratos susceptíveis.

Em 1942, LEVIN & EVANS induziram imunidade em ratos, alimentando-os com larvas irradiadas com doses de 3250 a 3750 r de radiação, por raio X. Esta dosagem permitiu que as larvas atingissem a maturidade, porém a maioria dos adultos tornou-se estéril, e somente um pequeno número de larvas foi recuperado dos músculos do hospedeiro. Em 1955, GOULD *et alii* infestaram ratos com larvas irradiadas com ^{60}Co , e reinfestando-os com larvas normais, observaram que uma eficiente imunidade decorreu quando as larvas eram irradiadas a 10.000 r.

Após estas tentativas de imunização, baseadas nas observações com *T. spinalis*, JARRETT *et alli* (1957) tentaram atenuar larvas de *D. viviparus* com a finalidade de torná-las incapazes de completar seu ciclo biológico, porém permitindo que estimulassem o organismo do animal vacinado a uma resposta imunogênica. Com este propósito usaram três diferentes níveis de radiação. As vacinas constaram de uma dose única de 4000 L3 irradiadas, sendo os animais desafiados 6 semanas após, com larvas normais na mesma quantidade da vacina. Os animais foram abatidos 30 dias depois do desafio, e estimou-se o número de vermes que se desenvolveram nos pulmões. Concluíram que alguns animais foram bastante protegidos, com referência

cia ao que chamaram nível A e B de radiação, enquanto o nível C comportou-se como os controles, isto é, sem nenhuma proteção.

Uma pequena prova em pastos altamente contaminados foi realizada por JARRETT *et alii* (1958-a) usando a vacina irradiada. A vacinação nesta prova foi ministrada 2 semanas antes dos animais entrarem na área experimental, com dose única de 1000 L3 irradiadas. Tanto os vacinados como os controles acusaram larvas nas fezes, porém nos primeiros numa quantidade bem menor. O mesmo ocorreu com a frequência respiratória que se mostrou mais elevada no grupo controle. Três entre 15 vacinados e 10 entre 12 controles morreram durante os 80 dias de teste de campo, o que representou 20% e 83% de mortalidade, respectivamente.

Um grande experimento de campo foi realizado por JARRETT *et alii* (1958-b) utilizando 1000 bezerros em 40 propriedades particulares, nas quais havia história prévia de dictiocaulose. O esquema utilizado foi a vacinação dos animais antes de entrarem em regime de pastoreio, sendo que metade deles em cada propriedade foi vacinada e metade permaneceu como controle. Houve surto de dictiocaulose em 6 propriedades, porém a morbidade caiu de 62% para 6%. Observou-se também que este esquema protegia a maioria dos animais porém isso não ocorria quando eles eram expostos a pastos altamente contamina

dos, ou desafiados experimentalmente com grande quantidade de vermes. JARRETT *et alii* (1957), haviam mostrado que um fator importante envolvido na imunidade contra o *D. viviparus* era a resposta secundária desenvolvida pelo organismo após uma reinfestação, onde o título máximo de anticorpos numa primeira infestação aparecia após 80 a 100 dias, e em subseqüentes reinfestações de pois de 10 a 14 dias. Estas observações sugeriram a tentativa de uma dupla vacinação.

Em 1959 foi iniciada a produção da vacina em âmbito comercial, na Grã-Bretanha, sob o nome de Dictol.

Em 1959, JARRETT *et alii* dividiram 50 bezerros em 5 grupos homogêneos, e cada grupo recebeu um esquema de vacinação, como se segue:

1ª dose: Grupos de 1 a 4 receberam 10.000 L3; grupo 5, como testemunha - 2ª dose: Grupo 1 - 4000 L3; grupo 2 2000 L3; grupo 3 - 1000 L3; grupo 4 - não recebeu a segunda dose; grupo 5 - testemunha.

O intervalo entre doses foi de 6 semanas, utilizando-se 40 kr para atenuar as larvas. Os autores observaram que a dupla vacinação protegeu mais que a única, e que não houve diferença significativa entre grupos submetidos a dose dupla, e nem quanto a número de vermes nos pulmões, ganho de peso e frequência respiratória. Todos os grupos vacinados so

freram um aumento da frequência respiratória ao redor do 18^o dia após vacinação, porém esta voltou ao normal nas proximidades do 25^o dia.

CORNWELL (1959), observando o uso de Dictol em propriedades particulares, notou que animais vacinados funcionavam como portadores, contaminando as pastagens sem apresentar sinais clínicos, isto é, algumas larvas conseguiam chegar à forma adulta, mesmo após a vacinação. CORNWELL & BERRY (1960), usando Dictol, realizaram um experimento para confirmar essas observações. Neste teste, 4 bezerros vacinados foram desafiados naturalmente em condições de campo, durante 4 semanas, e a seguir, levados a um pasto livre de *P. vivíparus* juntamente com animais não vacinados que lá se encontravam. Um mês após estarem na mesma área, as testemunhas iniciaram a eliminação de larvas. Os resultados enfatizaram a importância de um sistema de vacinação para todos os animais da propriedade, uma vez que a permanência de bezerros não vacinados e vacinados na mesma área é contra indicada como medida de controle, pois estes últimos, mesmo excretando pequenas quantidades de larvas, podem infestar uma área o suficiente para causar problemas aos susceptíveis.

JARRETT *et alii* (1960), depois de vários anos de estudos com a vacina irradiada, pela primeira vez publicaram um trabalho onde se discutiu a dose de radiação usada: 20,

40 e 60 Kr. O nível intermediário (40 Kr), mostrou os resultados mais satisfatórios, pois o mais baixo (20 Kr) resultou numa vacina patogênica, e o mais alto (60 Kr) numa vacina que não protegeu por excesso de radiação. Observou-se também que larvas irradiadas a 20 e 40 Kr conseguiram migrar pelos gânglios mesentéricos e atingir os pulmões, porém não se tornaram adultas. As irradiações a 60 Kr perderam a capacidade de migrar.

POYNTER *et alii* (1960) fizeram uma série de recomendações quanto ao uso da vacina. Primeiramente, baseados em observações de campo com a Dictol, aconselharam que os animais vacinados fossem postos nas pastagens aos poucos, quando estas estivessem altamente contaminadas. Recomendaram também um intervalo mínimo de 2 semanas entre a última vacinação e o contato com as pastagens infestadas. Em propriedades onde os bezerros não permaneciam estabulados, as vacinações deveriam ser aplicadas e os animais mantidos nas áreas mais limpas dos pastos.

CORNWELL (1960) vacinou animais com duas doses da vacina em intervalos de 6 semanas e um mês após foram levados a pastos contaminados juntamente com um grupo controle. O teste de fixação de complemento foi realizado semanalmente. Observou-se que nos animais que apresentaram título de anticorpos baixo ou ausente, após a vacinação, a resistência ao desa

fio com larvas infestantes era menor. Isso sugeriu que o desenvolvimento da imunidade dependia do estabelecimento das larvas irradiadas nos pulmões.

JARRETT *et alii* (1961) realizaram uma prova de campo que teve a duração de 70 dias, utilizando 2 doses da vacina com 1000 L3 cada, a intervalos de 30 dias. Obtiveram um grau de proteção bom, acusado pela diminuição da frequência respiratória, com média de 80 rpm no grupo controle e 45 nos vacinados. Houve melhor ganho de peso nos vacinados, e diminuição do número de larvas nas fezes, após o desafio.

NELSON *et alii* (1961) após 2 anos de uso comercial da vacina, relataram que em 8000 propriedades onde Dictol foi empregada, somente 0,85% dos vacinados apresentaram doença.

JONES & NELSON (1960) e NELSON *et alii* (1961), relataram suas experiências em campo com Dictol durante 2 anos, e observaram uma incidência de 0,4 e 0,35% de casos clínicos da doença respectivamente, sugerindo que esses índices se deviam mais a pneumonias infecciosas, parasitoses gastro-intestinais e nível de nutrição dos animais vacinados.

CORNWELL (1962), baseado no uso comercial da vacina Dictol, por 3 anos, fez algumas recomendações sobre a sua aplicação, recomendando-a em animais sadios, ou quando es

tivessem com uma pneumonia a vírus ou bactéria. Por outro lado, ARMOUR & URQUHART (1974) recomendaram o uso da vacina somente em animais comprovadamente sadios. Caso tenham tido uma pequena pneumonia infecciosa antes da vacinação, esta só deverá ser aplicada um a dois meses após o término dos sintomas clínicos.

DOWNEY (1965), sob condições de campo na Irlanda, observou 80% de mortalidade em animais não vacinados, em contraposição a 18% nos vacinados. Verificou também um significativo aumento no ganho de peso nos vacinados em relação aos controles, mas quando comparou intervalo entre doses de 4 e 2 semanas, não acusou diferença na eficácia da vacina.

Mais tarde, DOWNEY (1968), relatou resultado de 2 experimentos de campo, onde os animais nascidos e criados em pastagens contaminadas com *D. vivíparus* receberam 3 doses da vacina a intervalos de 15 dias entre doses, e a 1ª vacinação quando contavam com 7 a 8 semanas. Concluiu que vacinação de bezerros em regime de pasto pode ser realizada, porém o risco é tanto maior quanto mais contaminada for a área, sendo então recomendada a prática nas áreas menos infestadas, e os animais gradativamente sejam levados para as partes mais contaminadas da propriedade.

Vários autores testaram a vacina em várias par

tes do mundo. Na França PIERRE *et alii* (1961) testaram a vacina comercial britânica em laboratório e em campo, encontrando 95% de proteção quando comparada aos controles não vacinados.

ENGELBRECHT (1961) testou nos Estados Unidos vacina elaborada nas mesmas condições da britânica e encontrou uma média de 636 vermes adultos nos controles contra 3,8 nos vacinados com apenas uma dose de 1000 L3.

A vacina já foi testada também na Holanda, Suécia, Alemanha, Suíça e Dinamarca, onde a eficácia vem sendo confirmada, segundo informa BENITEZ-USHER (1975).

Dez anos após o uso comercial da Dictol na Grã-Bretanha, POYNTER *et alii* (1970) relataram que a prevalência da infestação em animais vacinados era de apenas 0,35%. Na Suíça, a vacina foi obrigatória em fazendas que possuíam a doença, e em 3 anos (1971-1973) a porcentagem de casos clínicos caiu de 57 para 15%, segundo Eckert. (In: BENITEZ-USHER, 1975).

Em 1976, BENITEZ-USHER *et alii*, realizaram um experimento a fim de obter informações sobre a eficácia da imunização de bezerros ainda em aleitamento, com a vacina Dictol. Reduziram a aplicação da idade de 8-12 semanas, como é recomendada comercialmente, para 3-7 semanas. Concluíram ser possível e eficaz a vacinação de bezerros em aleitamento, e que ela

não afetou no ganho de peso durante todo o período experimental. Isto contrastou com as conclusões de DOWNEY (1965), que vacinando bezerros com 7 e 8 semanas, observou uma diminuição no ganho de peso quando comparados aos controles. A aplicação dos resultados obtidos pelos autores acima refere-se ao uso da vacina em bezerros de corte, que permanecem na pastagem desde o nascimento. A imunidade destes na fase de aleitamento é uma medida prática e aconselhável.

A duração da imunidade adquirida nos bezerros que receberam Dictol foi estudada por MICHEL *et alii* (1965). Os animais foram vacinados com Dictol e desafiados com larvas normais juntamente com grupos no 3º, 6º, 12º e 18º mês após a imunização. A dose de desafio variou de 7500-30.000 L3. A imunidade foi medida pelo número comparativo de vermes no post-mortem. No 3º mês foi de 23%, no 6º foi de 44%, no 12º de 41% e no 18º de 39%. Em contraste, bezerros que receberam larvas normais no mesmo esquema aos 3, 6, 12 e 18 meses apresentaram 99, 82, 81 e 83% de imunidade, respectivamente. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por PIRIE *et alii* (1971), que vacinaram duplamente bezerros com Dictol em intervalo de 4 semanas, e desafiaram um grupo de animais após um mês e outro após 4 meses. Observaram uma redução no número de vermes nos pulmões dos vacinados, da ordem de 97% após um mês, sendo que este número caiu para 89% no 4º mês, quando comparados aos controles.

POYNTER *et alii* (1970) e POYNTER e PEACOCK (1973) consideraram que animais vacinados devem ser expostos a pastos infestados para ajudar na manutenção da imunidade, e uma vez iniciado o programa de vacinação dos bezerros de uma propriedade, este esquema deve manter-se indefinidamente e não parar após alguns anos, pois sempre haverá um pequeno número de larvas nas pastagens que mantêm a imunidade nos animais vacinados, porém. podem produzir a doença clínica nos susceptíveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constou de dois experimentos que serão descritos separadamente.

EXPERIMENTO 1

3.1. Local

O experimento nº 1 foi realizado na Divisão de Ciências Animais, Seção de Imunologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em Piracicaba, Estado de São Paulo. Na elaboração das vacinas, utilizou-se a fonte de cobal

to-60 desse centro.

3.2. Animais

Foram utilizados 20 bovinos machos, castrados, mestiços do tipo mantiqueira, com peso médio de 54,00 kg no início do experimento e idade entre 2 a 3 meses, nascidos na Estação Experimental de Zootecnia de Colina, do Instituto de Zootecnia.

Os bezerros foram vermifugados antes do início do experimento com Thibenzole, produto da Merck Sharp & Dohme, e vacinados contra o paratifo aos 15 dias de idade.

A dieta durante o período experimental constou de feno de capim-rhodes (*Chloris gayana*) à vontade, 1,0 kg de concentrado comercial Cargill, diariamente, por animal, além de sal mineral e farinha de osso fornecidos em cocho.

3.3. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com 3 tratamentos e 6 repetições.

A análise estatística para número de vermes desenvolvidos nos pulmões, porcentagem de vermes que atingiram a maturidade e ganho de peso durante o período experimental fo

ram feitas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, segundo recomenda CAMPOS (1976).

3.4. Preparação das vacinas

3.4.1. Cultura de larvas

Dois bezerros provenientes da Estação Experimental de Zootecnia de Colina, receberam 60 larvas infestantes, de 3^o estágio (L3), de *Dictyocaulus viviparus*, por quilograma de peso, via oral, obtidas conforme se descreve em 3.4.2.

Após 25 dias, os animais começaram a eliminar larvas do 1^o estágio (L1) nas fezes. Colocou-se, então, um arreio-coletor (Figura 1) nos animais doadores, e as fezes coletadas duas vezes ao dia foram utilizadas para a elaboração das culturas.

Após homogeneizadas, as fezes foram espalhadas em formas tipo pirex, em camadas de aproximadamente 1 cm, e com um bastão de vidro, foram feitos furos por toda a extensão do conteúdo. As formas foram, então, colocadas em sacos plásticos umedecidos, de tamanho exato para contê-las, fechadas com fita crepe e levadas à incubadora, aí permanecendo a 23°C por uma semana.

Fig. 1. Bezerro doador com sacola coletora de fezes

Fig. 2. Larva infestante de 3^o estágio (L3) de *Dictyocaulus viviparus*- (320 x)

3.4.2. Obtenção da suspensão de larvas

Após o período de 7 dias, as culturas foram retiradas da incubadora e cobertas até a superfície com água morna (40°C), por uma hora. O líquido de lavagem foi retirado das formas, vertendo em um "becker", após o que com uma pipeta tipo Pasteur, retirou-se o restante que permaneceu nos furos da cultura. Esse líquido de lavagem das culturas foi então clarificado, a fim de se retirar todo o conteúdo fecal e obter-se uma suspensão de larvas limpas. Para essa clarificação utilizou-se um equipamento de filtração à vácuo, com um funil de Büchner de tamanho tal que permitiu o uso de papel de filtro Whatman nº 113, de diâmetro 18,5 cm. O papel-filtro contendo as larvas foi, então, colocado em contato direto com uma peneira de malha 0,125 mm e, esta colocada em funis com água morna à uma temperatura de 40°C , de modo a atingir a superfície do papel filtro. Na parte final, atado à uma mangueira de borracha, foi colocado um tubo de centrífuga de 20 ml. Após 12 horas, o tubo foi retirado, centrifugado a 2000 rotações por minuto, durante 10 minutos retirando-se o sobrenadante. No resíduo depositado no fundo, permaneceram as L3 (Fig. 2), que foram colocadas em placas de Petri, tampadas e mantidas na geladeira a 4°C , até o momento do uso.

3.4.3. Irradiação das larvas e preparo das doses de vacinas

Procedeu-se à contagem das larvas armazenadas, utilizando uma micro-pipeta de 0,20 ml e um conteúdo de 1 ml. Através desta contagem estimou-se a quantidade de L3 vivas contidas na suspensão, antes e após a irradiação. As larvas foram colocadas em placas de Petri, tampadas e levadas ao irradiador modelo Gammabeam-650 fabricado pela Atomic Energy of Canada Limited (Fig.3), que é uma fonte emissora de raios gama do cobalto-60. A dose de radiação gama foi de 400 Gy (40 krad) sob uma taxa de radiação de 1,6 kgy/hora (160 krad/hora), sendo portanto utilizado um tempo de irradiação de 15 minutos. Aps a irradiação, a suspensão foi mantida em geladeira por um dia, e, a seguir recontada.

Cada dose utilizada continha 1000 L3, completando-se o conteúdo com água até 20 ml.

3.5. Períodos experimentais

3.5.1. Período de vacinação

Dezoito animais foram divididos em 3 tratamentos segundo peso ajustado aos 210 dias, conforme a equação abaixo:

$$P_{210} = \frac{PA - PN}{I} \times 210 + PN$$

Fig. 3. Fonte de cobalto-60, emissora de raios γ , utilizada na elaboração das vacinas.

onde:

P_{210} = Peso ajustado aos 210 dias

PA = Peso na data de 29/04/81

PN = Peso ao nascer

I = Idade em dias na época da pesagem

TRATAMENTO A (VACINA DICTOL)				
Nº do animal	Peso ao nascer (kg)	Peso em 29/04 (kg)	P_{210d} (kg)	Idade (dias)
830	30,0	65,0	128,0	75
193	38,0	67,0	106,0	89
837	28,0	53,0	83,0	96
190	35,0	60,5	92,0	94
211	34,0	50,0	79,0	54
216	38,0	43,0	64,0	40
Médias	34,0	56,5	92,0	75

 TRATAMENTO B (VACINA CENA)

Nº do animal	Peso ao nascer (kg)	Peso em 29/04 (kg)	P _{210d} (kg)	Idade (dias)
195	38,0	63,0	100,0	84
845	38,0	65,0	99,0	93
206	28,0	51,0	106,0	62
210	30,0	49,0	100,0	57
217	38,0	39,0	44,0	35
844	38,0	51,0	67,0	93
Médias	35,0	53,0	86,0	70

 TRATAMENTO C (CONTROLE)

Nº do animal	Peso ao nascer (kg)	Peso em 29/04 (kg)	P _{210d} (kg)	Idade (dias)
202	40,00	56,0	90,0	67
208	35,0	52,0	98,0	57
851	27,0	47,0	84,0	74
204	34,0	50,0	96,0	65
200	34,0	50,5	79,0	76
840	37,0	68,5	108,0	93
Médias	34,5	54,0	92,5	72

Os animais foram distribuídos pelos tratamentos A, B e C de tal maneira a obter médias semelhantes.

O tratamento A constou da vacina irradiada Dictol, o tratamento B da vacina produzida no CENA, e o tratamento C permaneceu como controle. Os animais dos tratamentos A e B receberam duas doses das respectivas vacinas a intervalos de 4 semanas e permaneceram estabulados até o término do experimento.

3.5.2. Período do teste de desafio

Um mês após a 2^a dose das vacinas, os animais dos 3 tratamentos receberam sessenta larvas infestantes de D. vivíparus por quilograma de peso, por via oral, dose esta suficiente para produzir sintomas clínicos da doença em animais susceptíveis.

Durante todo o período experimental, tanto na fase de vacinação, como na do teste de desafio, os animais foram observados diariamente quanto à presença de tosse e alterações da frequência respiratória. Semanalmente, foram realizados exames de fezes pelas técnicas de Baermann e McMaster, e pesagem dos animais dos 3 tratamentos.

Os animais receberam tratamento adequado, quando algum sintoma não relativo à dictiocaulose foi observado.

3.5.3. Abate dos animais e exame dos pulmões

Um mês após o teste de desafio, os animais foram abatidos e o trato respiratório removido juntamente com o coração, adotando-se a técnica de perfusão para remover os *D. vivíparus* presentes. Essa técnica baseia-se na introdução de uma mangueira de borracha flexível na artéria pulmonar fixada nessa posição, por dupla ligadura com barbantes. A outra extremidade da borracha é colocada na torneira, abre-se esta com uma pressão tal que, ao passar a água pela artéria pulmonar penetra nos pulmões, rompendo os pequenos vasos sanguíneos e entra nos bronquíolos, retornando pelas passagens de ar, e finalmente emergindo na traquéia. Aproximadamente 10 litros são introduzidos nos pulmões, sendo a água de lavagem passada numa peneira fina (malha 0,125 mm) que retém os parasitos, os quais são posteriormente contados. (Fig. 4).

Fig. 4. *Dictyocaulus viviparus*, verme adulto

EXPERIMENTO 2

3.6. Local

O presente experimento foi realizado em três locais. A fase de vacinação desenvolveu-se na Estação Experimental de Zootecnia de Colina, SP, e o teste de desafio no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba, SP.

As vacinas foram preparadas no CENA e o abate dos animais deu-se no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa-SP.

3.7. Animais

Foram utilizados 20 bovinos, machos, castrados, mestiços do tipo mantiqueira com peso médio de 52,6 kg no início do teste e com idade de 2 a 3 meses. Os bezerros nasceram na Estação Experimental de Zootecnia de Colina e permaneceram estabulados desde o nascimento.

Todos os animais foram vacinados contra o paratifo aos 15 dias de idade.

Durante todo o período experimental, receberam feno de capim jaraguã (*Hyparrhenia rufa* (Ness.) Stapf.) à vontade e 1,0 kg de concentrado comercial Cargill, por animal, por dia. Sal mineral e farinha de osso foram fornecidos em cochos.

3.8. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com 2 tratamentos e 8 repetições.

A análise estatística para número de vermes que atingiram a maturidade e ganho de peso durante o período experimental, foram realizadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon, segundo recomenda CAMPOS (1976).

3.9. Preparação das vacinas

As vacinas foram preparadas seguindo-se o mesmo esquema do experimento 1, descrito anteriormente.

3.10. Períodos experimentais

3.10.1. Período de vacinação

Dezesseis animais foram divididos em 2 tratamentos por peso ajustado aos 210 dias e por idade, segundo o mesmo esquema do experimento 1 e sorteados do modo a formar os grupos conforme página seguinte.

 TRATAMENTO A - VACINA CENA

Nº do animal	Peso ao nascer (kg)	Peso 6/10 (kg)	P _{210d} (kg)	Idade (dias)
869	33,0	51,0	99,3	57
257	33,0	56,0	112,2	61
263	34,0	47,0	86,5	52
268	31,0	53,0	123,4	50
265	38,0	55,0	108,0	51
245	34,0	80,0	123,4	108
239	27,0	66,0	93,0	124
264	32,0	51,0	110,2	51
Médias	33,0	57,0	107,0	69,0

 TRATAMENTO B - CONTROLE

Nº do animal	Peso ao nascer (kg)	Peso 6/10 (kg)	P _{210d} (kg)	Idade (dias)
871	22,0	41,0	100,2	51
271	40,0	53,0	98,1	47
248	36,0	63,0	111,6	75
249	32,0	54,0	97,1	71
246	43,0	90,0	134,4	108
254	28,0	49,0	95,8	65
272	26,0	39,0	84,1	47
280	35,0	42,0	87,5	28
Médias	33,0	54,0	101,0	61,5

Os animais do tratamento A receberam a vacina preparada no CENA, oralmente, e os do B permaneceram como controles, não vacinados. Após 4 semanas foi dada a 2ª dose da vacina aos bezerros do grupo A.

Durante o período de vacinação, foram feitas duas pesagens, quando da ministração das doses e os animais de ambos os grupos permaneceram estabulados durante todo o experimento.

3.10.2. Período do teste de desafio

Quatro semanas após a 2ª dose da vacina, os animais de ambos os grupos receberam 60 L3 de *D. vivíparas* por quilograma de peso.

Durante todo o período de teste de desafio, foram realizadas pesagens semanais, anotada a frequência respiratória e feita a coleta semanal para exame de fezes (McMaster e Baermann). No decorrer do experimento sempre que algum sintoma não relacionado com a dictiocaulose foi observado, os animais foram submetidos à tratamento adequado.

O abate e exame dos pulmões dos animais foram realizados seguindo-se as mesmas técnicas já descritas no experimento 1.

Os outros quatro animais que não foram agrupados serviram como doadores de larvas para a obtenção das vaci

nas e para a realização do teste de desafio.

4. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

4.1. Número de vermes encontrados nos pulmões

Após a retirada dos vermes dos pulmões, o número de *D. viviparus* foi calculado mediante contagem individual dos parasitos que se estabeleceram. Os resultados encontram-se no quadro abaixo:

Tratamentos	Nº de bezerros	Nº total de <i>D. viviparus</i> na necropsia *	% de redução relativa ao controle
A (Dictol)	6	299	84
B (CENA)	4	133	86
C (Controle)	6	1892	-

*35 dias após o teste de desafio.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e ao nível de 1% de probabilidade observou-se efeito dos tratamentos (apêndice 1). Verificou-se que os tratamentos A e B não diferiram estatisticamente entre si, porém foram significativamente superiores ao C.

4.2. Porcentagem de larvas infestantes ministradas no teste de desafio que atingiram a maturidade.

A porcentagem de larvas infestantes (L3) que foram ministradas no teste de desafio e atingiram a maturidade, é mostrada no quadro abaixo:

Tratamentos	Nº de bezerros	Dose média de L3 no teste de desafio	% de <i>D. viviparus</i> nos pulmões (média)
A (Dictol)	6	4760	1,1
B (CENA)	4	4830	0,9
C (Controle)	6	4680	6,6

Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Apêndice 1) e ao nível de probabilidade de 1% observou-se que os tratamentos A e B não diferiram estatisticamente entre si, porém foram qualitativamente superiores ao C.

4.3. Peso corporal

Os pesos corporais médios dos animais dos tratamentos A, B e C são mostrados na figura 5.

Os bezerros do tratamento A perderam peso na primeira semana do experimento, porém após esta pequena queda engordaram gradativamente até o final do teste, quando os animais dos 3 grupos passaram a perder peso de novo.

Os do tratamento B, além do declínio na última semana, só emagreceram na 6^a semana, e os do tratamento C tiveram duas pequenas reduções de peso no período de vacinação durante a 2^a e 6^a semanas. No 21^o dia após o desafio houve uma diminuição no peso, e a partir daí continuaram a emagrecer até o término do teste.

A análise estatística das pesagens após a aplicação da 1^a e 2^a doses, no desafio e no abate foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, e os resultados que se encontram no apêndice 1, mostraram não haver diferença significativa entre os tratamentos nas diversas fases do experimento, ao nível de 5% de probabilidade.

4.4. Observações clínicas

Durante a fase de vacinação, entre a 2^a dose e o

Fig.5-Peso médio dos animais durante o período experimental nos tratamentos vacina Dictol, vacina CENA e controle

teste de desafio, dois animais pertencentes ao tratamento B (vacina-CENA) mostraram sinais de pneumonia infecciosa com aumento de temperatura, falta de apetite, apatia, dificuldade respiratória, tosse e perda de peso. Na necrópsia, grandes focos penumônicos e regiões purulentas por todo o pulmão foram observados. Esses animais comportaram-se de forma muito diferente dos outros pertencentes ao mesmo tratamento e tendo em vista que indivíduos com pneumonia infecciosa não devem ser vacinados ou desafiados (ARMOUR & URQUHART, 1974) os bezerros de nºs 210 e 844 foram eliminados.

4.4.1. Frequência respiratória

Os animais dos tratamentos A e B apresentaram-se normais durante todo o período experimental, com tosse ocasionais durante a fase de vacinação e desafio. Os animais do tratamento C mostraram tosse mais frequentes a partir da primeira semana após o desafio, tendo se constatado um aumento severo destas nas 4 semanas que se seguiram.

A média da frequência respiratória por minuto nos 3 tratamentos, nas diferentes fases experimentais é mostrada na figura 6. Observou-se que até o desafio, os indivíduos dos 3 tratamentos se comportaram de modo semelhante, mas após, os animais dos tratamentos A e B atingiram níveis acima de 40 respirações por minuto (rpm) nas duas primeiras semanas, para em seguida os valores bai

Fig. 6 - Média da frequência respiratória por minuto, durante o período experimental, dos animais nos tratamentos vacina Dietol, vacina CENA e controle

xarem novamente, e assim permanecerem até o final do teste. No mesmo período, os controles apresentaram um nítido aumento da frequência respiratória, já na primeira semana depois de desafiados, e depois em níveis crescentes atingiram um máximo (72 rpm) na 3ª semana.

4.4.2. Exame de fezes

Os vacinados e os controles apresentaram resultados negativos em seus exames de fezes durante toda a fase de vacinação. Na terceira semana após o desafio, um animal dos tratamentos A e B e os 6 do grupo C, apresentaram larvas nas fezes, com média de 50 L1 (larvas de primeiro estágio) por grama de fezes nos tratamentos A e B e 150 nos controles.

EXPERIMENTO 2.

4.5. Número de vermes encontrados nos pulmões

A contagem dos vermes que se desenvolveram nos pulmões dos animais do tratamento A (vacina-CENA) e B (controles) encontra-se no quadro na página seguinte:

Tratamentos	Nº de bezerros	Nº total de <i>D. viviparus</i> na necropsia*	% de redução relativa ao controle
A (CENA)	8	73	93,37
B (Controle)	8	4494	-

* 4 semanas após o teste de desafio

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste não paramétrico de Wilcoxon (Apêndice 2). Verificou-se que ao nível 0,1% de probabilidade o tratamento A foi superior ao B, quanto a proteção imunitária conferida pela vacinação.

4.6. Porcentagem de larvas infestantes ministradas no teste de desafio, que atingiram a maturidade

A porcentagem de L3 que se estabeleceram nos pulmões dos animais vacinados e controles, é mostrada no quadro na página seguinte.

Tratamento	Nº de bezerros	Dose média de L3 no teste de desafio	% de <i>D. vivíparas</i> nos pulmões (média)
A (CENA)	8	6800	0,14
B (Controle)	8	6520	8,35

A análise estatística dos resultados obtidos quanto à porcentagem de vermes que atingiram a maturidade é mostrada no apêndice 2. O teste utilizado foi o não paramétrico de Wilcoxon e ao nível de 0,1% de probabilidade mostrou haver diferença estatística significativa entre os dois tratamentos.

4.7. Peso corporal

Os pesos corporais médios dos bezerros dos grupos A e B, estão ilustrados na figura 7.

Durante o período de vacinação foram feitas 3 pesagens e a partir do teste de desafio, semanalmente.

Os vacinados permaneceram com aumento de peso constante durante o experimento. Os controles na 2ª e 3ª semanas depois de desafiados perderam peso, porém este foi recuperado nas duas últimas semanas.

Fig. 7 -Peso médio dos animais durante o período experimental dos grupos vacina CENA e controle

A análise estatística dos pesos na fase de vacinação (1ª e 2ª doses) no desafio e no abate foi realizada pelo teste de Wilcoxon, cujos resultados mostraram não haver diferença significativa entre os tratamentos nas diversas etapas do experimento.

4.8. Observações clínicas

4.8.1. Frequência respiratória

Durante a fase de vacinação, a frequência respiratória permaneceu sem grandes alterações, dentro dos valores normais, e somente algumas tosse ocasionais foram notadas nos bezerros vacinados. Depois do desafio, a frequência encontrase ilustrada na figura 8. Observa-se que o tratamento vacina-CENA, manteve uma média constante durante todo o período (35 rpm), enquanto que nos controles foi aumentando progressivamente até atingir o máximo (70 rpm) na 2ª semana depois de desafiados. Este valor caiu para novamente crescer na 4ª semana, porém acusando índices de frequência respiratória sempre bem acima da média dos vacinados.

4.8.2. Exame de fezes

Todos os animais apresentaram resultados negativos quanto à presença de larvas nas fezes, durante a fase de

Fig. 8 - Média da frequência respiratória por minuto, durante o período de desafio, dos animais do grupo vacina CENA e controle

vacinação. No 24^o dia da prova de desafio, 6 dos controles acusaram teste positivo, e os outros 2 restantes, também mostraram o mesmo resultado 3 dias mais tarde. Somente 2 dos vacinados acusaram larvas nas fezes. A média de L1/g de fezes foi de 200 para controles e 50 para os vacinados.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho numa primeira análise global, não diferem muito daqueles encontrados por outros autores que estudaram o assunto. Todavia, nem sempre foi possível estabelecer uma comparação adequada, uma vez que, em sua grande maioria, os autores consultados procederam a uma análise dos resultados utilizando-se simplesmente de mêdias ou mêdias e desvios padrões, ou ainda de ilustrações grãficas. No presente caso, tentou-se uma análise estatística mais elaborada, procurando compensar ou minimizar os inconvenientes da observação experimental conduzida com reduzido número de animais. Além desse cuidado, deve-se mencionar que o experimento 2 foi conduzido com a finalidade de comprovar as ob

servações do experimento 1, especialmente no que se refere à eficiência da vacina-CENA, fazendo uso de maior número de bezerros, escolhidos dentre animais que nunca haviam sido manejados em regime de pastagens.

5.1. Número de vermes encontrados e porcentagens de *D. viviparus* que se estabeleceram nos pulmões.

No experimento 1, no post-mortem, a quantidade de vermes encontrados nos pulmões dos bezerros tanto do tratamento A como do B foi estatisticamente significativa e inferior a do C. Isto mostrou que os animais vacinados estavam realmente mais protegidos que os controles, e que a vacinação diminuiu a porcentagem de vermes que se estabeleceram nos pulmões. A porcentagem de redução foi de 84% para o tratamento vacina-Dictol, e 86% para o tratamento vacina-CENA, quando comparada com a situação dos controles. Estes resultados concordam com os de vários autores, como JARRETT *et alii* (1959), ENGLEBRECHT (1961), BENITEZ-USHER *et alii* (1976) entre outros, que também observaram uma sólida imunidade advinda da vacinação.

Por outro lado, os resultados obtidos nos tratamentos A e B não diferiram entre si, o que permitiu a conclusão de que ambas as vacinas, Dictol e CENA, podem ser utilizadas igualmente como medida preventiva contra a dictiocaulose bovina.

A porcentagem de vermes que atingiram a maturidade confirma as observações anteriores, e os índices obtidos 1,1, 0,9 e 6,6, respectivamente para os tratamentos A, B e C são muito ilustrativos. O fato de que vermes podem se desenvolver nos pulmões de vacinados depois do desafio, já foi demonstrado por vários autores (CORNWELL, 1959; CORNWELL & BERRY, 1960; JARRETT *et alii*, 1959; JARRETT *et alii*, 1961 e BENITEZ-USHER, 1975). Estes autores sugeriram, a partir dessa observação, que bezerros vacinados e não vacinados devem permanecer em pastagens separadas, pois caso os primeiros venham a ter contato com larvas infestantes, funcionariam como portadores imunes da dictiocaulose, mantendo o nível de infestação nas pastagens. Por outro lado POYNTER & PEACOCK (1973) afirmaram que os não vacinados aumentam o nível de infestação das áreas a ponto de prejudicar a imunidade dos vacinados, e levá-los a acusar um quadro típico da doença.

No experimento 2, feito com o objetivo de confirmar a ação imunitária da vacina-CENA, observou-se também um alto grau de proteção dos vacinados em relação aos controles.

Ainda que as condições do experimento não tenham sido exatamente as mesmas, trabalhando-se inclusive com número pouco maior de animais, foi possível constatar uma maior eficiência da vacina-CENA, examinando-se tanto a porcentagem de redução dos vermes encontrados nos pulmões dos vacinados re

lativamente aos controles (93,37%) como a porcentagem de *D. viviparus* que se estabeleceram naquele órgão atingindo a maturidade (0,14% para os vacinados e 8,35% para os controles). Em ambos os parâmetros a situação dos controles é muito mais precária no experimento 2.

5.2. Peso corporal

A análise do peso corporal dos animais dos 3 grupos no experimento 1 e dos 2 grupos do experimento 2, mostrou não haver diferença estatística entre os dados obtidos nas 4 fases do experimento (1ª e 2ª doses, desafio e abate). Estes resultados diferem daqueles relatados por DOWNEY (1965), que em experimento sob condições de campo, encontrou diferença significativa no ganho de peso entre animais vacinados e controles, 6 semanas após entrarem nas pastagens.

A vacinação parece não ter afetado o peso dos animais que a receberam. Após o desafio, observou-se no experimento 1, uma perda de peso por volta da 4ª semana. Esta perda de peso nos tratamentos A e B, não deveria ser esperada, pois as observações de vários autores como JARRETT *et alii* (1959), JARRETT *et alii* (1961), POYNTER *et alii* (1960) mostraram que os vacinados continuam se desenvolvendo normalmente, aparecendo problemas somente quando a dose de desafio é muito elevada. DOWNEY (1965) constatou uma perda de peso em bezerros va

cinados durante a fase de vacinação, porém estes animais pos suiam somente 7 a 8 semanas de vida e esta observação foi con trária à de BENITEZ-USHER *et alii* (1976), trabalhando em condi ções semelhantes. Estes últimos autores verificaram sempre um desenvolvimento normal dos vacinados em todas as fases do expe rimento, e nos controles uma perda de peso constante a partir da 2ª semana após o desafio. No experimento 2 os vacinados per maneceram ganhando peso durante todo o decorrer do teste tal co mo descreveram BENITEZ-USHER *et alii* (1976).

Tanto no experimento 1 como no 2 os controles tiveram uma queda no peso corporal a partir da 2ª semana depois do desafio, porém no primeiro teste a perda de peso continuou até o final enquanto que no segundo, os controles se recupera ram nas duas últimas semanas do ensaio. A razão desta recupera ção não é muito clara, deixando entrever que trata-se de um fa to passageiro, pois, para melhor análise dos dados de peso em experimentos semelhantes, recomenda-se sempre que os animais permaneçam por um tempo mais longo em observações, uma vez que, somente após a 4ª semana, os vermes tornam-se adultos e começam sua postura, causando maiores problemas respiratórios aos ani mais, dificultando assim a sua alimentação.

Analizando a figura 5, que mostra o peso médio dos animais durante o período experimental, pode-se ver bem cla ramente que até o momento do teste de desafio, os 3 tratamentos

se revelaram bastante semelhantes. O mais importante a frisar é que os grupos de vacinados comportaram-se de modo semelhante aos controles. A partir da segunda semana do desafio observou-se uma queda para o grupo controle, que apesar de não ser estatisticamente significativa, corresponde a um ganho de peso de apenas 1 kg em 4 semanas, enquanto que para os tratamentos vacina-Dictol e vacina-CENA, os acréscimos verificados no mesmo período foram de 4 e 9 kg, respectivamente.

A figura 7 mostra o peso médio dos animais do experimento 2. Os animais de ambos os tratamentos, vacina-CENA e controles acusaram o mesmo acréscimo relativo a seus pesos iniciais até a primeira semana após o desafio. A partir desta até o abate, os animais do tratamento vacina-CENA engordaram em média 17 kg enquanto que os controles no mesmo período tiveram um acréscimo de peso de somente 10 kg. Estes resultados não se afiguram suficientes para demonstrar a importância econômica da vacinação, porém dão uma idéia dos prejuízos causados pela dictiocardiose e das reais vantagens do uso daquela medida profilática.

5.3. Observações clínicas

Em ambos os ensaios os bezérrs vacinados mantiveram-se em boas condições, com apetite normal. Os controles mostraram uma diminuição do apetite a partir da 3ª semana, e em

alguns animais, evidenciou-se diminuição de peso e perda de condições físicas.

5.3.1. Frequência respiratória

Nos dois experimentos houve um aumento da frequência respiratória logo após a aplicação de cada dose da vacina, porém os resultados concordaram com os de POYNTER *et alii* (1960) e CORNWELL (1962) que não consideraram significativo este aumento na frequência respiratória. Por outro lado, JARRETT *et alii* (1959) encontraram um acréscimo significativo na frequência respiratória após a primeira vacinação. BENITEZ-USHER *et alii* (1976), POYNTER *et alii* (1960), PIRIE *et alii* (1971) e CORNWELL (1962), trabalhando em condições diversas, observaram um aumento da frequência respiratória nos controles por volta da 2ª semana, apresentando valores bem acima daqueles encontrados nos vacinados até o final do teste.

A medida da frequência respiratória é muito importante na observação clínica da dictiocaulose, e sobre este aspecto pode-se concluir que os vacinados, em ambos os testes, mostraram valores acima dos normais, porém bem inferiores aos dos não vacinados.

As figuras 6 e 8 ilustram a média da frequência respiratória por minuto durante o período experimental dos ani

mais dos diferentes tratamentos. Os bezerros submetidos às vacinas Dictol e CENA permaneceram durante todo o período experimental com valores bastante próximos entre si, ocorrendo o mesmo com os controles até a primeira semana depois do teste de desafio, quando este grupo atingiu valores elevados. Esta taquipnéia, geralmente acompanhada de dispnéia, anorexia e perda de peso, poderia explicar a queda nos pesos médios dos animais controles nas figuras 5 e 7, no mesmo período em que foi observado um aumento da frequência respiratória, como mostram as figuras 6 e 8. A taquipnéia ocorre devido ao bloqueio dos brônquiolos pelas larvas que migraram para esses canais com produção de um exudato eosinofílico que dificulta a passagem de ar e causa grande irritação. (JARRETT *et alii*, 1957).

5.3.2. Exame de fezes

Os exames de fezes durante o período de vacinação, nos dois testes não acusaram a presença de larvas. Estas observações também foram feitas por JARRETT *et alii* (1959), JARRETT *et alii* (1961), CORNWELL (1962), MICHEL *et alii* (1965) e PIRIE *et alii* (1971), utilizando a vacina Dictol. Eles também concluíram que 40 kr de radiação permitia que um número pequeno de larvas se estabelecessem nos pulmões dos vacinados, porém sem alcançar a maturidade, e portanto, não aparecendo larvas nas fezes. Esta ausência de larvas nas fezes durante o período vem

confirmar a segurança nas vacinas, podendo-se então afirmar que ambas não foram patogênicas e que a dose de radiação de 40 kr produziu vacinas eficientes para o controle do *Dictyocaulus viviparus*, nas condições dos experimentos.

A constatação de larvas nas fezes dos animais vacinados após o teste de desafio é um fato comum, porém sempre em níveis mais baixos que nos controles. (JARRETT *et alii* 1958-b; PIRIE *et alii*, 1971 e BENÍTEZ-USHER *et alii*, 1976). Algumas larvas vencem a barreira imunológica mas a quantidade de adultos que persiste é geralmente pequena, e os animais se comportam como portadores sadios, com os vermes estabelecidos nos pulmões auxiliando na manutenção da imunidade dos vacinados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesses experimentos permitiram concluir que:

1. As vacinas Dictol e CENA não diferiram entre si quanto à eficácia na imunização de bezerros contra a dictiocaulose bovina.
2. Tanto a vacina Dictol como a CENA reduziram significativamente o número de *D. vivíparus* que se estabeleceram nos pulmões dos animais vacinados em relação aos controles.
3. A aplicação das vacinas Dictol e CENA não determinaram sintomas clínicos evidentes da dictiocaulose no que se refere a alterações da frequência respiratória e tosses.

7. LITERATURA CITADA

ARMOUR, J. e G.M. URQUHART. 1974. Clinical problems of preventive medicine - The control of helminthiasis in ruminants. *Br. Vet. J.*, London, 130:99-109.

BENITEZ-USHER, C.A., 1975. Some problems associated with the vaccination of ruminants against helminth infections. Glasgow, Veterinary School, University of Glasgow, 273 p. (Tese de Doutoramento).

BENITEZ-USHER, C.; J. ARMOUR e G.M. URQUHART. 1976. Studies on imunization of sucking calves with Dictol. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, 2:209-222.

CAMPOS, H., 1976. Estatística Experimental não paramétrica.

2^a ed., Piracicaba, Depto. de Matemática e Estatística. 332p.

CORNWELL, R.L., 1959. Parasitic bronchitis. The vaccinated calf as carrier. *Vet. Rec.*, London, 71:562.

CORNWELL, R.L., 1960. The complement fixing antibody response of calves to *Dictyocaulus viviparus*. III - Vaccinated calves exposed to challenge. *J. Comp. Path.*, Edinburgh, 70: 499-513.

CORNWELL, R.L., 1962. Husk in cattle. Laboratory and field studies on calves vaccinated with irradiated lungworm larvae. *Vet. Rec.*, London, 74(22):622-628.

CORNWELL, R.L. e J. BERRY. 1960. Observation on an outbreak of parasitic bronchitis initiated by vaccinated carriers calves. *Vet. Rec.*, London, 72(30):595-598.

CORNWELL, R.L. e J.F. MICHEL. 1960. The complement fixing antibody response of calves to *Dictyocaulus viviparus*. I - Exposure to natural and experimental infection. *J. Comp. Path.*, Edinburgh, 70:482-93.

DOWNEY, N.E., 1965. Live-weight changes and eosinophil responses in calves vaccinated against parasitic bronchitis and exposed to pasture infestation. *Vet. Rec.*, London, 77(31):890-895.

- DOWNEY, N.E., 1968. On-pasture vaccination against parasitic bronchitis in calves. *Vet. Rec.*, London, 82(12):338-342.
- ENGLEBRECHT, H., 1961. An experiment demonstrating the safety and potency of X-irradiated *Dictyocaulus viviparus* larvae vaccine in calves. *J. Parasit.*, Lancaster, 47(Sec.2), 21.
- GOULD, S.E.; H.J. GOMBERG; J.B. VILLELLA e C.S. HERTZ. 1955. Studies on *Trichinella spiralis*. *Am. J. Path.*, Boston, 31: 933-963.
- GREGOIRE, C. 1951. Brochite vermineuse des bovines. *Epidèmiologia, son incidence sur le traitement. Am. mèd. Vet.*, Bruxelles, 8:481-490.
- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; B. MARTIN; W.I.M. MCINTYRE; W. MULLIGAN; N.C.C. SHARP e G.M. URQUHART. 1958-a. A field trial of a parasitic bronchitis vaccine. *Vet. Rec.*, London, 70(22):451-454.
- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; W.I.M. MCINTYRE; W. MULLIGAN; N.C.C. SHARP e G.M. URQUHART. 1959. Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection in calves - Double vaccination with irradiated larvae. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 20:522-526.

- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; W.I.M. McINTYRE; G.M. URQUHART.
1955. Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus*
infection - Passive immunisation. *Vet. Rec.*, London, 67(16):
291-296.
- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; W.I.M. McINTYRE; W. MULLIGAN e
G.M. URQUHART. 1957. The natural history of parasitic
brochitis in cattle with notes on prophylaxis and treatment.
Vet. Rec., London, 69(49):1329-1340.
- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; W.I.M. McINTYRE; W. MULLIGAN e
G.M. URQUHART. In: PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF
MEDICINE. *Irradiated helminth larvae in vaccination*. 51,
1958-b. p. 51-53.
- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; W.I.M. McINTYRE; W. MULLIGAN e
G.M. URQUHART. 1960. Immunological studies on *Dictyocaulus*
viviparus infection. Immunity produced by the administration
of irradiated larvae. *Immunology*, Oxford, 3:145-151.
- JARRETT, W.F.H.; F.W. JENNINGS; W.I.M. McINTYRE; W. MULLIGAN e
N.C.C. SHARP. 1961. A pasture trial using 2 immunizing
doses of a parasitic brochitis vaccine. *Am. J. Vet. Res.*,
Chicago, 22(88):492-495.
- JARRETT, W.F.H.; W.I.M. McINTYRE e G.M. URQUHART. 1954. Husk
in cattle, a review of a year work. *Vet. Rec.*, London,
66:665-676.

- JONES, B.V. e A.M.R. NELSON. 1960. Lungworm vaccine in the field. *Vet. Rec.*, London, 72(20):395-396.
- LEVIN, A.J. e T.C. EVANS. 1942. Use of roentgen radiation in locating and origin of host resistance to *Trichinella spiralis* infections. *J. Parasitol.*, Lancaster, 28:477-483.
- MICHEL, J.F. 1954. A contribution to the aetiology of fog fever. *Vet. Rec.*, London, 66(27):381-384.
- MICHEL, J.F. 1955. Studies on host resistance to *Dictyocaulus viviparus*. *J. Comp. Path.*, Edinburgh, 65:149-159.
- MICHEL, J.F.; A. MACKENZIE; C.D., BRACEWELL; R.L. CORWELL; J. ELLIOT; C.N. HEBERT; H.H. HOLMAN e J.J.B. SINCLAIR. 1965. Duration of acquired resistance of calves to infection. *Rev. Vet. Sci.*, New York, 6:344-395.
- NELSON, A.M.R.; B.V. JONES e R. PEACOCK. 1961. Results of vaccination with lungworm (oral) vaccine in the field in 1960. *Vet. Rec.*, London, 73(7):153.
- PIERRE, M.; J. EUZÉBY; G. MALHER e A. JEANNING. 1961. De la connaissance du cycle biologique et les propriétés physiopathologique de *Dictyocaulus viviparus*. A l'immunisation contre la bronchite vermenense. *Bull. Soc. Sc. Vet. de Lyon*, Lyon, 63(1):69-81.

- PIRIE, H.M.; J. DOYLE; W.I.M. MCINTYRE e J.ARMOUR. The relationship between pulmonary lymphoid nodules and vaccination against *Dictyocaulus viviparus*. In: IV INTERNATIONAL CONFERENCE W.A.A.V.P. Pathology of parasitic diseases. 1971. *International ...*, 1971, 91-104.
- POYNTER, D.; B.V. JONES; A.M.R. NELSON; R. PEACOCK; J. ROBINSON; P.H. SILVERMAN e R.J. TERRY. 1960. Symposium in husk - (4) Recent experiences with vaccination. *Vet. Rec.*, London, 72(48):1078-1086.
- POYNTER, D. e R. PEACOCK. Some aspects of vaccination. In: URQUHART, G.M. & J. ARMOUR. Helminth diseases of cattle, sheep and horses in Europe. Glasgow, April 1973. Proceedings. Glasgow, The University Press, 1973. p. 30-31.
- POYNTER, D.; R. PEACOCK e H.C. MENEAR. 1970. The prevention and treatment of husk. *Vet. Rec.*, London, 82:148-1460.
- RUBIN, R. e J.T. LUCKER. 1956. The course and pathogenicity of initial infections with *Dictyocaulus viviparus*, the lungworm of cattle. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 17:217-226.
- SCHARTZ, B. 1921. Effects of X-rays on trichinae. *J. Agr. Res.*, Washington, 20(11):845-854.

- SOLIMAN, K.N. 1952. The clinical manifestation of bronchitis in cattle with a note on the epidemiology with special reference to adults. *Vet. Rec.*, London, 64(40):589-594.
- TAYLOR, E.L. 1951. Parasitic bronchitis in cattle. *Vet. Rec.*, London, 63(51):859-873.
- WEBER, T.B. 1958. The complement fixing antibody response of cattle infected or exposed to reinfection with *Dictyocaulus viviparus*. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 19:338-344.

A P Ê N D I C E 1

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1

As análises estatísticas do experimento 1 foram realizadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A - Número de vermes encontrados nos pulmões:

	A	B	C	
1	4	0	254	
2	149	69	719	
3	0	63	114	Onde: A = Vacina Dictol
4	11	1	309	B = Vacina CENA
5	36		408	C = Controle
6	99		88	

$$H = 8,828$$

$$H_0: t_1 = t_2 = t_3$$

H_a : pelo menos dois tratamentos diferem entre si.

Considerando-se $n_1 = 4$ e $n_2 = n_3 = 6$ e $\alpha = 0,01$ a tabela apropriada ao teste nos dá o limite $h = 8,00$, consequentemente H_0 é rejeitado e concluímos que pelo menos 2 tratamentos diferiram entre si.

Pelas comparações múltiplas, conclui-se que os tratamentos A e B não diferiram entre si, porém ambos foram

mais eficazes que o grupo controle.

B - Porcentagem de vermes desenvolvidos nos pulmões:

	A	B	C
1	0,1	0	6,7
2	2,6	1,5	15,6
3	0	2,0	3,3
4	2,9	0	5,9
5	0,2		6,6
6	0,8		1,9

$$H = 8,765$$

$$h = 8,000$$

Como $H > h$ rejeita-se $H_0: t_1=t_2=t_3$ em favor de H_a :
pelo menos dois tratamentos diferente entre si.

Pelas comparações múltiplas, conclui-se que os
tratamentos A e B não diferem entre si, porém ambos foram
mais eficazes que o tratamento C.

C - Pesos Corporais durante o período experimental:

1ª) Pesagem na 1ª dose das vacinas

	A	B	C
1	72	71	58
2	71	70	59
3	54	53	50
4	77	46	54
5	52		53
6	50		77

$$H = 0,367$$

$$h = 5,721 \text{ para } \alpha = 0,050$$

Como $H < h$ aceita-se $H_0: t_1 = t_2 = t_3$

Não há diferença estatística entre os 3 tratamentos.

2ª) Pesagem na 2ª dose da vacina

	A	B	C
1	78	87	64
2	81	81	68
3	65	63	64
4	82	48	50
5	56		55,5
6	52		87

$$H = 0,2499$$

$$h = 5,721 \text{ para } \alpha = 0,050$$

Não há diferença estatística entre os 3 trata
mentos.

3ª) Pesagem no teste de desafio

	A	B	C
1	95	98	77
2	95	95	87
3	73	77	78
4	94	52	58
5	62		63
6	57		103

$$H = 0,1000$$

$$h = 5,721 \text{ para } \alpha = 0,050$$

Como $H < h$ aceita-se $H_0: t_1 = t_2 = t_3$

Não há diferença estatística entre os 3 tratamentos.

4ª) Pesagem no abate

	A	B	C
1	109	110	81
2	99	117	101
3	83	100	90
4	120	64	64
5	75		63
6	68		108

$$H = 1,4972$$

$$h = 5,721 \text{ para } \alpha = 0,050$$

Como $H < h$ aceita-se $H_0: t_1 = t_2 = t_3$

Não há diferença estatística entre os 3 tratamentos.

A P P E N D I C E 2

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2

A análise estatística dos resultados do experimento 2 foi feita pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ou Soma das Ordens.

A - Número de vermes encontrados nos pulmões:

	A	B
1	0	88
2	7	722
3	4	802
4	5	31
5	0	137
6	39	1721
7	8	758
8	10	235

Onde: A = Vacina CENA

B = Controle

$$W = 99$$

$$H_0: \Delta = 0 \text{ vs } H_a: \Delta > 0$$

B - Porcentagem de vermes desenvolvidos nos pulmões:

	A	B
1	0	1,2
2	0,1	11,3
3	0,06	10,0
4	0,05	0,4
5	0,0	2,5
6	0,67	23,1
7	0,14	13,7
8	0,15	4,6

$$W = 99$$

Para número de vermes encontrados nos pulmões e porcentagem de vermes desenvolvidos nos pulmões, o limite superior encontrado na tabela apropriada ao teste, ao nível de $\alpha = 0,001$ foi $W_{1-\alpha} = 95$, o que nos leva a rejeição de H_0 , pois $W > 95$. Concluimos que os 2 tratamentos diferiram entre si.

C - Pesos corporais durante o período experimental

Indivíduos	1ª dose		2ª dose		Desafio		Abate	
	CENA	CONTROLE	CENA	CONTROLE	CENA	CONTROLE	CENA	CONTROLE
1	59	51	74	60	103	92	120	93
2	61	61,5	81	83	120	118	138	132
3	56,5	65	67	87	94	124	107	129
4	61	66	75	81	107	120	128	134
5	60	91	70	82	97	133	109	140
6	84	57	108	52	144	106	167,5	123
7	70	45	90	68	137	92	157	108
8	57	50	76	61	105	84	123	95
W = 63,5					W = 60,5		W = 61,5	

Ho: $\Delta = 0$ vs Ha: $\Delta \neq 0$

Os pesos corporais de ambos os tratamentos foram comparados em cada situação (1ª dose, 2ª dose, desafio e abate) conforme o quadro acima.

Na tabela apropriada ao teste, $W\alpha = 59$ e $W_{1-\alpha} = 77$ quando $\alpha = 0,191$, portanto aceitamos Ho e consequentemente não houve diferença estatística entre os tratamentos.