

Efecto del levamisol sobre la generación de anticuerpos antirrábicos en ovejas vacunadas al tercer mes de gestación

Magaly Bracamonte*, Gustavo Morales y Noris Plaza

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal. Av. Las Delicias. Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela. *Correo electrónico: mbracamonte@inia.gob.ve

RESUMEN

Se realizó un estudio experimental para determinar la generación de anticuerpos antirrábicos y su persistencia en el tiempo, en 30 ovejas preñadas de tres meses, mestizas razas West African y Barbado Barriga Negra. Se conformaron al azar tres grupos de estudio: grupo vacunado (10); grupo vacunado y desparasitado simultáneamente con levamisol, utilizado como desparasitante (10) y grupo control (10). Se evaluaron los sueros correspondientes a las ovejas de los tres grupos, desde los 0 días post vacunación hasta los 135 días, mediante la técnica de seroneutralización en ratones lactantes, y los títulos de anticuerpos se calcularon por la fórmula de Reed y Muench, considerando niveles $\geq 1:5$ protectivos contra la rabia. Para el estudio estadístico se empleó el análisis de varianza factorial 3 x 2 y para la separación de medias la prueba de Duncan. La respuesta serológica de los grupos G1 y G2 comienza a evidenciarse a partir de los 15 días post vacunación, alcanzando títulos más elevados en la fecha cercana al parto, entre 90 y 105 días post vacunación. Estadísticamente se comprobó en el grupo vacunado y desparasitado simultáneamente, una respuesta serológica significativamente mayor ($P < 0,05$) en comparación con el grupo que solo recibió vacuna, lo cual demuestra el efecto inmunopotenciador del levamisol en esta especie. Esta respuesta se ve reforzada con la condición del efecto hormonal después del parto ya que en las ovejas recién paridas los niveles de anticuerpos resultaron superiores y estadísticamente diferentes a los niveles correspondientes a las ovejas gestantes ($P < 0,05$).

Palabras clave: rabia, anticuerpos antirrábicos, inmunidad, ovinos.

Effect of levamisole on antibody generation in sheep vaccinated against rabies during the third month of pregnancy

ABSTRACT

An experimental study was carried out to evaluate the generation of antibodies for rabies virus and its persistence in time, using 30 pregnant West African and Barbados black belly sheep. Three groups of 10 sheep were randomly organized: (G1) vaccinated, (G2) vaccinated plus levamisol, and (G3) control. Serologic evaluation through seroneutralization test in lactating mice was done for all groups from 0 to 135 days, and antibodies titles were established using the Reed & Munch formula, considering levels greater than 1.5 as protectives against rabies. A factorial 3x2 analysis of variance and Duncan tests were used for statistical analysis. Serologic response was detected for G1 and G2 15 days after vaccination, reaching the highest titles between 90 and 105 days, just before parturition. Statistical significance ($P < 0,05$) between G1 and G2 showed the levamisol effect as potentiator of immune system in sheep, The ewe after partum had higher level of antibodies and significant different to pregnant ewe.

Keywords: rabies, antibodies for rabies, immunity, sheep.

INTRODUCCIÓN

Venezuela cuenta en su territorio con más de 4 millones de hectáreas de zonas áridas y semiáridas, las cuales constituyen un potencial para la ganadería ovina y caprina, como fuente de ingreso fundamental para los campesinos asentados en esas áreas, mediante la producción de carne, leche y pieles. Sin embargo, sería necesaria la introducción de nuevas tecnologías con el fin de mejorar su productividad (Reverón, 1990).

El último censo agrícola nacional oficial, registra una población ovina de 762.670 cabezas, lo cual muestra un incremento del 71% con respecto al anterior censo de 1985. Esta población está distribuida por todo el país, sobrepasando el millón de ejemplares, y en los estados Zulia y Falcón se concentra el 45% de la población total, ambos estados ubicados en la franja árida y semiárida, demostrando el determinismo climático de ubicación de la especie. La distribución de los rebaños dentro de las 29.254 explotaciones censadas está por el orden de 6,8% de sementales, 49,3% de machos, 21,6% de crías menores de seis meses y 22,3% de animales de reemplazo y para la venta. Sin embargo, muchas explotaciones con adelantos técnicos de manejo y producción, se utilizan para producción de corderos lechales y estos datos de distribución no estarían reflejados en el censo (MARNR, 2004).

El ganadero prefiere en la actualidad tener un rebaño ovino como fuente de abastecimiento de carne, a un menor precio que el sacrificio de un vacuno, por lo que se observa como se ha cuadruplicado en la última década su producción en estados como Barinas y Anzoátegui (MARNR, 2004). Igualmente, se evidencian condiciones futuras favorables de la explotación ovina durante las próximas dos décadas, debido al mejoramiento de las condiciones sanitarias, fertilidad, nutrición y potencial genético, sin necesidad de aumentar los recursos para su alimentación. Actualmente se podría hablar de una etapa de excelente recuperación de la cría ovina en el país, con el establecimiento de nuevas explotaciones, centros de cría altamente tecnificados en los estados Guárico, Anzoátegui, Monagas, Mérida, Táchira, Lara y Trujillo existiendo en Carabobo, Aragua y Miranda, explotaciones ovinas con sistemas tecnificados de importante producción, que generan

requerimientos crediticios y mayor demanda en el mercado interno para la cría y consumo.

El manejo sanitario de estos animales es similar a los de la ganadería bovina, existiendo explotaciones que diversifican su producción y toman en cuenta la vacunación antirrábica dentro de los planes de protección a los animales de la explotación. La prevención de la rabia en estos rebaños se orienta al control de la población de vampiros como principal agente transmisor, y a la vacunación de los susceptibles con la finalidad de lograr destruir las células infectadas por el virus rábico (Tizard, 2000). En vista de que los animales jóvenes son considerados inmunológicamente inmaduros, se recomienda vacunar a los corderos a partir de los 3 o 4 meses de edad, por lo que resulta muy importante garantizar altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra la rabia en el suero de las ovejas al momento del parto, que permitan una buena transmisión de anticuerpos a través del calostro. En estudios similares en otros rumiantes, se determinó que vacas vacunadas contra la rabia durante la gestación, garantizaron protección hasta los 4 meses de vida en los becerros, por transmisión de anticuerpos calostrales (Mora, 1991).

Por otra parte, se ha comprobado que el levamisol aumenta la resistencia a las infecciones experimentales de virus y protozoarios, y suprime células tumorales, y esta propiedad en particular le confiere una gran importancia, por ser el primero de una familia novel de agentes farmacéuticos de síntesis que actúa en la dinámica de la respuesta inmunitaria. Se debe diferenciar lo que es un estimulante que refuerza las defensas de forma no específica, de aquel que requiere la presencia de un antígeno inyectado simultáneamente para que aumente el efecto específico, bien sea humoral o celular (Diasio y Lo Buglio, 1996).

Todos los estudios indican que se deben ajustar los planes de vacunación, diseñando estrategias adecuadas derivadas de investigaciones desarrolladas en cada especie y adaptadas a nuestras condiciones (Mosquera, 1993), y como el levamisol es un desparasitante ampliamente utilizado en la especie ovina, del cual se ha demostrado su efecto inmunopotenciador en otras especies (Adrianova *et al.*, 1980; Bineva *et al.*, 1986; Ivanov *et al.*, 1987; Hogart-Scott *et al.*, 1980; Haasova *et al.*, 1990). El

objetivo de este trabajo fue evaluar la formación de anticuerpos antirrábicos en ovejas utilizando simultáneamente levamisol para comprobar sus bondades en esta especie, a fin de constituir un referencial tecnológico acorde con la realidad local.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó sobre un grupo de 30 ovejas preñadas de tres meses, primíparas, mestizas de las razas West African (WA) y Barbado Barriga Negra (BBN), ubicadas en las instalaciones del INIA-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay, estado Aragua, Venezuela, en condiciones ambientales de 450 msnm, con 26-29°C de temperatura promedio anual y 76% de humedad relativa. Todos los animales fueron sometidos a un mismo régimen de alimento balanceado con pasto fresco picado (*Panicum maximum*), alimento concentrado (300 g/anim/d) y suplemento vitamínico.

Para la selección de las ovejas, se les realizó un screening serológico a fin de demostrar la ausencia de anticuerpos antirrábicos al inicio de la prueba; además se comprobó su tiempo de gestación mediante estudios ecográficos.

En el ensayo se utilizó una vacuna antirrábica comercial, elaborada en cultivo celular, cuya potencia resultó con 1,9 UI/dosis de efectividad mediante la prueba NIH. Este método está basado en la neutralización de una serie de diluciones de sueros con una dosis constante de un virus de desafío, previamente titulado, y se usa para estudiar el valor inmunizante de vacunas antirrábicas comerciales (Kaplan y Koprowsky, 1976; Larghi y Nebel, 1980). Igualmente se aplicó un producto comercial como desparasitante, cuyo principio activo es levamisol al 7,5%.

Para medir los títulos de anticuerpos antirrábicos generados en las ovejas, se empleó la técnica de Seroneutralización en ratones adultos, desarrollada por Webster y Dawson (1935), y es también utilizada para identificación de virus rábico, siendo recomendada por el Comité de Expertos de la OMS sobre rabia (OMS, 1992). Con esta técnica cada muestra de suero se trabajó en diluciones base 5 y se enfrentaron a un virus de desafío fijo (CVS) con un título de $10^{5.8}$ DL₅₀/0,03 mL, cuya dilución de trabajo contenía 64 DL₅₀ de CVS. Los títulos de anticuerpos se calcularon por la fórmula de Reed y Muench

(1938) y se consideraron como niveles protectivos contra la rabia, menor o igual a 1:5, según las normas establecidas por el Comité de Expertos de la OMS (OMS, 1992).

Se estableció un experimento completamente aleatorizado, conformado por tres grupos:

Grupo 1 (G1): conformado por 10 ovejas (5 WA y 5 BBN), las cuales fueron inmunizadas con vacuna antirrábica inactivada, al tercer mes de gestación.

Grupo 2 (G2): conformado por 10 ovejas (5 WA y 5 BBN), las cuales fueron inmunizadas con vacuna antirrábica inactivada al tercer mes de gestación, y simultáneamente les fue aplicado un desparasitante comercial (levamisol al 7,5%), en dosis de 3 mg/kg de peso vivo.

Grupo 3 (G3) o control: conformado por 10 ovejas preñadas (5WA y 5 BBN), sometidas a las mismas condiciones de manejo y alimentación que el resto de las ovejas del ensayo, pero sin recibir ni vacuna antirrábica ni desparasitante.

Al cumplir los tres meses de gestación, a los tres grupos de ovejas les fue tomada una muestra de suero y ese mismo día, los grupos G1 y G2 recibieron los tratamientos antes mencionados, con el fin de determinar los niveles de anticuerpos antirrábicos a los 0 días post vacunación (PV), y luego se continuó la medición de anticuerpos cada 15 días, hasta los 135 días PV.

Para el estudio estadístico de los datos se tomó en cuenta los tres grupos conformados, el período de gestación (C1) y de parto (C2), y se empleó el análisis de varianza factorial de 3 x 2, utilizándose el denominador de la dilución (por ejemplo, 1:5 = 5), como variable respuesta, y como variables de clasificación el tratamiento de los grupos G1 y G2 y la condición C1 ó C2. Como prueba para la separación de medias se recurrió a la prueba de Duncan y se estableció como nivel de significación un valor de $P < 0,05$. El paquete estadístico empleado fue InfoStat (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se puede observar la respuesta serológica de los animales de los grupos G1 y G2 a partir de los 15 días PV, presentando valores superiores a los mínimos considerados como

protectivos contra la rabia ($\geq 1:5$), y alcanzando títulos más elevados en la fecha cercana al parto, entre 90 y 105 días PV, sugiriendo que el componente hormonal que se activa en este período pudiese estar relacionado con esa respuesta. Esta situación sigue un patrón ya comprobado con anterioridad por otros investigadores quienes han realizado ensayos en animales gestantes con seis tipos de vacunas diferentes, encontrando títulos considerados protectivos contra la rabia a partir de los 30 días PV (Arnold y Penty, 1979). Otros han obtenido en la misma especie, a los 29 días PV una media de títulos de anticuerpos de 1:60 (Fábrega, 1970). Igualmente, en el caso de aplicar dos vacunaciones se encontraron títulos mayores en los revacunados al momento del parto, hasta de tres veces superior a los vacunados con una sola dosis (Mora, 1991; Mosquera, 1993).

Sin embargo, se observó una mayor respuesta serológica en las ovejas paridas del grupo G2, siendo estos resultados comparables con los obtenidos en otros ensayos realizados en ovejas empleando vacuna clostridial más levamisol, donde se demostró un efectivo incremento de los niveles de anticuerpos a los componentes vacunales cuando fue administrada en combinación con el desparasitante (Hogart-Scott *et al.*, 1980).

Igualmente, en ensayos con ovejas empleando polivacuna contra enterotoxemia C y D más levamisol, se evidenció estimulación de la inmunogénesis contra el antígeno tipo D (Bineva *et al.*, 1986) y ensayos en vacas utilizando tuberculina más levamisol se encontró una respuesta humoral de forma abrupta, cuando éste se aplicó al 7^{mo} día PV a diferencia de animales no estimulados (Ivanov *et al.*, 1987).

Al comparar los niveles de anticuerpos antirrábicos de los tres grupos de estudio (Cuadro 1), se observan diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,05$). El mismo resultado se observa en la comparación entre la condición de gestante o parida (Cuadro 2), y entre los grupos y la condición ($P < 0,05$) (Cuadro 3).

Los valores más elevados de anticuerpos correspondieron a la combinación de tratamiento (G2) de vacunación antirrábica más levamisol. Así mismo, constatamos simultáneamente que el grupo de las ovejas paridas, presentó los mayores títulos de anticuerpos antirrábicos ($P < 0,05$).

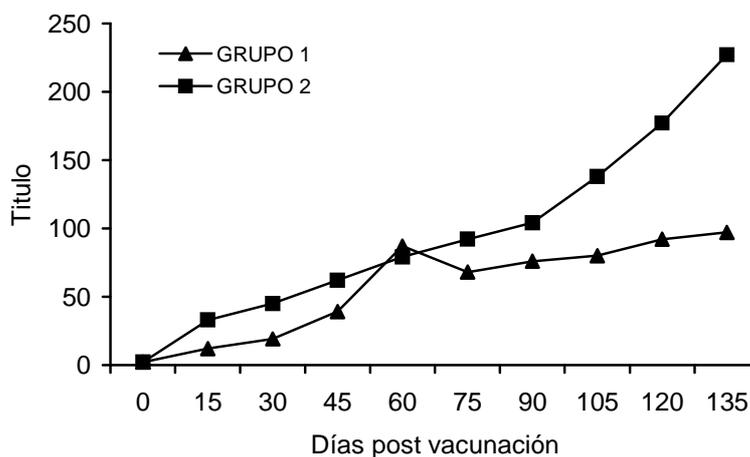


Figura 1 Títulos de anticuerpos antirrábicos en ovejas del Grupo 1 y Grupo 2

Cuadro 1. Comparación de los niveles de anticuerpos antirrábicos entre los grupos de estudio

Grupos	Anticuerpos†	n
G1	55,11b	100
G2	95,81c	100
G3	2,00a	100

† Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

n: Número de muestras de suero examinadas por grupo de estudio

Cuadro 2. Comparación de los niveles de anticuerpos antirrábicos entre la condición de gestante o parida.

Condición	Anticuerpos†	n
C1	23,97a	150
C2	77,98b	150

† Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

n: Número de muestras de suero examinadas por grupo de estudio

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En relación a la cinética de anticuerpos se observó en los días cercanos al parto, el efecto hormonal incide positivamente sobre la generación de anticuerpos antirrábicos en ovejas vacunadas al tercer mes de gestación, observándose a partir de ese momento niveles de anticuerpos significativamente altos.

La estrategia de vacunar ovejas gestantes, con vacuna antirrábica más levamisol induce una mayor respuesta en cantidad y tiempo de permanencia de anticuerpos, demostrando el efecto inmunopotenciador del desparasitante en esta especie.

Se amerita evaluar el desarrollo de la inmunidad pasiva contra la rabia en los corderos provenientes de madres vacunadas durante la gestación.

LITERATURA CITADA

- Arnold R. y L. Penty. 1979. Vacunación en bovinos contra la rabia. Centro Panamericano de Zoonosis, 15(3): 45-67.
- Bineva L., B. Peichev y M. Marinov. 1986. Trails of immunoestimulation of an antitoxic response with Levamisol in the immunization of sheep with a combined clostridial vaccine. *Vet. Medical Nauki.*, 23(4): 35-38.
- Diasio R. y A. Lo Buglio. 1996. Inmunomoduladores: Fármacos inmunosupresores e inmunoestimulantes. *En* Hardman J., L. Limbird, P. Molinoff, R. Ruddon y A. Goodman. (Eds) Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9^{na} ed, Mac Graw Hill. pp 36-58.
- Fábrega F. 1970. Respuesta inmune en bovinos vacunados con vacuna de cerebro de ratón lactante. II Congreso de Medicina Veterinaria y Zootécnica. *Boletín Centro Panamericano de Zoonosis*, 12(4): 36-87.
- Haasova I., O. Matouche, D. Jilek, V. Oral, J. Svejda y J. Richter. 1990. Intradermal method of vaccination with a human diploid cell tissue
- Adrianova L., E. Berger, G. Butenko y T. Echeneva. 1980. Experimental investigation on possibilities of regeneration of the immunity in old animals. *Zeitschrift fue Allgimine Mikrobiologie*, 35(2): 165-170.

- culture vaccine for preexposure antirrabies immunizations. *Cas Lek.*, 129(7): 216-218.
- Hogart-Scott R., D. Liardet y P. Morris. 1980. Levamisole vaccine combinations and heightened antibody response. *Australian Vet. J.*, 56(6): 285-291.
- Infostat. 2004. Manual Infostat Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ivanov L., R. Arzov, I. Simov, I. Dimov y I. Sizov. 1987. Effect of tuberculin and levamisole on the immune response after vaccinating calves against parainfluenza and salmonella infections. *Veterinary Medical Nauki.*, 24(4): 43-49.
- Kaplan M. y H. Koprowsky. 1976. La Rabia: Técnicas de Laboratorio, 3^{ra} ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- Larghi O. y A. Nebel. 1980. Duration of immunity afforded to cattle by binary-ethylamine inactivated rabies vaccine. *Zbl. Vet. Med. B.*, 32: 609-615.
- MARNR. 2004. Primer informe sobre la situación de los recursos zoogenéticos en la República Bolivariana de Venezuela. FAO/CDB. Caracas, Venezuela.
- Mora S. 1991. Respuesta inmune a vacunación antirrábica y transferencia de anticuerpos en bovinos Holstein-Friesian. Tesis de grado. Univ. Central Ven., Fac. Cien. Vet. Maracay, Venezuela.
- Mosquera O. 1993. Respuesta inmunitaria en becerros inoculados con diferentes tipos de vacunas antirrábicas. Tesis de grado, Univ. Zulia, Fac. Cienc. Vet. Maracaibo, Venezuela.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1992. Comité de Expertos sobre Rabia. 8^{vo} Informe. Serie de Informes Técnicos, N° 824, Ginebra.
- Reed L.J. y Muench M.A. 1938. Simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-497.
- Reverón A. 1990. Consideraciones sobre la producción y productividad de los corderos. Memorias Ciclo de Conferencias sobre Producción de Ovinos y Caprinos. Fonaiap, Fac. Agronomía, UCV. Maracay. pp.1-6.
- Tizard I. R. 2000. Inmunología Veterinaria. 6^{ta} ed. McGraw Hill.
- Webster L. y Dawson J. 1935. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 32: 570-573.