

# APLICAÇÃO EXPERIMENTAL DE UMA VACINA IRRADIADA CONTRA O *Dictyocaulus viviparus*<sup>1</sup>

SOLANGE MARIA GENNARI<sup>2</sup> e ADIBE LUIZ ABDALLA<sup>3</sup>

**RESUMO** - A imunidade de bezerros contra a dictiocaulose, mediante o uso de vacina irradiada, foi testada na Divisão de Ciências Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, SP. Dois grupos de oito bezerros cada um foram utilizados. Os do grupo A receberam a vacina atenuada pela irradiação contra o *Dictyocaulus viviparus* (Bloch 1782) e os do grupo B permaneceram como controle. A vacina foi ministrada oralmente, em duas doses, com um intervalo de quatro semanas. Seis semanas após a segunda dose, todos os bezerros receberam 60 larvas de *D. viviparus* por quilograma, cinco semanas mais tarde, foram abatidos, contando-se o número de vermes adultos estabelecidos nos pulmões. Notou-se uma diferença estatística significativa entre os tratamentos. O grupo vacinado apresentou uma redução de 98% no número de vermes encontrados nos pulmões. Na fase de vacinação, os animais de ambos os grupos tiveram ganhos de peso semelhantes. Na segunda semana após terem recebido as larvas infestantes, os bezerros do grupo controle apresentaram uma diminuição no peso corporal. A frequência respiratória, nos animais vacinados, mostrou valores acima dos normais, porém sempre inferiores aos dos não vacinados. Concluiu-se que a vacinação é um método eficaz na imunização de bezerros contra o *Dictyocaulus viviparus*.

Termos para indexação: imunização, dictiocaulose, bezerros, larvas infestantes, vermes dos pulmões.

## THE EXPERIMENTAL USE OF AN IRRADIATED VACCINE AGAINST *Dictyocaulus viviparus*

**ABSTRACT** - Studies on the immunization of calves against *Dictyocaulus viviparus* (Bloch 1782) using irradiated vaccine were carried out at Animal Science Division of Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, SP. Two groups with 8 calves each were used. Group A received the vaccine prepared at CENA against *D. viviparus*, and group B was used as unvaccinated control. The vaccine were given orally with 4 weeks interval between doses. Six weeks after the second vaccination, the animals of both groups were challenged with 60 normal *D. viviparus* larvae (60 L/kg). The animals were killed five weeks after the challenged dose. A statistically significant difference in the number of lungworm burden was noted between treatments, with a decrease of 98% as a result of vaccination. During the vaccination period the calves of both groups got weight similarly, and two weeks after the challenge dose a decrease in the body weight was observed in the control group. Respiratory rate in vaccinated calves showed to be above normal but was minimal when compared with their respective controls. It was concluded that the vaccine was efficient in the immunization of calves against *Dictyocaulus viviparus*.

Index terms: immunization, calves, infestant larvae, lungworms.

## INTRODUÇÃO

A dictiocaulose é uma importante doença de bovinos causada pelo *Dictyocaulus viviparus*, um nematóide amplamente distribuído pelo mundo. Acomete principalmente bovinos jovens causan-

do distúrbios respiratórios graves e, muitas vezes, a morte. As primeiras ocorrências relatadas sobre este parasito vêm de épocas da Grécia e Roma antigas.

Taylor (1951), na Inglaterra, e Gregoire (1951), na Bélgica, observando animais a nível de campo, relataram que bezerros reinfestados pelo *D. viviparus* mostravam-se protegidos. Mais tarde, Jarrett et al. (1954), observando, por um ano, 40 fazendas na Escócia, onde a dictiocaulose era um grave problema, notaram, também, que animais expostos à infestação, quando sobreviviam, acabavam por desenvolver um alto grau de imunidade que os protegia numa reinfestação. Estas observações continuaram a ser confirmadas por vários autores. Michel (1954) relatou que, em bezerros reinfesta-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 8 de fevereiro de 1983. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à ESALQ/USP, Piracicaba. Trabalho realizado com recursos financeiros da CNEN, CNPq e FINEP.

<sup>2</sup> Méd. Vet., M.Sc., Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Caixa Postal 11049, CEP 05568 - São Paulo, SP.

<sup>3</sup> Aluno da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP, estagiário da Divisão de Ciências Animais do CENA e bolsista da CNEN.

dos, a doença 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, e chamou de "autocura" a este fenômeno, nome este já sugerido por Stole (1929) para parasitos do trato digestivo.

Estas observações deram origem a tentativas experimentais de induzir imunidade à pneumonia verminótica. Jarrett et al. (1955), primeiramente, utilizaram soro hiperimune de animais infestados e já recuperados da doença. Este soro foi ministrado via intraperitoneal a bezerros susceptíveis. Após o teste de desafio com larvas normais do parasito, observou-se um certo grau de proteção nos bezerros, quando comparados com os do grupo controle.

Jarrett et al. (1957), tentando uma imunização ativa através de injeções intramusculares de antígeno, verme adulto, mais adjuvante, obtiveram resultados que mostraram a necessidade de um esquema de vacinação que dificilmente poderia ser implantado a campo e, portanto, de valor limitado. No mesmo trabalho, os autores publicaram as primeiras informações sobre uma vacina atenuada pela irradiação. Utilizaram o raio X e atenuaram larvas de *D. viviparus* tornando-as incapazes de completar o ciclo biológico, porém permitindo que elas estimulassem o organismo do animal a uma resposta imunogênica. A vacinação constou de uma dose única de 4.000 larvas infestantes de terceiro estágio (L3) irradiadas, e os bezerros foram desafiados, após seis semanas, com a mesma quantidade de L3 normais. A vacina mostrou bons resultados e estimulou novas pesquisas. Em 1959, após vários testes a nível de laboratório e campo, a vacina teve sua produção iniciada em âmbito comercial, na Grã-Bretanha, sob o nome de Dictol (Allen & Hanbury's Ltd., Ware, UK.).

Desde então, esta vem sendo utilizada em várias partes do mundo. As doses são dadas oralmente. Estudos mostram que o melhor esquema de vacinação consta de duas doses com intervalos de duas a quatro semanas, devendo os vacinados permanecer estabelecidos ou em locais livres do parasito e desafiados, natural ou artificialmente, 21 dias após a segunda dose.

Englebrecht (1961), nos Estados Unidos, encontrou uma média de 636 vermes adultos nos

pulmões dos controles, contra 3,8 nos dos vacinados. Downey (1965), sob condições de campo na Irlanda, observou 80% de mortalidade para os não vacinados e apenas 18% para os que receberam a vacina. Dez anos após o uso de Dictol na Grã-Bretanha, Poynter et al. (1970), revelaram que a prevalência da infestação em animais era de apenas 0,35%. Na Suíça a vacinação foi obrigatória em fazendas que possuíssem a doença; em três anos (1971-1973), a percentagem de casos clínicos caiu de 57 para 15%, segundo Eckert (Benitez-Usher, 1975). A vacina também já foi testada na Holanda, Dinamarca, Alemanha, Suécia, França e outros países da Europa, sempre com grande sucesso.

Em quase todos os trabalhos, os parâmetros analisados foram número de vermes adultos que se estabeleceram nos pulmões após o teste de desafio e sintomas clínicos da doença. Quanto ao primeiro parâmetro, os resultados mostram-se sempre inferiores para os animais vacinados, enquanto a frequência respiratória apresenta valores ligeiramente alterados após as vacinações, e depois do teste de desafio os bezerros vacinados tem mostrado valores um pouco acima do normal, porém estes índices são sempre inferiores aqueles encontrados nos controles (Jarrett et al. 1959 e 1961, Poynter et al. 1960, Cornwell 1962, Pirie et al. 1971, Benitez-Usher et al. 1976).

Jarrett et al. (1959 e 1961) e Benitez-Usher et al. (1976), entre outros, analisaram peso corporal em seus experimentos com vacinação, e concluíram que esta não interfere no ganho de peso e que os animais vacinados continuam a se desenvolver normalmente. Downey (1965), em experimentos a nível de campo, observou que os vacinados perderam peso na sexta semana após terem entrado na área contaminada, porém foi uma perda passageira.

A validade da vacina é de apenas 20 dias após a fabricação, uma vez que é uma vacina viva. Armour & Urquhart (1974) recomendaram o uso desta, somente em animais comprovadamente sadios. Caso o animal tenha tido uma pneumonia infecciosa antes da vacinação, esta só deverá ser aplicada após o término dos sintomas clínicos e recuperação completa do animal.

O objetivo do presente trabalho foi obter uma

vacina irradiada contra a dictiocaulose bovina e testá-la, em nosso meio, a nível de laboratório.

### MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na Divisão de Ciências Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, Piracicaba, SP.

Foram utilizados 16 bovinos mestiços, castrados, com peso médio de 52,6 kg e idade de dois a três meses no início do experimento.

Aos 15 dias de idade, os animais foram vacinados contra o paratifo; um mês antes do início do experimento, receberam vermífugo à base de tiabendazol.

Os bezerros tiveram livre acesso à água, sais minerais, farinha de ossos, feno de capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa* (Ness.) Stapf.) e 1 kg de concentrado comercial por animal, por dia.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com dois tratamentos e oito repetições.

A análise estatística para número de vermes desenvolvidos nos pulmões, percentagem de vermes que atingiram a maturidade e ganho de peso durante o período experimental foi feita através do teste não paramétrico de Wilcoxon (Campos 1976).

A vacina foi preparada a partir da cultura de fezes de bezerros infestados experimentalmente. As fezes após homogeneizadas foram espalhadas em formas tipo pires em camadas de aproximadamente 1 cm; com um bastão de vidro, foram feitos pequenos orifícios por toda a extensão da forma. Foram depois colocadas em sacos de plástico umedecidos, posteriormente fechados com fita crepe, e incubadas a 23°C por uma semana. Decorrido esse período, colocou-se sobre as culturas, até cobrir a superfície, água aquecida a 40°C. Após uma hora, o líquido foi vertido em um bécher, e com uma pipeta tipo Pasteur, retirou-se o restante que permaneceu nos orifícios feitos anteriormente. Esse líquido foi clarificado, afim de obter uma suspensão de larvas limpas. Para isso, utilizou-se um equipamento de filtração a vácuo, com um funil de porcelana de Büchner, de 186 mm de diâmetro, e papel de filtro Watmann número 113, com 18,5 cm de diâmetro. O lado do papel do filtro que continha as larvas foi colocado em contato direto com uma peneira de malha de 0,125 mm e esta sobre um funil de vidro. Na haste do funil, adaptou-se, com o auxílio de uma mangueira de borracha, um tubo de centrífuga, e colocou-se água aquecida a 40°C, com o objetivo de permitir a migração das larvas do papel de filtro para o fundo do tubo. Após doze horas, o tubo foi retirado e centrifugado a 2.000 rpm, por dez minutos. O sobrenadante foi desprezado; ao precipitado que continha as larvas infestantes (L3), foram adicionados, aproximadamente, 50 ml de água. Essa suspensão foi colocada em placa-de-petri e armazenada, em geladeira a 4°C, até o momento do uso.

As larvas armazenadas foram contadas, utilizando-se, para isso, micropipeta de 0,20 ml e conteúdo de 1 ml.

Através dessa contagem, estimou-se a quantidade de L3 vivas, antes e depois da irradiação. As larvas foram colocadas novamente em placas-de-petri e levadas ao Irradiador Gammabeam-650, emissor de raios gama de Cobalto-60, fabricado pela Atomic Energy of Canada Limited. A dose de radiação gama utilizada foi de 400 Gy (40 krad) sob uma taxa de radiação de 1,6 kGy/hora (160 krad/hora). Foi, portanto, utilizado um tempo de irradiação de quinze minutos. Após a irradiação, a suspensão foi mantida em geladeira por um dia e, a seguir, recontada. As doses foram preparadas de modo a conter 1.000 L3 atenuadas e acrescentou-se água até completar 20 ml.

Os bezerros foram divididos em dois grupos homogêneos em peso e idade. Um grupo recebeu o tratamento A, vacina irradiada atenuada, e o outro grupo, o tratamento B, controles não vacinados.

Os animais do tratamento A receberam, via oral, duas doses da vacina com intervalos de seis semanas. Um mês após a segunda dose, realizou-se o teste de desafio, que teve a duração de cinco semanas e foi iniciado com o fornecimento, pela mesma via, de 60 larvas infestantes de *D. viviparus* por quilograma de peso vivo.

Na ocasião das vacinações, todos os bezerros foram pesados. Durante o teste de desafio, as pesagens dos animais e coleta de fezes para exames (McMaster e Baermann) foram semanais. Diariamente registrou-se a frequência respiratória.

O teste de desafio terminou com o abate dos animais. O trato respiratório foi removido juntamente com o coração, adotando-se a técnica de perfusão para remover os vermes presentes. Essa técnica consta da introdução, na artéria pulmonar, de uma mangueira de borracha flexível, fixada nessa posição por dupla ligadura com barbantes. A outra extremidade da mangueira é colocada numa torneira. Aproximadamente, dez litros de água são introduzidos nos pulmões rompendo os pequenos vasos sanguíneos. A água penetra nos bronquíolos, retornando pelas passagens de ar; finalmente, emerge pela traquéia. A água é recebida numa peneira fina (malha 0,125 mm), que retém os parasitos. Estes são, posteriormente, contados para verificar a quantidade de *D. viviparus* que se estabeleceu nos pulmões dos animais de ambos os grupos.

### RESULTADOS

**Número de vermes encontrados nos pulmões e percentagem de nematóides que atingiram a maturidade relativa à dose de desafio**

Após a retirada dos vermes dos pulmões, o número de *D. viviparus* foi calculado mediante contagem individual. A percentagem de larvas infestantes que atingiram a maturidade relativa à dose de desafio e a quantidade de vermes encontrados na necropsia estão ilustradas na Tabela 1.

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste não-paramétrico de Wilcoxon. O limite superior encontrado na tabela apropriada ao teste ao nível de  $\alpha = 0,001$  foi  $W_{1-\alpha} = 95$ . O resultado do teste mostrou  $W = 99$ , o que provocou a rejeição de  $H_0: \alpha = 0$  e aceitação de  $H_a: \Delta > 0$ . Concluiu-se que os dois tratamentos diferiram entre si e que o tratamento A, vacinados, foi superior ao B, controles, quanto à proteção imunológica conferida pela vacinação.

#### Peso corporal

Os pesos corporais médios dos bezerros dos grupos A e B, estão ilustrados na Fig. 1.

Durante o período de vacinação realizaram-se três pesagens; a partir do teste de desafio, estas foram semanais.

Os pesos corporais dos animais de ambos os grupos foram comparados em cada situação (primeira e segunda dose, desafio e abate), analisados através do teste não-paramétrico de Wilcoxon que mostrou valores de  $W = 63,5; 60,5; 60,5$  e  $61,5$ ; respectivamente, para primeira dose, segunda dose, desafio e abate. Na tabela apropriada ao teste,  $W = 59$  e  $W_{1-\alpha} = 77$  quando  $\alpha = 0,191$ ; portanto, aceitou-se  $H_0: \Delta = 0$  e rejeitou-se  $H_a: \Delta \neq 0$ . Conseqüentemente, não houve diferença estatística entre os tratamentos no tangente a peso corporal nas situações analisadas.

#### Observações clínicas

Durante a fase de vacinação, a frequência respiratória não apresentou grandes alterações e observaram-se tosses ocasionais nos animais vacinados. Depois do desafio, a frequência respiratória média dos bezerros dos tratamentos A e B encontra-se ilustrada na Fig. 2. Observa-se que os animais vacinados mantiveram uma média constante du-

rante todo o período de desafio (35 respirações por minuto), enquanto que, nos controles, esta taxa foi aumentando progressivamente até atingir o máximo (70 respirações por minuto), na segunda semana depois de desafiados. Na terceira semana, este valor caiu para novamente crescer na última semana, porém observaram-se, nos controles, índices sempre bem acima da média dos valores encontrados nos vacinados.

#### Exame de fezes

Todos os animais apresentaram resultados negativos quanto à presença de larvas nas fezes durante a fase de vacinação. No vigésimo quarto dia após

desafiados, seis dos controles acusaram teste positivo; os dois restantes também mostraram o mesmo resultado, três dias mais tarde. Somente dois dos vacinados apresentaram larvas nas fezes no

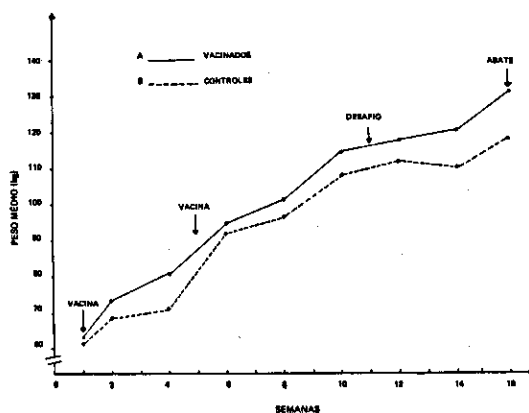


FIG. 1. Peso médio dos animais durante o período experimental do grupo vacina CENA e controle.

TABELA 1. Número médio de *Dictyocaulus viviparus* e percentagem de vermes que se desenvolveram nos pulmões relativa à dose de desafio, dos bezerros dos tratamentos A (vacinados) e B (controles).

Tratamentos	Dose média de L3 de <i>D. viviparus</i> no teste de desafio	Nº médio de <i>D. viviparus</i> na necropsia	Variação		<i>D. viviparus</i> nos pulmões (%)
			mínima	máxima	
A (vacinados)	6.802	9	0	39	0,31
B (controles)	6.517	562	31	1.721	8,62

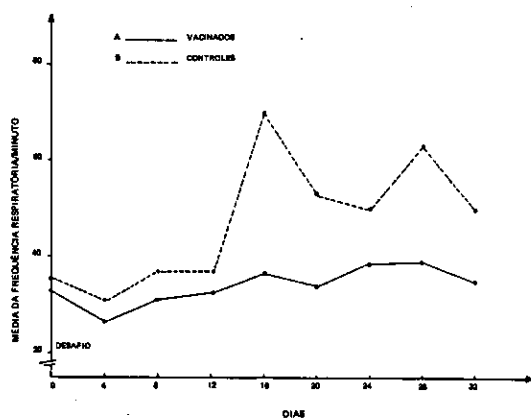


FIG. 2. Média da frequência respiratória por minuto, durante o período de desafio, dos animais do grupo vacina CENA e controle.

vigésimo quinto dia após desafio. A média de larvas de primeiro estágio (L1) observada no exame das fezes (técnica de McMaster) foi de 50 larvas por grama de fezes para os vacinados e 200 para os controles.

### DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, numa primeira análise global, não diferiram muito daqueles encontrados por outros autores que estudaram o mesmo assunto. Uma comparação adequada nem sempre foi possível de ser realizada, uma vez que grande parte dos autores não trabalharam com análise estatística, utilizando simplesmente médias, médias e desvios padrões ou simplesmente ilustrações gráficas.

#### Número de vermes encontrados e percentagem de *D. viviparus* que se estabeleceram nos pulmões

No postmortem, a quantidade de vermes encontrados nos pulmões dos animais do tratamento A foi estatisticamente significativa e inferior à dos animais do tratamento B. Isto mostrou que os animais vacinados estavam realmente mais protegidos que os controles e que a vacinação diminuiu 98,37% a percentagem de vermes que se estabeleceram nos pulmões. Estes resultados concordam com os de vários autores, como Jarrett et al. (1957), Englebrect (1961), Downey (1965), Benitez-

Usher et al. (1976), que também observaram uma sólida imunidade advinda da vacinação.

A percentagem de vermes que atingiram a maturidade confirma as observações anteriores. Os índices obtidos de 0,14 e 8,3%, respectivamente, para os tratamentos A e B, são muito ilustrativos. O fato de que vermes podem se desenvolver nos pulmões de vacinados após o desafio, já foi demonstrado por vários autores (Jarrett et al. 1959 e 1961, Benitez-Usher 1975), que 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 infestações nas pastagens.

#### Peso corporal

A análise do peso corporal dos animais de ambos os tratamentos mostrou não haver diferença estatística entre os dados obtidos nas quatro fases do experimento (primeira e segunda dose, desafio e abate). Downey (1965), em experimento de vacinação sob condições de campo, encontrou diferença significativa entre os animais vacinados e controles, porém somente seis semanas após terem entrado nas pastagens.

A vacinação não afetou o peso dos animais que a receberam, pois estes continuaram a se desenvolver normalmente durante todo o decorrer do experimento, tal como descreveram Benitez-Usher et al. (1976). Os controles apresentaram uma queda no peso corporal a partir da segunda semana depois do desafio, porém houve uma recuperação nas duas últimas semanas do ensaio. A razão desta recuperação não é muito clara, deixando entrever que se trata de um fator 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 quarta semana, os vermes tornam-se adultos e começam a postura, o que causa maiores problemas respiratório aos animais, dificultando, assim, a alimentação.

Analisando na Fig. 1 o peso corporal médio dos animais durante o período experimental, pode-se ver bem claramente que os bezerros de ambos os tratamentos, vacinados e controles, acusaram o

mesmo acréscimo relativo a seus pesos iniciais até a primeira semana após o desafio. A partir de então até o abate, os animais do tratamento A engordaram, em média, 17 kg, enquanto os controles, no mesmo período, tiveram um acréscimo de peso de somente 10 kg. Estes resultados não são suficientes para demonstrar a importância econômica da vacinação, porém dão uma idéia dos prejuízos causados pela dictiocaulose e das reais vantagens do uso da vacinação como medida profilática.

Os animais vacinados mantiveram-se em boas condições com apetite normal. Os controles mostraram uma diminuição do apetite a partir da terceira semana; em alguns animais, evidenciou-se diminuição de peso e perda de condições físicas.

A frequência respiratória, nos vacinados, mostrou um aumento logo após a aplicação de cada dose da vacina, como se pode observar na Fig. 2. Estas observações concordam com as de Poynter et al. (1960) e Cornwell (1962), que não consideraram significativo este aumento, mas, simplesmente, resultado do início da resposta imunológica.

Cornwell (1962), Pirie et al. (1971) e Benitez-Usher et al. (1976), entre outros, observaram um aumento da frequência respiratória nos controles, por volta da segunda semana após desafiados, tal como ocorreu neste ensaio, com valores bem acima daqueles encontrados nos vacinados até o final do teste. Durante todo o período experimental, os animais do tratamento A apresentaram tosses esporádicas, enquanto que, nos controles, sete dias após o desafio, as tosses iniciaram também de modo esporádico, porém tornaram-se mais frequentes com o decorrer do teste.

Durante o período de vacinação, os exames de fezes não acusaram a presença de larvas. Estas observações também foram feitas por Jarrett et al. (1961), Cornwell (1962) e Pirie et al. (1971), utilizando a vacina comercial britânica Dictol. Esta ausência de larvas nas fezes durante o período de vacinação vem confirmar a segurança da vacina, podendo-se afirmar que esta não foi patogênica e que 40 krad produziram uma vacina eficiente para o controle do *Dictyocaulus viviparus*.

A constatação de larvas nas fezes dos animais vacinados após o teste de desafio é fato comum e já

observado anteriormente por Pirie et al. (1971) e Benitez-Usher et al. (1976), entre outros. Algumas larvas podem vencer a barreira imunológica e se desenvolver, atingindo a maturidade e eliminando larvas, porém a sintomatologia clínica é amena, a quantidade de larvas também é pequena e os animais se comportam como portadores sadios.

### CONCLUSÕES

1. A vacina produzida no CENA, atenuada pela radiação gama, reduziu significativamente o número de *Dictyocaulus viviparus* que se estabeleceu nos pulmões dos animais vacinados em relação aos controles.

2. A aplicação da vacina não determinou o aparecimento de sintomas clínicos evidentes da dictiocaulose.

### AGRADECIMENTOS

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, SP, pela doação dos animais e feno, bem como pelo uso das instalações para o abate dos animais.

À Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), pelo auxílio técnico e financeiro.

### REFERÊNCIAS

- ARMOUR, J. & URQUHART, G.M. Clinical problems of preventive medicine - The control of helminthiasis in ruminants. *Br. vet. J.*, London, 130:99-109, 1974.
- BENITEZ-USHER, C.A. Some problems associated with the vaccination of ruminants against helminth infections. Glasgow, Veterinary School, University of Glasgow, 1975. 273p. Tese Doutorado.
- BENITEZ-USHER, C.A.; ARMOUR, J. & URQUHART, G.M. Studies on immunization of suckling calves with Dictol. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, 2:209-22, 1976.
- CAMPOS, H. Estatística experimental não-paramétrica. 2.ed. Piracicaba, Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ, 1976. 332p.
- CORNWELL, R.L. Husk in cattle: laboratory and field studies on calves vaccinated with irradiated lungworm larvae. *Vet. Rec.*, London, 74(22):622-8, 1962.

- DOWNEY, N.E. Live-weight changes and eosinophil responses in calves vaccinated against parasitic bronchitis and exposed to pasture infestation. *Vet. Rec.*, London, 77(31): 890-5, July. 1965.
- ENGLBRECHT, H. An experiment demonstrating the safety and potency of X-irradiated *Dictyocaulus viviparus* larvae vaccine in calves. *J. Parasitol.*, Lancaster, 47(2): 21, 1961.
- GREGOIRE, C. Bronchite vermineuse des bovidés. Epidémiologie: son incidence sur le traitement. *Ann. Méd. Vét.*, Bruxelles, 8: 481-90, Dec. 1951.
- JARRETT, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; MCINTYRE, W.I. M.; MULLIGAN, W. & SHARP, N.C.C. A pasture trial using 2 immunizing doses of a parasitic bronchitis vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 22(88): 492-5, May. 1961.
- JARRETT, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; MCINTYRE, W.I. M.; MULLIGAN, W.; SHARP, N.C.C. & URQUHART, G.M. Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection in calves - Double vaccination with irradiated larvae. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 20: 522-6, 1959.
- JARRETT, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; MCINTYRE, W.I. M.; MULLIGAN, W. & URQUHART, G.M. Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection - Passive immunization. *Vet. Rec.*, London, 67(16): 291-6, April. 1955.
- JARRETT, W.F.H.; JENNINGS, F.W.; MCINTYRE, W.I. M.; MULLIGAN, W. & URQUHART, G.M. The natural history of parasitic bronchitis in cattle with notes on prophylaxis and treatment. *Vet. Rec.*, London, 69(49): 1329-40, 1957.
- JARRETT, W.F.H.; MCINTYRE, W.I.M. & URQUHART, G.M. Husk in Cattle - A review of a year's work. *Vet. Rec.*, London, 66: 665-76, 1954.
- MICHEL, J.F. A contribution to the aetiology of fog fever. *Vet. Rec.*, London, 66(27): 381-4, 1954.
- PIRIE, H.M.; DOYLE, J.; MCINTYRE, W.I.M. & ARMOUR, J. The relationship between pulmonary lymphoid nodules and vaccination against *Dictyocaulus viviparus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE W.A.A. V.P., 4, Pathology of parasitic diseases. 1971. p.91-104.
- POYNTER, D.; JONES, B.V.; NELSON, A.M.R.; PEACOCK, R.; ROBINSON, J.; SILVERMAN, P.H. & TERRY, R.J. Symposium in husk - (4) Recent experiences with vaccination. *Vet. Rec.*, London, 72(48): 1078-86, Nov. 1960.
- POYNTER, D.; PEACOCK, R. & MENEAR, H.C. The prevention and treatment of husk. *Vet. Rec.*, London, 82: 158-60, Feb. 1970.
- TAYLOR, E.L. Parasitic bronchitis in cattle. *Vet. Rec.*, London, 63(51): 859-73, 1951.