

Pag. 97
Nº 2482

Eduardo Carlos Cortola

Estudio comparativo de las
diferentes técnicas para evaluar
la transferencia pasiva de la
inmunidad en el bovino -

1993

Pag 97
Nº 2482

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Tesis presentada para optar el titulo de Doctor en

Ciencias Veterinarias

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES TECNICAS PARA
EVALUAR LA TRANSFERENCIA PASIVA DE LA INMUNIDAD EN EL
BOVINO. SU IMPORTANCIA EN LA SANIDAD DEL NEONATO Y
SUS CONSECUENCIAS EN EL DESARROLLO

Eduardo Carlos Mortola

DIRECTOR

Dr. Juan Enrique Renner

Tesis realizada con beca doctoral del CONICET

Lugar de trabajo: Catedra de Inmunologia Veterinaria
Facultad de Cs. veterinarias U.N.L.P.

AÑO 1993

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Presidente	Ing.Luis Lima
Vicepresidente	Lic.Angel Tello
Secretario General	Abog. Claudio Contreras
Secretario de Asuntos Académicos	Med.Vet. Rogelio Bruniard
Secretario de Ciencia y Técnica	Dra. Carlota Sempe
Secretario de Extensión cultural	Lic. Pedro Garcia Cortina
Prosecretario General	Dra. Mercedes Molteni
Secretario de Asuntos Económicos	Cdr.Rubén Torre
Guardasellos	Ing. Andrés Ringuelet

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Decano	Med.Vet. Alberto Dibbern
Vicedecano	Med.vet. Eduardo Pons
Secretario de Asuntos Académicos	Med.Vet. Alicia Antonini
Secretario de Extencion Universitaria	Bact. Sandra Arauz
Secretario de Postgrado	Dra. M.R. Echeverrigaray
Secretario de Ciencia y Técnica	Dr. Carlos Perfumo
Secretario de Supervision Administrativa	Cr. Edgardo Silvera
Secretaria Administrativa	Leticia Stein
Directora de Biblioteca	Marta Benardi
Directora de Enseñanza	Clelia N. Giuffre

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CATEDRAS

PROFESORES A CARGO

PRIMER AÑO

Anatomía Descriptiva	Dra. Cristina Alonso
Histología y Embriología	Dr. Felix Moreno
Bioquímica	Dr. Angel Catalá
Introd. a la Biofísica	Dr. Jesús Carroza

SEGUNDO AÑO

Anatomía Comparada	Dra. Cristina Alonso
Patología General Vet.	Dr. Eduardo Gimeno
Fisiología	Dr. Eduardo Zaccardi
Microbiología	Dr. Nestor Stanchi
Genética y Biometría	Ing. Fernando Dulout

TERCER AÑO

Anatomía y Fisiología	
Patológica	Dr. Julio Idiart
Semiología y Propedeutica	Dr. Jorge Andreatta
Farmacología, Farmacot. y	
Terapeutica	Dr. Jorge Errecalde
Medicina Operatoria	Dr. Pablo Videla
Parasitología y Enf.	
Parasitarias	Dra. Lucila Venturini
Zootécnia Gral. y	
Agrostología C.A.	Dra. Liliana Lagreca

CUARTO AÑO

Zootécnia Especial	
I parte (O.S.C.)	Dr. Eduardo Marotta
Zootécnia Especial	
II parte (B.E.)	Dr. Benjamin Rodriguez
Zootécnia Especial	
III parte (A.P.)	Dra. Virginia Grillo
Economía Agraria	Dr. Gustavo De La Arena
Enfermedades infecciosas	Dr. Carlos Amasino
Patología Medica	Dr. Fortunato Iseas
Patología Quirúrgica y	
Podología	Dr. Francisco Boccia
Patología de Aves y	
Pilíferos	Dr. Néstor Menendez

QUINTO AÑO

Tecnología y Sanidad	
de los Alimentos	Dr. Jorge Lasta
Higiene Epidemiología y	
Salud Pública	Dr. Emilio Gimeno
Inmunología Veterinaria	Dr. Enrique Pennimpe
Clínica de Pequeños	
Animales	Dr. Francisco Boccia
Clínica de Grandes	
Animales	Dr. Juan Renner

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos a cada uno de los que se hayan sentido participes en la elaboración de éste trabajo y en particular :

Al Dr. Enrique F.F. Pennimpede quien me ha guiado en mi formación científica, brindandome su permanente estímulo, apoyo y colaboración.

Al personal docente de la catedra de Inmunología Veterinaria, por haberme acompañado afectuosamente.

A los Dres. Ricardo Recalde y Andrés Baldo, por su invalorable colaboracion para la obtencion de las muestras, sin cuyo aporte no hubiera sido posible la ejecucion de éste trabajo.

Al Dr. Santiago Corva por su dedicación en la confección de esta tesis y en el procesamiento estadístico de datos.

INDICE

Resumen	I
Summary	III
1.-Introducción	1
2.-Objetivos	24
3.-Materiales y métodos:	
3.1.-Animales de experimentación	25
3.2.-Diseño experimental	25
3.3.-Primer experimento:	
3.3.1.-Estudio de la sensibilidad comparativa de las diferentes técnicas para la detección de gamaglobulinas séricas.	26
3.3.2.-Determinación de las proteínas séricas.	28
3.3.3.-Tratamiento de las muestras de calostro	28
3.3.4.-Obtención de suero calostroal	29
3.3.5.-Determinación de proteínas en suero calostroal	29
3.4.-Segundo experimento	
3.4.1.-Vacuna experimental de <u>S. dublin</u> y plan de vacunación.	29
3.4.2.-Preparación de antígenos para la titulación de anticuerpos séricos.	30
3.4.3.-Muestreos de vacas y terneros	31
3.4.4.-Evaluación de la transferencia pasiva de la inmunidad (TPI) y medición de anticuerpos específicos	31
3.4.5.-Desafío de los terneros y control clínico.	32
3.5.- Evaluación estadística de los resultados	33
4.- Resultados	34

5.- Discusión39
Tablas y graficos46
6.- Bibliografía69

Resumen

El objetivo de este estudio fue en primer término, el de establecer el método más sensible para determinar mínimas concentraciones de gammaglobulinas (gg) séricas, empleando las técnicas de precipitación por el sulfato de zinc (PZn), precipitación por el sulfito de sodio (PNa) y coagulación por el glutaraldehído (CGI), con la finalidad de aplicarla en la evaluación de la transferencia pasiva de la inmunidad (TPI).

Se determinó en 30 vacas próximas al parto la concentración media de gg comparándola con la de no gestantes (10 animales), y se evaluó la TPI inespecífica a sus terneros por los métodos de electroforesis (EF) y PZn. Así también se establecieron las variaciones en la concentración de gg del calostro bovino durante su conservación por congelación y fermentación ácida natural, por la técnica de EF.

En un segundo experimento se determinó la TPI específica conferida por el calostro a los terneros, mediante la vacunación de 30 hembras gestantes con una bacterina de *Salmonella dublin*, evaluando la protección pasiva a través de la infección experimental de los terneros. La respuesta inmune (RI) mediada por anticuerpos (Ac) contra los antígenos (Ag) flagelares (H) y somáticos (O), se evaluó por la técnica de microaglutinación en placa.

Los resultados obtenidos, demostraron que la técnica de PZn es más sensible y eficaz que las otras dos técnicas empleadas.

Se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$ y $p < 0,025$) en la concentración de gg séricas entre vacas gestantes y no gestantes. En 26 terneros las diferencias en los valores de gg con las de sus madres no fueron significativas y en consecuencia la TPI adecuada. En los 4 restantes, los resultados arrojaron diferencias significativas y la TPI insuficiente; su crecimiento y desarrollo no fueron normales y presentaron cuadros infecciosos en las primeras semanas de

vida.

Los valores del calostro fresco y del conservado por fermentación presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$), tanto en las proteínas totales (PT) como en las gg, en cambio, tales diferencias no resultaron significativas para la congelación, constituyendo esta técnica una forma eficaz de conservar el calostro.

En la determinación de la transferencia pasiva de Ac contra *S. dublin* a los terneros, los resultados arrojaron diferencias significativas ($p < 0,001$) frente al lote testigo. Los terneros fueron desafiados con *S. dublin* patógena por vía oral; los procedentes de vacas inmunizadas no presentaron síntomas clínicos de enfermedad ni mortalidad, en contraposición al lote testigo que evidenció diarreas, fiebre, anorexia y decaimiento, no se observaron muertes pero eliminaron microorganismos por materia fecal durante 10 días. Los resultados sugieren el valor de inmunización de los terneros contra la salmonelosis en el momento en que son más vulnerables a la infección.

Summary

The aim the present thesis was, firstly, to establish the most sensitive technique to detect the minimal concentrations of serum gammaglobulins by means of zinc sulfate precipitation, sodium sulfite precipitation and clotting by glutaraldehyde in order to evaluate the passive transference in immunity.

The increase in the serum gammaglobulin concentration was determined in 10 non-pregnant cows; it was compared to those values corresponding to 30 cows close to parturition, and the passive transference of non-specific immunity of their calves was evaluated by electrophoresis and zinc sulfate precipitation. Also, those variations in the gammaglobulin concentration of bovine colostrum were determined during freezing and natural acid fermentation.

In the second experiment, 30 cows were immunized 60 days before parturition using a bacterina of *Salmonella dublin*; and the passive protection given to their calves through colostrum was determined by infecting them experimentally. The immune response, mediated by antibodies in cows and calves, was evaluated by means of the microagglutination technique.

The results obtained showed that the zinc sulfate precipitation technique was most sensitive and effective.

Significant differences were found ($p < 0,05$ y $p < 0,025$) in the serum gammaglobulin concentration corresponding to pregnant and non-pregnant cows. In 26 calves, the differences found in gammaglobulin values when compared with those of their mother were not significant. Consequently, the passive transference of immunity was adequate. Regarding the other 4, the results evidenced significant differences, and the passive transference of immunity was not enough. Their growth and development were not normal and they presented infections during the first weeks

of life.

Values of fresh and fermentation-kept colostrum showed significant differences ($p < 0,001$) either in total proteins or in gammaglobulins. On the other hand, such differences were not significant for freezing, being this one effective method to maintain colostrum.

When determining the passive transference of antibodies against *S. dublin* in calves, the results obtained evidenced significant differences ($p < 0,001$) when compared to the control group. Calves were challenged orally with pathogenic *S. dublin*; those coming from immunized cows showed no clinic symptoms of mortality or disease. In contrast, the control group evidenced diarrhea, fever and weakness. They did not die but microorganisms were eliminated in feces for 10 days. These results suggest the importance of calf immunization against salmonellosis when they are more susceptible to infections.

1.- Introducción:

Si consideramos enfermedad infecciosa a las complejas interacciones entre hospedador y parásito, ambos tratando de sobrevivir en un determinado ecosistema (141), es decir, el resultado de un fenómeno de asociación biológica en el que cada uno de sus integrantes pone en juego diversos factores de agresión o de reacción, condicionados por el medio, podremos comprender la importancia que para todo ser humano o animal reviste disponer del sistema inmune (SI) en aptitud de respuesta para desequilibrar a su favor el resultado de tal interacción.

El ternero recién nacido posee su SI desarrollado, aunque no lo suficientemente apto como para producir una RI de la magnitud requerida, para hacer frente, con buenas posibilidades de éxito, a la variada flora microbiana con la que contactará desde su primer día de vida extrauterina (99). Esta situación propia del período neonatal, aquel que ocupa las primeras semanas que siguen al parto, es un momento crucial para la vida de los individuos (95), caracterizado por el brusco cambio de habitat y acompañado de un proceso adaptativo acelerado que implica la adecuación del organismo a nuevas condiciones de vida, en un medio ambiente potencialmente hostil, es decir, soportar cambios cardiovasculares; ingerir, digerir y asimilar nuevos nutrientes; regular su temperatura; asumir el control hormonal de su organismo, etc. Estos cambios conllevan un gasto metabólico importante que puede afrontar y sobrellevar con éxito, pero a esta aptitud hay que respaldarla con el manejo racional de las variables que inciden en este crítico momento de la vida, entre las más relevantes, aquellas relacionadas con su situación inmunitaria (98). Con la finalidad de conocerla, interpretamos prudente y necesario su estudio, a partir de la ontogenia inmune y sus eventuales expresiones desde la vida fetal, lo que nos permitirá valorizar adecuadamente la

importancia de la TPI materna para la sobrevivencia del neonato.

Ontogenia inmune

La ontogenia del SI, siguiendo el orden cronológico de aparición de sus distintos componentes, encuentra en la detección de los folículos en el timo de su primera expresión alrededor de los 47 días de vida fetal, luego se observan: el bazo a los 65 días; los ganglios linfáticos entre los 60 y 130 días, y las placas de Peyer a los 150 días (117).

Las células inmunes se detectan tempranamente en la vida embrionaria: las células troncales linfocitarias entre los 5 y los 10 días, migrando al hígado entre los 10 y los 45 días, para luego encontrarse en sangre y alcanzar el timo desde los 42 días, distribuyéndose por la misma vía localizándose en el bazo y en la médula ósea a los 55 días. Finalmente acceden a los ganglios linfáticos a los 59 días y se establecen en el intestino cerca de los 175 días de vida intrauterina.(98) (117).

La producción de Acs específicos se inicia alrededor de los 118 días de vida fetal (40) (48). Entre los 59 y 90 días de desarrollo, es posible detectar la presencia de células productoras de inmunoglobulinas (Igs) del isotipo M, entre los 90 y los 145 días del isotipo G₁; demostrándose la presencia en sangre de ambos isotipos entre los 130 y 135 días de vida fetal respectivamente.(92) (106)

Respuesta inmune fetal:

La RI a componentes extraños al medio ambiente interno fetal depende del Inmunógeno (Img), edad gestacional y especie (108). En el feto bovino, si ella existe entre los 4 y 9 meses de gestación, es de escasa duración, y de poca intensidad, es más,

con frecuencia el SI es sobrepasado y con pequeñas dosis de I_{mg} se inducen fenómenos de tolerancia inmunitaria (95).

El feto con capacidad para montar RI lo hace tanto mediado por células (IMc) y por Acs (IMAc).

IMAc:

La RI fetal a diferentes I_{mg}, como así mismo los días de gestación en que se detectan los efectores humorales, se informan a continuación (72) (89) (90) (130):

Parvovirus bovino	130 días
Anaplasma marginale	141 días
Virus IBR inactivo	150 días
Leptospira saxkoebing	162 días
Virus PI 3	163 días
Virus diarrea bovina	200 días
Vibrio fetus	235 días
Chlamydia	243 días
Virus lengua azul	282 días \
Escherichia coli	282 días ; a término
Brucella abortus	282 días /

La inoculación de I_{mg} a fetos bovinos entre los 4 y 9 meses de gestación conduce a la biosíntesis de IgM, o sea una respuesta de tipo primario, pues las IgM son precoces y desaparecen muy rápido, por que su vida media es 4 a 5 veces más corta que la de IgG (89) (95).

La RI de tipo secundario parece inexistente en el feto, y ello está ligado a la ausencia de fenómenos de cooperación entre los linfocitos T (LT), B (LB) y macrófagos, por lo tanto, los LT colaboradores no inducen la translocación genética para la biosíntesis por parte de los LB de IgG y que en consecuencia no se expresa en esta etapa de la vida (92) (95).

IMc:

Fetos bovinos inoculados a los 130 días de gestación con parvovirus bovino presentaron elevación en el número de linfocitos en comparación con los controles a los 10 días de su aplicación, la mayoría de ellos se comportaron como LT porque formaron rosetas espontáneas frente a glóbulos rojos de carnero y por su marcada blastogénesis frente a las lectinas como concanavalina A y fitohemaglutinina (72). Igualmente demostraron ser capaces de montar respuestas de IMc ante la inoculación de *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y toxoide tetánico entre los 168 y 248 días de gestación, evaluado luego del nacimiento.(111)

En fetos de 190 a 235 días de gestación se ha revelado buena respuesta al test de linfoblastogénesis; en cambio, 15 días antes del nacimiento y en recién nacidos, fue insignificante; lo que demuestra que la IMc está comprometida en el período prenatal (57), corroborado, así mismo, por la incapacidad para rechazar injertos de piel (92).

Otra experiencia que demuestra la disminución de los fenómenos de IMc se desarrolló mediante la inoculación intrauterina a fetos bovinos de 20 a 123 días de gestación con una mezcla de *Mycobacterium bovis*, toxoide tetánico y ferritina, en adyuvante completo de Freund, estableciéndose la expresión de hipersensibilidad retardada por tests cutáneos, cuyas reacciones fueron superiores a los 21 días de vida extrauterina que las detectadas en el día del parto (112). Las características de ambos tipos de RI (IMc y IMAc) están condicionadas por la relación materno-fetal.

Relación materno-fetal:

Si bien la gestación conlleva el desarrollo en el claustro materno de un ser inmunológicamente diferente, con

características antigénicas propias y exclusivas y otras heredadas de sus progenitores, la preñez llega a término y el ternero nace normalmente (23) (70). Esta situación depende de los efectos de una serie de sustancias activas durante el período gestacional originadas en la madre y en el feto entre las que se citan: progesterona, alfafetoproteína, LT supresores, etc.; los que actúan suprimiendo la RI y evitan la expulsión del feto (23) (52) (57) (70).

Por otra parte, los efectos de los corticoides plasmáticos, cuya concentración se eleva en los 15 días que preceden al parto y de cuya inducción son responsables, producen una serie de modificaciones en el número, tipo y comportamiento celulares, responsables de la no RI en el recién nacido a estímulos inmunogénicos, de la magnitud deseable, a lo que debe sumarse la hipotermia fisiológica propia del período neonatal y la pobre presentación de Img por parte de los macrófagos, dependiente de la falta de expresión de los Ags de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (128).

La consideración de las situaciones hasta aquí analizadas condicionan la relevancia de TPI de origen materno por las vías calostrointestinal y láctea.

Transferencia de la inmunidad:

En los rumiantes y por su placentación epiteliocorial, los efectores inmunitarios maternos se transfieren por las vías calostrales y lácteas (9) (15) (140) (141), en consecuencia, el ternero recién nacido es hipo o agamaglobulinémico (33) (80) (140). Tal situación hace necesario adoptar medidas conducentes a la prevención de las enfermedades infecciosas prevalentes en las primeras semanas de vida (Tabla 1).

Tabla 1: Asociación entre edad de los terneros y prevalencia de enfermedades diarreicas.

Agente Patógeno	Edad		
	< 7 días	7 a 28 días	> 3 meses
Virus			
Coronavirus	+/-	++	+
Rotavirus	+/-	++	+/-
Protozoarios			
Coccidios	-	+	-
Crystosporidium	-	++	-
Bacterias			
E. Coli	++	+/-	-
Clostridium sp.	+	+	-
Salmonella sp.	+	++	+

Saif, L.S., 1992 (114)

Considerando al calostro como vía para transferencia de la inmunidad en el bovino, debemos tener en cuenta que la transmisión de células por su intermedio es cualitativamente importante, aunque su rol como expresión de la IMc de origen materno en la protección del ternero no es aún suficientemente conocida (95).

Calostro:

En las horas que preceden y siguen al parto hay una verdadera trasudación de proteínas séricas, en particular Igs que formarán parte del calostro (32) (136). Su importancia ha sido demostrada en la prevención de diarreas neonatales, septicemias y afecciones respiratorias de diversas etiologías (43) (62) (119), existiendo correlación entre la concentración de Igs

séricasen el ternero y la incidencia de diarreas (96) (134). Por su composición, el calostro reviste importancia desde dos puntos de vista: por un lado, en los primeros días de la vida del ternero representa el único y principal alimento, y por el otro, contiene una elevada cantidad de proteínas lácteas y plasmáticas (61).

Entre estas últimas se destacan los tres isotipos de Igs presentes en el calostro: G, M y A (Tabla 2), la mayor parte de los Ac calostrales son de origen sérico, la glándula mamaria juega un rol de filtro sanguíneo y realiza así una concentración de los mismos; llamada esta inmunidad transmamaria (60) (10) (51).

Otros Ac calostrales son sintetizados localmente en el sistema linfático mamario, al existir una estimulación antigénica adecuada; denominada esta inmunidad local (19) (20) (83) (115).

Tabla 2

Igs	%	mg/ml
G ₁	81	47,6
G ₂	5	2,9
M	7	4,2
A	7	3,9
Total	100	58,6

Butler, J.E. 1983 (16)

Inmunidad transmamaria:

La transferencia y la concentración en la mama de los Acs de origen sérico, varía según la clase de Ig. Así, la IgG₁ es seleccionada preferentemente y volcada a la secreción por un mecanismo de receptores específicos para su fragmento Fc,

ubicado sobre las membranas celulares del acino mamario (10) (47). Este isotipo representa entre 70 y el 80 % de las Igs calostrales totales (81).

La transferencia de IgG_1 del suero a la secreción mamaria depende de una regulación hormonal. La administración durante siete días de un complejo estrógeno-progesterona, a dosis próximas a las que existen en el momento del parto, produce el desarrollo de la glándula mamaria y la formación de un líquido semejante en su composición al calostro (21).

Inmunidad local:

Su origen se fundamenta en la aparición precoz de Ac específicos en la secreción mamaria, luego de la inyección de IgM en la glándula. Ellos aparecen en el suero lácteo a las 24 hs pero en la sangre luego de 5 ó 6 días de la inoculación (19) (60).

La mayor parte de la IgA es sintetizada localmente. Esta, desprovista de la pieza secretoria, es producida por los plasmocitos subepiteliales, muy abundantes en la mama antes y después del parto (12). Durante el pasaje a través del epitelio, se combina con la misma, sintetizada en ese lugar (135).

La fuente de IgG_2 e IgM , proviene esencialmente, en condiciones naturales, de la concentración de Ac séricos a nivel de la glándula (65).

En el calostro se encuentran además, otros factores de tipo inespecífico, entre ellos: lisozima, lactoferrina, complemento y el complejo lactoperoxidasa/tiocianato/agua oxigenada (109).

La concentración de Igs en el calostro alcanza el máximo en los 4 ó 5 días que preceden al parto (91), su persistencia es efímera y desciende abruptamente después del nacimiento llegando al 50% entre las 9 y 12 horas y al 85 % a las 48 horas post-parto; descenso ligado a la importancia de la absorción de las Igs por parte del ternero y al aumento de la actividad

funcional de la glándula, que al elevar su nivel de secreción, produce una dilución de las Igs (95) (Tabla 3).

Tabla 3: Composición del calostro bovino al nacimiento, 24 y 72 horas posteriores.

	Calostro		
	g/kg		
	Nacimiento	24 hs	72 hs
Caseína	56	42	36
Inmunoglobulinas	145	26	11
Grasa	65	36	39
Lactosa	21	42	46
Minerales	14	10	10

Fallon, R.J., 1992 (38)

Una vez ingerido el calostro, las Igs son absorbidas por las células epiteliales del intestino delgado, principalmente en el yeyuno (35) (73), por un proceso de pinocitosis mediante el cual atraviesan la placa estriada de las células epiteliales y se dirigen a su base para acceder a las vías linfáticas (36). La absorción de Igs es de tipo selectivo, todas se absorben, aunque el isotipo G parece hacerlo con mayor intensidad, alcanzando las tasas séricas del adulto (20 a 30 mg/ml) entre las 6 y 24 horas siguientes a la primera toma de calostro (73). Una parte de la IgG y la IgA, luego de permanecer algunas horas en la sangre, son volcadas a las secreciones respiratorias y digestivas (106), fenómeno que debe ser tomado en cuenta para la protección del neonato mediante la inmunización de la hembra gestante (30) (78) (105) (106) (107). La permeabilidad de la pared intestinal, para el pasaje de las Igs es de corta duración y decrece un 50% a las 12 horas, para ser nula a las

36 horas, como consecuencia de la renovación del epitelio intestinal del ternero en su totalidad entre las 36 y 48 horas (37). La permeabilidad intestinal depende de factores inherentes al tubo digestivo (disminución de la acidez gástrica y de la tasa de enzimas digestivas que reducen el coeficiente de destrucción de las proteínas calostrales y en particular la permeabilidad de la mucosa intestinal a las macromoléculas calostrales (15); y al calostro: fuerte poder tampón, poder inhibitorio sobre la tripsina gástrica, resistencia a la IgG₁ a la digestión enzimática (79).

La persistencia de la inmunidad calostrale en el neonato, depende de varios factores: raza y peso del ternero al nacer, lugar de nacimiento, cantidad y calidad del calostro ingerido, tiempo de toma, vida media de Igs, estrés y dilución de Acs por el crecimiento (38) (Tabla 4).

La inmunidad materna persiste aproximadamente hasta la octava semana y luego decrece lentamente para desaparecer al cuarto o quinto mes. Los Acs propios comienzan a sintetizarse aproximadamente a la segunda semana, cuando disminuyen los efectos de los factores que inmunosuprimen al neonato (95). El período de máxima susceptibilidad a las enfermedades se halla entre la séptima y novena semana de vida.

Tabla 4: Parámetros de persistencia de la inmunidad.

	IgG	IgM	IgA
Vida media (días)	21	2	4
Cese de absorción intestinal (horas)	27	22	16
Síntesis propia (días post-nacimiento)	14	7	7

Fallon, R.J. 1992 (38)

Falla de la transferencia de la inmunidad:

La falla de la TPI por la vía calostrointestinal es la inmunodeficiencia más común de los animales domésticos (106) y se produce cuando el ternero no obtiene niveles séricos importantes de Igs (103), lo que disminuye sus probabilidades de vida al quedar expuesto a variadas patologías neonatales, contra las cuales no han recibido defensa a través del calostro (9) (15) (66) (69) (80). Como causas responsables de esta alteración se citan: no ingestión de calostro en el momento adecuado; por tradiciones, que por otra parte tienden a desaparecer, las que evitan el contacto entre la madre y el ternero hasta 12 horas después del parto, donde la ingestión de calostro es tardía y la capacidad de absorción está disminuída (91); falta de Igs en el calostro, causa común y producida luego de una lactación prolongada, de un nacimiento prematuro, o cuando el manejo antes del parto provoca la eliminación de Acs acumulados en la glándula, como así también afecciones de la vaca de diversa localización (mastitis, metritis, etc.), que pueden igualmente disminuir el tenor de Igs (29).

El calostro puede no contemplar en su contenido de Igs a la flora microbiana ambiental, ya que cada lugar puede ser considerado como un ecosistema, donde impera un equilibrio microbiológico, siendo suficiente la introducción de un nuevo animal portador de microorganismos antigénicamente diferentes, para inducir la ruptura del citado equilibrio (49); absorción insuficiente de Igs, sea por bloqueo de las células epiteliales del intestino delgado, al saturarse por absorber accidentalmente proteínas del líquido amniótico (41), o por la ausencia de un factor de absorción necesario para el pasaje del calostro a través de las células intestinales y que estaría ligado a la presencia de una fracción protéica no coagulable por el calor (5). También se cita el rol de la histamina, de

elevada concentración en el calostro, como factor de absorción (45) (144). Finalmente se asigna participación en el fenómeno a la tiroxina, el cortisol y la temperatura ambiente.

La tiroxinemia y la temperatura ambiente al nacimiento presentarían una correlación negativa con la duración de los períodos de absorción de IgG₁ e IgM en el intestino del neonato (17). Cabe acotar que las situaciones estresantes deprimen la absorción de Igs calostrales no habiéndose determinado categóricamente el rol de los corticoides en este hecho (126). A pesar de la ingestión correcta de calostro, el 90% de los terneros neonatos que padecen enfermedades infecciosas en los aparatos respiratorio y digestivo, son deficientes en Igs, debido a su insuficiente absorción (28) (41) (55).

Dichas patologías constituyen las principales causas de mortalidad o, en el mejor de los casos, de atraso en su crecimiento y desarrollo; todo lo cual se traduce en importantes pérdidas económicas para la explotación pecuaria. Esta situación, no ha mejorado en nuestro país a pesar del uso de quimioterápicos y antibióticos (elevando los costos de producción, dificultando su comercialización internacional por la presencia de residuos en las carnes, etc.).

De lo expuesto, surge la necesidad de implementar los medios conducentes a optimizar las condiciones sanitarias de los terneros y disminuir su mortalidad, la cual, en función del período de vida involucrado, lo podemos agrupar en : (120)

- Mortalidad perinatal: se produce en las primeras 24 hs de vida y considerándose que el 85% de los casos se deben a la anoxia por partos demorados, con más de 270 días de gestación.

- Mortalidad neonatal: entre las 24 y 48 hs de vida. En éste período, reviste gran importancia la TPI y el nivel de Acs en el ternero luego de la toma de calostro en tiempo, cantidad y calidad adecuadas, de los que depende la protección contra las enfermedades infecciosas.

- Mortalidad de terneros mayores (de 29 a 182 días de vida):

En los que las pérdidas son producidas por enfermedades respiratorias (IBR, pasteurelrosis) y digestivas (salmonelosis, colibacilosis enteropatógenas, parasitosis).

En el segundo experimento, tratamos la TPI específica, inducida por la *Salmonella dublin*, mediante la inmunización de vacas gestantes, y la protección conferida a su descendencia, que no ha recibido hasta la presente adecuada consideración.

A tal fin, creemos conveniente analizar cada uno de los componentes de la asociación biológica que generamos en la vacunación, pero desde la perspectiva de la infección natural, ya que ello nos permitirá, si estamos convencidos que la mejor vacuna es aquella que se desarrolla a partir del conocimiento de la patogenia de la enfermedad que se desea prevenir, traducir el acto mecánico de la vacunación en inmunización efectiva (99) (100) (102).

Género *Salmonella*

a.- Aspectos microbiológicos

El género *Salmonella* incluye gran variedad de especies, patógenas para el hombre y los animales que sólo pueden identificarse por métodos serológicos (22) (33). Se trata de bacilos Gram negativos pequeños (2 a 3 μ de largo por 0,4 a 0,6 μ de ancho), no forman esporas, son móviles a flagelos peritricos, aerobios o anaerobios facultativos, capsulados y con fimbrias (31) (7). Presentan Ag superficiales conocidos como O (somáticos), H (flagelares) y Vi (capsulares), presentes en forma marcada en fase S (31) (141). Los tres primeros permiten la clasificación bacterina según el esquema de Kauffman y White (31).

Para su aislamiento e identificación, se puede utilizar el esquema siguiente: (22)

Muestra (tejidos)



Agar sangre (37° C 24-48 hs)



Colonias sospechosas a TSI

Glucosa con prod. gas +
Lactosa -
H₂S +
Mótilidad +



Pruebas bioquímicas

Ureasa -
Citrato +
Lisina decarboxi. +
Ornitina decarboxi +
Manitol +
Sorbitol +
Indol -



Exámen serológico



Muestra (materia fecal o intestino)



Colonias sospechosas a TSI



Pruebas bioquímicas



Exámen serológico

b.- Patogenia

La patogénesis de las infecciones bacterianas digestivas en función del grado de invasión de las mucosas, se divide en cinco grupos (71)

- 1.- Adherencia a las mucosas y producción de enterotoxinas: pertenecen a éste grupo *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica. Afectan la porción proximal del intestino delgado, produciendo exotoxinas; no destruyen el ribete en cepillo de la mucosa y no la invaden ni causan lesiones histopatológicas reconocibles.
- 2.- Adherencia a las mucosas y disolución del ribete en cepillo: característica de *Escherichia coli* enteropatógena. Se adhiere a la mucosa del intestino delgado y grueso y causa lesiones histopatológicas patognomónicas (evidentes a la microscopía electrónica) que se expresa por la disolución del ribete en cepillo de los enterocitos en el lugar de ataque.
- 3.- Invasión de la mucosa con proliferación en las células epiteliales: responden a este patrón, especies de *Shigella sp* que invaden los enterocitos del intestino delgado en su porción distal y el colon; se multiplican en su interior y causan disfunción y muerte celular. Generalmente quedan en el nivel citado, sin embargo, algunas bacterias pueden alcanzar la lámina propia y raramente los ganglios linfáticos mesentéricos.
- 4.- Translocación de la mucosa con proliferación bacteriana en la lámina propia y ganglios mesentéricos: propia del grupo *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella sp.*: invade los enterocitos y atraviesa las células en vesículas pinocíticas alcanzando la lámina propia donde producen efectos quimiotácticos sobre los polimorfonucleares neutrófilos. Desde allí acceden a los ganglios linfáticos mesentéricos, desde donde pueden originar bacteriemia.
- 5.- Translocación de la mucosa seguida de infección generalizada: integrado por *Salmonella typhi* y *paratyphi A* y *B*.

Atraviesan la mucosa como en el modelo anterior, pero en la lámina propia atraen macrófagos que los vehiculizan a los ganglios linfáticos mesentéricos, a los que abandonan por las vías linfáticas llegando al conducto torácico y la corriente sanguínea, de donde son removidos por el sistema reticulendotelial del bazo, médula e hígado. En los hospedadores no inmunes, *Salmonella sp* permanece viable en esas células y luego de un período de incubación de 10 a 14 días, dan lugar al síndrome clínico conocido como fiebre entérica (tifoidea o paratifoidea) que se acompaña de bacteriemia.

La *Salmonella dublin* es una de las cepas aisladas con mayor frecuencia en terneros de nuestro medio (4) (86) (131). Su importancia, reside en que además de los efectos directos que producen sobre la sanidad de los terneros y los aspectos productivos, en sus características epidemiológicas que determinan la progresiva diseminación del agente etiológico en las diferentes categorías bovinas que componen el sistema productivo. Este aspecto adquiere especial relevancia en las explotaciones intensivas (4).

La salmonelosis de los terneros comienza con la infección de los mismos en las primeras 72 hs de vida y alcanza su pico de mortalidad entre la tercera y la cuarta semana de vida. El cuadro clínico es esencialmente diarreico (63).

La puerta de entrada es oral, desde donde acceden al intestino y se adhieren a las microvellosidades de las mucosas, contando para ello con dos factores:

- Pili de tipo 1 (fimbrias): estructuras filamentosas de la superficie bacteriana, involucradas en la adherencia a las células entéricas, aunque su rol en la patogenicidad de las *Salmonellas sp* parece limitado (42).

- MRHA (hemaglutinina manosa resistente): sustancia secretada por algunas especies de *Salmonella sp* que tiene la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos. Este factor es de fundamental importancia en *S. typhimurium* y *S. enteritidis* pero no en *S.*

dublin.

Luego de su adherencia, las bacterias ingresan a las células por un proceso de endocitosis (más exactamente por endocitosis mediada por receptores), donde la naturaleza de los componentes que lo inducen no se conocen aún (139). Ubicada en la vesícula endocítica, migra hacia la lámina propia donde es liberada, produciendo un fenómeno inflamatorio localizado, desde ahí, se generan influjos quimiotácticos sobre macrófagos que endocitan la *Salmonella* y permiten su proliferación intracelular. En consecuencia la virulencia de las mismas, reside en su habilidad para sobrevivir en el interior de las células, donde permanecen protegidas de los Acs (11).

c.- Factores de patogenicidad

Ente los factores que condicionan el poder patógeno de *Salmonellas sp* encontramos:

-Toxinas:

a.- Enterotoxinas: producen diarreas profusas al afectar la adenilciclase de las membranas celulares entéricas elevando el AMP_c . El movimiento de electrolitos en la célula a través de la membrana citoplásmica depende de la bomba de sodio y está controlado por el AMP_c ; su incremento produce una disminución de la entrada de electrolitos a la célula y por lo tanto de la absorción de agua. En el intestino normal, todo este proceso es regulado de manera que la absorción supera a la secreción. Sin embargo, las enterotoxinas originan niveles elevados de AMP_c en las células epiteliales, lo que se traduce en una mayor secreción intestinal por alteración de los mecanismos normales de control (27).

b.- Citotoxinas: se trata de un componente no lipopolisacárido (LPS) identificado sobre la membrana celular de *Salmonellas sp*; inhibe la síntesis proteica y tiene gran actividad citotóxica, es parcialmente destruido por el calor. Su rol es la

patogenicidad no está totalmente definido (42).

c.- Endotoxinas: el LPS es un componente determinante de la patogenicidad en *Salmonella*, está compuesto por tres partes: el lipido A, un potente tóxico de gran actividad, donde la mayor parte de estos efectos es debido a la interacción de la endotoxina con macrófagos y linfocitos, provocando su activación y resultando la liberación de factores con efectos biológicos como fiebre, leucocitosis o hipotensión (con peligro de shock); el centro o nucleo y la cadena O de oligosacaridos, la cual está adherida a la estructura central y envuelta por el lípido A (42).

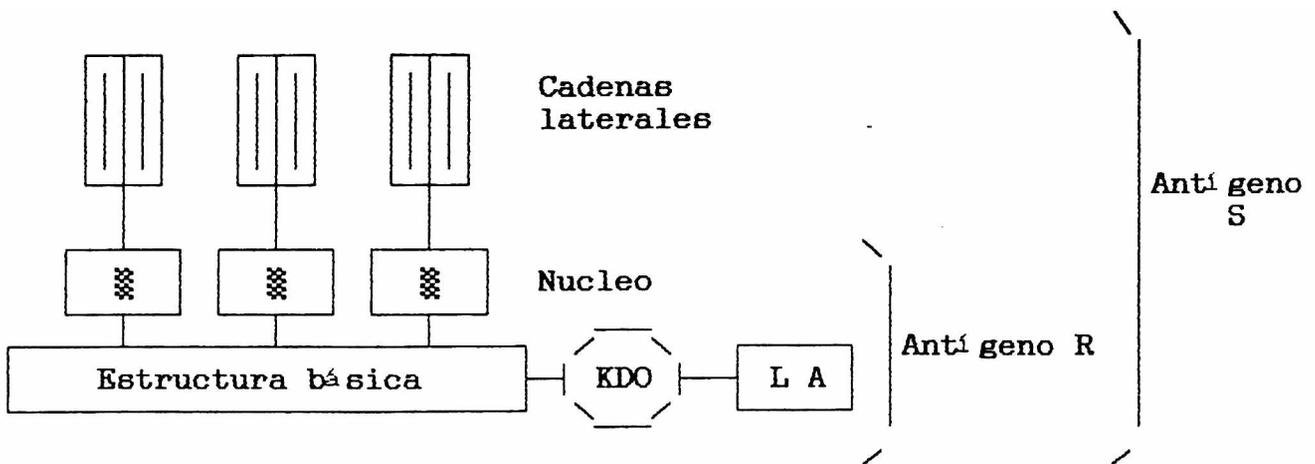


Figura 1:

Estructura básica de un LPS de la pared celular.

KDO: ácido cetodesoxioctónico. L A: Lípido A. Tizard, 1981.

(128)

-LPS: está involucrado en la adherencia e invasión de la *Salmonella* células epiteliales. También contribuye a la sobrevivencia intracelular de la bacteria en el macrófago. Otro rol que se le atribuye, es la activación del sistema del Complemento por la vía alternativa. La patogenicidad de la *Salmonella sp* está inversamente relacionada con la susceptibilidad a la fagocitosis y a su habilidad para la activación del sistema del Complemento (42) (116).

-Flagelos: los flagelos de la *Salmonella sp* además de la

motilidad, contribuyen a su patogenicidad. Algunos autores (42), demuestran que el flagelos no se requieren para la colonización del tracto gastrointestinal, pero si son necesarios para la sobrevivida y desarrollo en el bazo e hígado, contribuyen con la resistencia a la muerte por parte de los macrófagos y participan en su multiplicación en ellos (137).

-Sideróforos: son sustancias secretadas por la bacteria, con capacidad para tomar hierro de las proteínas que lo portan (lactoferrina, transferrina) y llevarlo al interior del soma. Hay dos tipos de sideróforos, enterochelina (enterobactina) y aerobactina, la *Salmonella sp* presenta el sistema enterochelina (42) (6).

- Plásmidos: son esenciales en la patogenia de muchas especies de *Salmonellas*. En cepas de *S. typhimurium*, el plásmido 60 Md es importante, en la invasión celular, pero no en la interacción inicial con la mucosa. Otro posible mecanismo de inducción de patogenicidad del plásmido, incluye la colonización de las placas de Peyer, la invasión de los ganglios linfáticos mesentéricos y bazo, resistencia a las fagocitosis y muerte en las células del sistema retículo-endotelial (42).

Inmunidad e inmunización

Tres son las ramas del sistema inmune involucrado en la protección de los individuos: secretoria o de las mucosas, mediada por Ac y por células (26).

La inmunidad secretoria, está representada primariamente, por la Ig A secretoria, presente en las secreciones de las superficies mucosas. Su rol se efectiviza por intermedio de varios mecanismos: bloqueo de la adherencia y colonización de las superficies mucosas (138);, citotoxicidad celular anticuerpo dependiente (64), actividad antitóxica (77) y

neutralización viral (88). El sistema inmune de las mucosas tiene una importante participación frente a los agentes patógenos que penetran al organismo luego de colonizar las mucosas.

La IMAc expresada fundamentalmente, por las IgG y M que facilitan la fagocitosis y la citotoxicidad complemento dependiente, ambas conducen a la muerte de los microorganismos sensibles, a la actividad antitóxica y a la neutralización viral. Precisamente en el bovino, la IgG₁ es la principal Ig en el calostro, y al poder inducir su producción mediante vacunas aplicadas a la vaca gestante (por ejemplo contra *Salmonella sp*), éste se convertirá en el vehículo más adecuado para transferir inmunidad específica al ternero luego de su absorción a nivel intestinal.

La IMc se efectiviza mediante varias expresiones: en primer término, la respuesta de hipersensibilidad retardada, con la estimulación macrofágica por parte de los LT, para eliminar a las bacterias endocitadas; segundo, es la producción de LT citotóxicos, que eliminan a las células endoparasitadas con el agente patógeno y por último por la producción de células naturales asesinas (26).

La IMc, es importante en infecciones producidas por bacterias, parásitos y virus de vida intracelular.

La inmunización por vía parenteral con bacterias vivas atenuadas o modificadas en su poder patógeno, poseen ciertas ventajas: capacidad de no alterar sus Img esenciales, poder cubrir variaciones antigénicas, no requerir adyuvantes, rápida RI mediada por Ac y/o células, inducir protección con una sola dosis. Sus inconvenientes radican en la posible patogenicidad residual y/o potencial reversión al poder patógeno original, presencia eventual de virus adventicios, imposibilidad de empleo en hembras preñadas, incremento en la inmunosupresión de animales estresados y posibilidad de diseminación por parte de animales vacunados (97).

En las vacunas a bacterias muertas (bacterinas) el substrato ha perdido la capacidad de multiplicarse , pero conserva su poder inmunogénico; por lo tanto una buena vacuna inactivada debe contener Img de superficie debidamente concentrados, purificados y libres de sustancias adventicias que pueden traer asociados efectos colaterales adversos (100) (102).

Entre sus ventajas podemos enumerar la posibilidad de elaborarlas a partir de cepas muy patógenas; carecer de patogenicidad residual, ser seguras y sin riesgo de diseminación y pueden aplicarse a hembras preñadas (97).

Los inconvenientes que presentan, son su lenta RI, generalmente mediada por Ac séricos y escasa inducción de inmunidad a nivel de mucosas, protección de corta duración, por lo que deben aplicarse varias dosis, y requieren de adyuvantes para aumentar la RI (97).

El empleo de adyuvantes en la formulación de las vacunas, tiene la finalidad de incrementar inespecíficamente al RI a Img específicos, ya sea prolongando la eficacia de la inmunización y/o evitando la repetición de inoculaciones, reduciendo la dosis de Img y disminuyendo los efectos colaterales y el costo (50).

Los adyuvantes poseen diferentes mecanismos de acción:

a) Efecto "depot" (depósito) cuyo rol es el secuestro del Img, mateniéndolo en el sitio de inoculación liberándolo lentamente, fenómeno conocido como goteo inmunogénico. Este efecto genera también una respuesta inflamatoria aumentando la afluencia de células inmunocompetentes.

b) Presentación del Img a las células inmunocompetentes, que conllevan a la amplificación de los mecanismos de interacción celular relacionados con la RI.

c) Incremento en la producción de mediadores celulares: se producen por la expansión de los LT colaboradores inducidos por la alteración de los mecanismos reguladores de la RI como consecuencia del contacto del adyuvante con las células

presentadoras.

En la fabricación de vacunas se agregan diferentes adyuvantes de acuerdo a la finalidad que se persigue.

En el segundo experimento de esta tesis, nosotros empleamos el hidróxido de aluminio en la vacuna de *Salmonella dublin*. Su efecto radica en la adsorción del I_{mg} a la sal de aluminio. El hidróxido lo hace más eficazmente que los fosfatos y actúa liberando lentamente el I_{mg}, prolongando su interacción con las células presentadoras. La producción de Ig se incrementa por el goteo inmunogénico, lo que origina sucesivas respuestas secundarias. Inducen principalmente IMAc y escasa IMc, sus mejores efectos se ejercen sobre la RI primaria (50).

En la inmunización por vía parenteral, la característica más importante es la producción de Ac circulantes, eficaz en enfermedades en las que el agente etiológico o sus productos se vehiculizan por plasma u otros líquidos orgánicos, pero poseen escaso poder para inducir RI a nivel de mucosas (97).

En las enfermedades infecciosas en las que el período de incubación es superior a los 3 días, como es el caso de la salmonelosis bovina, la inducción de memoria es suficiente para estimular una inmunización duradera; la misma persiste gracias a la prolongada vida media de los LT y LB de memoria, sin necesidad de refuerzos continuos. Así con el uso de vacunas inactivadas parenterales inductoras de IMAc, se dispondrá de Ac opsonizantes que facilitan la endocitosis, Ac neutralizantes de virus y toxinas, Ac líticos por activación del sistema del Complemento y Ac inmovilizantes de bacterias. En general, otorgan buena memoria inmune, que se traducirá ante un nuevo contacto en una respuesta inmune de tipo secundaria o de memoria (143).

Los efectos de la vacunación de las madres para proteger a sus terneros contra las enfermedades neonatales prevalentes en las poblaciones son significativos (78).

Numerosos estudios (14), demuestran que la vacunación de las vacas preñadas, 6 y 3 semanas antes del parto, con vacunas inactivadas con adyuvante contra *Escherichia coli*, *rotavirus* y *coronavirus*, resulta en el incremento del título de Acs en el calostro, contra esos agentes patógenos y que son transferidos pasivamente al ternero durante la toma, disminuyendo notablemente la incidencia de diarreas (78).

El período en que el ternero está protegido por los Acs calostrales, se halla dentro de las primeras 3 ó 4 semanas de vida; la observación clínica, no revela la ocurrencia de diarreas después de ese tiempo, cuando ya comienza a desarrollarse la inmunidad activa (78).

Los títulos de Acs neutralizantes contra rotavirus en suero calostroal de vacas vacunadas, determinan una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) con los de vacas no vacunadas (78).

El uso de vacunas inactivadas contra rotavirus con adyuvantes oleosos en vacas preñadas, demuestra ser antigénicamente eficiente y es preferible a la aplicación de vacunas a virus vivo, las cuales por problemas de contaminación con otros virus, representa un problema potencial (85).

2.- Objetivos:

El objetivo general del presente trabajo, fue evaluar mediante los métodos y técnicas más convenientes, la concentración de Igs séricas del ternero luego de haber ingerido el calostro, correlacionando su concentración con una adecuada TPI, para permitirle al neonato una mayor sobrevida y un mejor desarrollo.

Para el logro del mismo se procedió a:

- Estudiar la sensibilidad comparativa de los diferentes técnicas para detectar Igs séricas.
- Determinar la concentración de proteínas séricas en vacas gestantes en el parto.
- Determinar la TPI inespecífica en los terneros.
- Determinar las variaciones en la concentración de gg en el calostro durante su conservación.
- Evaluar la TPI específica en los terneros consecuente de vacunación con *Salmonella dublin* a vacas gestantes.

3.- Materiales y métodos:

3.1.- Animales de experimentación:

Se emplearon durante 3 años, 10 vacas no gestantes, 30 vacas gestantes y sus respectivos terneros de raza Holando Argentino, pertenecientes al tambo de Santa Catalina, propiedad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Todos los bovinos, con edad superior a los 3 años y en producción lechera en su ambiente habitual.

3.2.- Diseño experimental:

En el primer experimento y en una primera etapa, se pusieron a punto las técnicas de PZn, PNa y CGI, con la finalidad de determinar la sensibilidad comparativa de cada una para la detección de *gg séricas* en las muestras de suero de las vacas no gestantes.

En una segunda etapa, se determinó la concentración de *gg sérica* en vacas gestantes antes del parto, para establecer diferencias con el suero de vacas no gestantes, tomadas como patrón de referencia.

Posteriormente, y para establecer la transferencia pasiva inespecífica, se evaluó en los sueros de las vacas próximas al parto, y en sus respectivos neonatos la concentración de *gg séricas*, correlacionando su importancia con la sanidad del ternero. Simultáneamente, se obtuvo calostro de las vacas al momento del parto, y se estudió las variaciones en la concentración de *gg*, durante su conservación por congelación y fermentación ácida natural.

En el segundo experimento, se determinó la transferencia pasiva específica, posterior a la aplicación de una vacuna experimental inactiva de *Salmonella dublin* a vacas en diferentes períodos de

gestación, titulando el nivel de Ac en los sueros de vacas y terneros como así también en los sueros calostrales.

Se evaluó la eficiencia de la inmunización, mediante el desafío experimental con una cepa patógena de *S. dublin* a los terneros presuntamente protegidos.

3.3.- Primer experimento:

3.3.1.- Estudio de la sensibilidad comparativa de las diferentes técnicas para la detección de *gg* séricas.

Muestras de suero procedentes de las vacas no gestantes se diluyeron en serie hasta 1:32 en PBS y se le practicaron las siguientes técnicas:

- Precipitación por sulfato de zinc (76)

Se preparó una solución con 208 mg de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$ en 1.000 ml de agua destilada. Se colocó a ebullición durante 15' para desalojar el CO_2 y se envasó en recipiente hermético. Para su desarrollo se colocó en un tubo tipo hemólisis 6 ml de la solución, agregándose 0,1 ml de suero. Se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante 60'. Se leyó a ojo desnudo, por turbidez u opacidad y por espectrofotómetro a 498 nm, los resultados se expresaron en unidades de sulfato de zinc (U SO_4Zn). Estas unidades se fijaron por medio de un estándar de sulfato de bario, preparado con 3 ml de una solución de Cl_2Ba al 1,15% que se llevó a 100 ml con una solución de ácido sulfúrico 0,2N.

Según Mc Ewan (76), la lectura por espectrofotómetro de este estándar, equivale a 20 U SO_4Zn .

Interpretación de la técnica de PZn en sueros neonatales

U SO ₄ Zn	Grado de absorción intestinal	TPI
0-3	Mínimo	Falla total
4-7	Moderado	Falla parcial
7-10	Bueno	Adecuada
> 10	Muy bueno	Muy buena

- Precipitación por el sulfito de sodio (94) (124)

Se utilizaron soluciones de SO₃Na₂ al 14; 16 y 18% en agua destilada. Se colocó en cada uno de los tres tubos, tipo hemólisis, 1,9 ml de cada solución y se les agregó 0,1 ml de suero, se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante 60'.

Se leyó a ojo desnudo considerándose como positivo desde una ligera opacidad a un precipitado leve o marcado. La interpretación de los resultados se realizó según el esquema adjunto:

Concentración de GG mg/ml	Sol . de SO ₃ Na ₂		
	14%	16%	18%
menos de 5	--	--	X
de 5 a 15	--	X	X
más de 15	X	X	X

- Coagulación por el glutaraldehído (127)

Se utilizó una solución de glutaraldehído al 10% en agua destilada. En un tubo tipo hemólisis se colocaron 0,5 ml de

suero y se le agregó 0,05 ml de la solución y se agitó suavemente. La reacción se observó entre los 5 y 10' y luego cada 10' hasta los 60'. Se consideró positiva cuando el coágulo es firme y adherente (TPI adecuada); fue incompleta si se formaba un gel semisólido (Falla parcial de la TPI) y negativa cuando no se observaba ninguna de las reacciones citadas (Falla total de la TPI).

3.3.2. Determinación de proteínas séricas

La concentración de PT expresada en g %, de las muestras de suero de las vacas no gestantes, vacas gestantes y terneros se determinó por el método de Biuret, por EF (24) (53) y por densitografía se separaron y cuantificaron cada una de las diferentes fracciones protéicas.

La concentración de gg séricas fue determinada por las técnicas de EF y PZn.

3.3.3.- Tratamiento de las muestras de calostro

Las muestras de calostro fueran extraídas dentro de las 72 hs que circundan al parto, por ordeño manual, formándose un pool de los 4 cuartos, el que se conservó congelado a -15°C hasta su procesamiento. Debido a que la concentración de gg calostrales desciende abruptamente luego del primer ordeño, es indispensable su extracción en la proximidad del parto. Cada una de las muestras de calostro fresco, fue dividido en alícuotas de aproximadamente 40 ml para su conservación en la siguiente forma: por congelación a -15°C durante 6 meses (Tratamiento I: T I), por fermentación ácida natural por 45 días, una refrigerada a 5°C (Tratamiento II:T II) y la otra a 15°C (Tratamiento III:T III).

Los T II y T III permiten la acción de *Lactobacillus acidophylus*, bacteria presente normalmente en leche y calostro.

En este último se produce la fermentación ácida, que favorece y acelera el desarrollo de las propias bacterias. A los cinco días de conservación el pH se estabilizó (4-4,5), impidiendo la proliferación de microorganismos patógenos para el ternero, conservándose en buen estado en forma natural y a temperatura ambiente.

Una alícuota del calostro fresco se destinó para realizar determinaciones que obraron como patrón de referencia. Todas las muestras se mantuvieron en envases de políester cerrados pero sin vacío.

3.3.4.- Obtención de suero calostrál (84) (118)

Los sueros calostrales se obtuvieron mediante la coagulación de la caseína con una solución de renina al 10% y su precipitación por centrifugación, quedando en la fase acuosa las gg. Estos sueros se conservaron congelados a -15°C hasta su procesamiento.

3.3.5.- Determinación de proteínas en suero calostrál

La concentración de PT expresada en g %, se realizó por el método de Biuret. Se utilizaron las técnicas de EF y densitografía para separar las diferentes fracciones protéicas y cuantificar las gg (24)(53).

3.4.- Segundo experimento

3.4.1.- Vacuna experimental de *S. dublin* y plan de vacunación

La cepa de *S. dublin* con la que se elaboró la vacuna, fue provista por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Luego de los controles de viabilidad y pureza y de su tipificación, se cultivó en caldo tripticasa soja, incubándose a

37°C durante 18 hs, para exaltar su movilidad. Con 4 ml de la suspensión de cultivo, se sembraron cada una de las botellas con agar tripticasa soja empleados, que incubaron a 37°C durante 24 hs. Luego de controlar su pureza se cosecharon con PBS y se filtraron por gasa y algodón, obteniéndose la suspensión madre. Luego se inactivó con formol al 0,5%, manteniéndose a 37°C durante 72 hs; se realizaron los controles de inactivación por siembra de la suspensión madre en caldo tioglicolato y agar tripticasa soja, incubándose a 37°C durante 96 hs.

La suspensión madre se llevó a una concentración final de 2×10^9 salmonellas por ml con PBS determinada por método nefelométrico. Se utilizó como adyuvante hidróxido de aluminio (93).

La vacuna se inoculó en los animales preñados por vía subcutánea, detrás de la escápula, en una dosis total de 5 ml. Siguiendo 2 esquemas: 10 animales a los 60 y 30 días antes del parto (lote experimental 1 - LE1) y 10 animales a los 30 y 15 días antes del parto (lote experimental 2 - LE2). Se dispuso de un lote de animales testigo de 10 animales (LT).

3.4.2.- Preparación de Ag para la titulación de Ac sèricos

Se consideraron los Ag H (flagelares) y los Ag O (somáticos). Para la preparación de los Ag H, se sembró en caldo tripticasa soja una cepa móvil de *S. dublin*, incubando durante 24 hs a 37°C.

Luego se transfirieron unas décimas de ml del cultivo a tubos con agar tripticasa soja en pico de flauta, continuándose la incubación a 37°C de 18 hs a 24 hs. El desarrollo del cultivo se recolectó con 5 ml de PBS formolado al 1,4%. Se agitó y conservó en refrigerador a 6-8°C. Se inspeccionaron a diario los controles de inactivación y se prepararon diluciones de la suspensión para que contengan 1.000 millones de gérmenes por ml, por métodos nefelométricos, conservándose finalmente en frascos

oscuros refrigerados (59) (129) (33).

Para los Ag O se procedió de igual forma, suspendiéndose el desarrollo del cultivo en PBS formolado al 0,5%. Después de agregar la mitad de volumen de alcohol absoluto a la solución anterior, se incubó a 37°C 18-24 hs, comprobándose luego la esterilidad de la suspensión. se llevó a la concentración de 1.000 millones de gérmenes por ml, con una concentración alcohólica entre el 2,5 y el 4% (59) (129) (33).

3.4.3.- Muestreo de vacas y terneros

Las vacas se sangraron 60; 30 y 10 días preparto y a los 30 y 45 días postparto, y los terneros en las primeras 96 hs de nacidos y luego a los 15; 30 y 45 días de vida.

Las muestras de calostro se obtuvieron en el momento del parto en cantidad de 150 ml aproximadamente por animal y se procesaron para obtener los sueros.

En envases estériles, se recogieron muestras de materia fecal de los terneros que integraron el lote de desafío, diariamente y durante 10 días. La presencia y concentración de *S. dublin* se determinó por cultivo. Se realizaron diluciones en serie de la materia fecal en agua peptonada y se sembró 0,1 ml en agar SS y Verde Brillante, para identificar y cuantificar las colonias de *S. dublin* que luego fueron tipificadas por pruebas bioquímicas y confirmadas por serología en el Instituto Carlos G. Malbran.

3.4.4.- Evaluación de la TPI y Ac específicos.

Para establecer la TPI en los terneros, se empleó la técnica de PZn, aplicado en el suero materno y filial simultáneamente.

La titulación de Ac específicos contra Ag H y Ag O en todas las muestras de sueros sanguíneos y calostrales, se realizó por la técnica de microaglutinación en placa, para la cual se

utilizaron 8 pocillos para cada determinación. En el pocillo N° 1 se colocaron 90 μ l de PBS y en los 7 restantes 50 μ l, luego se agregaron en el primero 10 μ l de suero problema y con micropipeta de 50 μ l se realizaron diluciones seriadas, desechando los últimos 50 μ l. Seguidamente se colocó en cada pocillo 50 μ l del Ag lográndose las siguientes diluciones: 1/20; 1/40; 1/80; 1/160; 1/320; 1/640; 1/1280 y 1/2560 y se incubó a 37°C durante 2 horas.

La lectura se realizó verificando el último pocillo en el que aparece un entramado o el primero que presenta un botón neto en el fondo.

Como testigo se empleó un suero control positivo producido por hiperinmunización de 2 conejos con una bacterina de *Salmonella dublin* (realizada según la técnica expresada en el punto 3.4.1), en 4 dosis aplicadas con intervalos de 15 días, realizándose sangrías periódicas, hasta hallar un título de Ac H de 1/320 y 0 de 1/40.

3.4.5.- Desafío de los terneros y control clínico

Tres terneros provenientes de LE1 y LE2 y 3 del LT, fueron inoculados en la mañana del quinto día de vida con aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. dublin* como dosis total, establecida por el patrón internacional de opacidad y corroborada por conteo viable. El inóculo fue una dilución de un cultivo de 18hs a 37°C en caldo tripticasa soja y suspendido en 20 ml de una solución antiácida de 5 g de bicarbonato de sodio, 5 g de carbonato de magnesio en 100 ml de agua destilada y administrado en la boca con jeringa (63).

Los terneros fueron examinados clínicamente durante 10 días luego del desafío, verificando la aparición de signos de salmonelosis (pirexia, diarrea, anorexia, abatimiento, etc.). Se controló bacteriológicamente la excreción de salmonellas por materia fecal.

3.5.- Evaluación estadística de los resultados

Las supuestas diferencias en la concentración de gg séricas, entre las vacas gestantes y no gestantes, así como también las supuestas variaciones en el nivel de gg del calostro durante su conservación fueron sometidas al análisis mediante el test de Student.

Las supuestas diferencias de títulos de Ac séricos y calostrales contra *S. dublin*, de los lotes de vacas vacunadas y no vacunadas, de los diferentes lotes de terneros y las diferencias de estos con sus madres, fueron sometidas al análisis mediante el test de Student.

4.- Resultados

Primer experimento:

- Estudio de la sensibilidad comparativa de las diferentes técnicas para detectar *gg* séricas.

Con la puesta a punto de las técnicas empleadas se determinó la sensibilidad comparativa de cada una para la detección de valores mínimos de *gg* en los sueros puros y diluidos. Los resultados alcanzados se expresan en la Tabla I. De su análisis, establecimos que la PZn es la técnica más sensible. En tal sentido, la evaluación por espectrofotometría, expresada en sus unidades correspondientes, permitió determinar que aun en la dilución 1:32 se observaron resultados positivos. En contraposición, la prueba de precipitación por el P_{Nay} la CGI pierden sensibilidad a partir de la dilución 1:4 y 1:2, respectivamente.

- Determinación de proteínas séricas en vacas no gestantes

La concentración de PT en las vacas no gestantes y la cuantificación de sus diferentes reacciones, arrojaron los resultados que figuran en la Tabla II, y cuyos valores medios obraron como patrón de referencia para las vacas de la zona.

- Determinación de proteínas séricas en vacas gestantes en el parto

La determinación de PT séricas y de cada una de las fracciones de globulinas se expresan en la Tabla III. Se observa, para la fracción *gg* un valor promedio de $3,130 \pm 0,730$; que en su comparación con el hallado en las vacas no gestantes, con un

valor promedio de $2,466 \pm 0,615$, nos indicó una diferencia significativa ($p > 0,05$) entre ambos resultados.

En la Tabla IV se indican los resultados observados luego de la aplicación de la prueba de PZn a los sueros de las vacas no gestantes. Su interpretación ratifica lo hallado en la Tabla III, ya que la mencionada técnica arrojó un valor promedio para las *gg* séricas en vacas no gestantes de $8,250 \pm 0,991$; que en comparación con el valor promedio de $10,393 \pm 1,761$; de las gestantes, arrojó diferencias significativas ($p < 0,025$).

-Determinación de la TPI inespecífica en los terneros

Los valores de proteínas séricas de los terneros neonatos figuran en la Tabla III; de un total de 30 evaluaciones, 26 presentaron una concentración de *gg* que se encontraba dentro de los valores medios ($9,195 \pm 1,162$ para la EF y $9,195 \pm 2,712$ para la PZn), no evidenciaron manifestaciones clínicas de enfermedad y su desarrollo fue óptimo, en cambio, los 4 animales restantes, arrojaron valores inferiores a $1 \text{ g\%} \pm 0,3$ (falla total de la TPI), con evidentes cuadros de deshidratación, diarreas e infecciones respiratorias que condicionaron un crecimiento y desarrollo inferior al alcanzado por los terneros con TPI adecuada.

Dada la importancia, para el neonato, de la toma de calostro como medio para dotarlo de las defensas transferidas por su madre, hemos realizado los gráficos 1 y 2 donde se observa la confirmación de lo expuesto precedentemente por la lectura densitográfica de las corridas electroforéticas de los sueros neonatales antes y después de la ingestión de calostro. En el mismo, establecemos un marcado incremento en la fracción *gg* en el suero postcalostrado y su ausencia en el precalostrado.

- Determinación de las variaciones en la concentración de *gg* en el calostro durante su conservación

En la Tabla V se presenta la concentración de PT del calostro fresco y conservado por diferentes métodos.

Hallamos diferencias significativas entre el calostro frasco y el T I ($p < 0,005$); el T II ($p < 0,001$) y el T III ($p < 0,001$), con un porcentaje de reducción menor en el T I en comparación a los otros dos.

En la Tabla VI se presenta la concentración de gg del calostro fresco y conservado, no se observaron diferencias significativas en el T I pero si con el T II ($p > 0,001$) y el T III ($p < 0,001$). Las reducciones porcentuales en el T I (8,4), en el T II (22,1) y en el T III fueron similares a los de PT (9,6; 20,7 y 29,5 respectivamente).

En la lectura densitográfica de las corridas electroforéticas de los sueros calostrales se observaron como mínimo tres picos: el que corresponde a las gg es fácilmente identificable ya que se desplaza más lentamente y queda en la proximidad del ánodo; representa la fracción más importante (80,2% de la PT) (Gráfico 3). En el caso del T I, la reducción comparada con la del suero calostrado fresco, es mínima (71,4%) (Gráfico 4); en cambio en el T II (Gráfico 5) y el T III (Gráfico 6) el descenso fue muy superior (63,8% y 58,9% respectivamente), en el que paulatinamente adquieren forma de meseta, lo que aumenta el valor relativo de las demás proteínas correspondientes a los otros dos picos de migración más rápida en la proximidad del cátodo y que se identifican como resto de caseína y albúmina (68).

Segundo experimento:

- Evaluación de la TPI específica en los terneros, consecuencia de la vacunación contra *Salmonella dublin* a las vacas gestantes.

En las 30 vacas se encontraron niveles de *gg séricas* dentro de los valores normales (10,39 U SO_4Zn), (Tabla pag. 27). Veintinueve animales no presentaron niveles séricos significativos de Ac H y O antes de la vacunación, en el restante, se hallaron títulos relativamente altos H:1/320 y O:1/30.

Los animales de los LE I y LE II seroconvirtieron en respuesta a la inmunización con diferencias significativas con el LT ($p < 0,001$) (Gráfico 7), los que no se modificaron a lo largo de la experiencia. Los máximos niveles (H X:1/352 y O X=1/46 para el LE I y H X:1/354 y O X=1/48 para el LE II) se obtuvieron luego de la segunda dosis, se mantuvieron durante algún tiempo y declinaron paulatinamente después del parto, llegando a los 45 días postparto al valor de H X:1/288 y O X=1/38 para el LE I y H X:1/345 y O X=1/40 para el LE II. No se hallaron diferencias significativas entre los títulos del LE I y LE II (Gráfico 7 Y Tabla VII).

El título de Ac O se mantuvo siempre en niveles más bajos que el H, como se presenta en los gráficos 7 y 8; por los que se consideró a los Ac H como más representativos.

El título en suero calostroal de los animales de los LE I y LE II, no presentaron diferencias significativas entre ellos, hallando en ambos, altos niveles de Ac (H X:1/672 y O X=1/208 para el LE I y H X:1/608 y O X=1/192 para el LE II). Ambos lotes presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el LT. (Gráfico 9).

Los títulos de Ac séricos H (X:1/76) y O (X:1/20) de los terneros del LT no presentaron diferencias significativas con los hallados en el suero de sus madres, o fueron aun más bajos y se mantuvieron sin variación a lo largo de la experiencia (Gráfico 8 y Tabla VIII). Estos títulos los consideramos, presumiblemente, debidos a reacciones heteroespecíficas dependientes del lipopolisacárido de la bacteria (101).

No se hallaron diferencias significativas de títulos entre el LE I y el LE II en toda la experiencia, en ambos los niveles de Ac H (X:1/326 y 1/368 para el el LE II) presentaron diferencias significativas con el LT (X:1/76) ($p < 0,001$) (Gráfico 8 y Tabla VIII).

Los animales empleados del LE I y LE II, con TPI adecuada, procedentes de madres vacunadas no presentaron signos evidentes de salmonelosis, su alimentación y desarrollo fue normal; los títulos de Ac H y O se informan en la Tabla IX.

Dos de los terneros desafiados excretaron salmonellas por materia fecal (10^5 UFC/ml) los 2 primeros días, negativizándose al tercer día; el tercero, con igual nivel de excreción se negativizó al cuarto día.

En los terneros del LT el comportamiento fue diferente, si bien ninguno de ellos murió, 2 de ellos manifestaron diarreas acuosas durante cinco días, temperaturas superiores a los $40,5^{\circ}\text{C}$, anorexia y decaimiento. El restante, prolongó su estado diarréico por 4 días, la temperatura alcanzó $40,2^{\circ}\text{C}$ y se comprobó retraso en el crecimiento y desarrollo. Los títulos de Ac H y O al desafío fueron mucho menores que los del LE I y LE II. La excreción de *S. dublin* en 2 de los terneros fue de 10^5 UFC/ml durante los 7 días post desafío, al octavo día el recuento desciende a 10^3 UFC/ml y al décimo, sólo se aislaron escasas colonias. El tercer animal, hasta el cuarto día presentó un recuento de 10^5 UFC/ml, al séptimo día desarrollaron algunas colonias y se negativizó al décimo día.

5.- Discusión:

La técnica de PZn, resultó ser la más eficaz y sensible para dosar las gg séricas; basada en turbidimetría, donde la correlación entre la reacción y la concentración de gg es altamente representativa (76). Estos resultados concuerdan con los hallados por Pivont (104) y Lacheretz (69), quien comparó esta técnica con la inmunodifusión radial, encontrando un coeficiente de correlación de 0,97. Conceptos similares fueron expresados por White (132) (Tabla X), quien comparó diferentes técnicas, resultando la PZn como un método de bajo costo en equipamiento y drogas, sin necesidad de gran destreza manual y de resultados sensibles y rápidos.

Las diferencias significativas ($p < 0,05$ para EF y $p < 0,025$ para PZn) en la concentración de gg séricas en las vacas gestantes aproximadamente 30 días antes del parto, sobre las no gestantes, superaron el 30% en coincidencia con lo expresado por otros autores (91) (95). Este incremento lo podemos traducir como la aptitud materna necesaria para asegurar la secreción de un calostro cuyo nivel de Ac sea el adecuado para brindarle al neonato las defensas necesarias y establecer así una TPI efectiva.

Del análisis estadístico de las Tablas III y IV, que compara los valores de proteínas séricas maternas y del ternero, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de gg, lo que interpretamos como una TPI adecuada, mientras que las diferencias significativas para los valores de α , β y albúminas ($p < 0,001$; $p < 0,001$ y $p < 0,005$; respectivamente) hallados, corresponden a valores presentes en el ternero recién nacido, modificados fisiológicamente, y que alcanzaron en forma gradual la concentración de los animales adultos, tal como lo expresa en su trabajo Green y col. (53).

Caldow y col. (18) encontraron un grado de asociación muy

significativo entre la baja concentración de gg y altas tasas de morbilidad y mortalidad en terneros neonatos. Resultados similares fueron hallados por White y Andrews (133) y Fallon y Harte (39) y son expresados en las tablas XI y XIII. Davidson y col. (30) y Simensen (120) establecieron que la falla en la TPI se acompañó con alta mortalidad, sin embargo otros autores (110) encontraron para concentraciones adecuadas de gg , ciertos porcentajes de muerte perinatal.

En este sentido, los Ac calostrales, mayoritariamente IgG_1 , ayudan en la prevención de enfermedades entéricas, más por acción local en el tracto digestivo que a través de la circulación (18). La IgG_1 decrece en las secreciones intestinales del 95 al 48% entre las 2 y 4 semanas de edad (8). Sin embargo, White y Andrews (133) establecieron con sus resultados que en aquellos animales cuyos niveles de IgG_1 circulante son altos, disminuye significativamente la morbi mortalidad neonatal (Tabla XII).

En nuestro país, Odeon (87) utilizando una metodología semejante a la nuestra, no halló diferencias significativas en los niveles de gg séricas entre los terneros sanos y enfermos. Estos resultados se contraponen con nuestra experiencia y la realizada por la mayoría de los autores en este tema.

En referencia a la conservación del calostro a 5 ó 15°C durante 45 días, no serían métodos adecuados para ser utilizados en bancos de calostro, nuestros resultados (Tablas V y VI) fueron similares a los obtenidos por Maidment (75).

En la congelación, si bien existe un descenso de 8,4% en el nivel de gg , las diferencias no fueron significativas. Esta técnica representa una forma eficaz de conservación del calostro, preservando su calidad y composición con mínimas modificaciones.

Otros autores (21) (44) informan que utilizando la técnica de inmunodifusión radial, se produce un incremento de gg del 16% después de 7 días de almacenamiento a 25°C; sin embargo, no

explican claramente los motivos de ese aumento, ni describen una aparente degradación de la Igs. Estos valores, pueden deberse a fragmentos de moléculas no detectables, que podrían causar un mayor diámetro de los anillos de inmunodifusión radial. Esta técnica, al igual que la rocket inmunoelectroforesis, no miden los anticuerpos en su función antigénica (75) por lo tanto, estos resultados deben ser tomados con precaución.

La acidez calostrual producida en todo método de conservación, reduce la absorción de Igs aproximadamente en un 20% (44); el congelado y descongelado deben realizarse en forma lenta, para minimizarla.

Por lo expuesto, es importante destacar, que el pH del calostro es fundamental para la absorción a nivel intestinal. Snyder y col. (123), citan una reducción del 65% en la absorción de anticuerpos, cuando el ternero es alimentado con calostro congelado en comparación con el suministro de calostro fresco, lo que derivaría en una falla parcial en la TPI. Este alto porcentaje no se corresponde con lo observado por nosotros en experiencias previas, ya que si bien, la absorción puede ser menor cuando se recurre a bancos de calostro, nunca llega a ser de tal magnitud.

Otro aspecto a remarcar, es que la cantidad del calostro varía considerablemente entre vacas, en consecuencia, a menos que la concentración de gg sea conocida, el uso de un pool de calostro es lo indicado, para reducir el riesgo de administrar una muestra con bajos niveles de anticuerpos.

La fermentación es probablemente el método indicado cuando se requieren grandes cantidades de calostro, hasta la alimentación de los terneros con sustituto lácteo.

En la investigación del nivel de gg del calostro conservado, fue posible establecer que la congelación a -15°C , redujo al mínimo las pérdidas de gg y la acidez, lo que indica que el calostro es bien conservado y brindará la protección pasiva necesaria para conferir las defensas y evitar fallas en la TPI.

En referencia al segundo experimento , podemos considerar que el uso de la inmunización activa en los terneros neonatos es improbable, para prevenir la enfermedad y diseminación de la salmonelosis (63).

Por lo tanto, la protección pasiva de los terneros por la vacunación de sus madres durante la gestación, consiste en una alternativa a emplear para optimizar la sanidad de un rodeo. Varios intentos se han realizado a tal efecto, tratando de determinar la vacuna más conveniente o el régimen de vacunación más efectivo. Un método, es el uso de vacunas a bacterias muertas por acción del formol, producidas en el laboratorio, como la desarrollada en esta experiencia, que arrojó una clara diferencia entre el comportamiento de los terneros testigos y los del LE.

Los resultados serológicos de la primera prueba realizada en las vacas gestantes, presentaron títulos bajos, manteniéndose sin sufrir variaciones a lo largo de la experiencia en el LT, lo que indica una población sin contacto previo con el microorganismo empleado. En uno de los animales, se halló un nivel significativo de Ac (H:1/320 y O:1/80) posiblemente adquirido por enfermedad o contactos anteriores con *Salmonella dublin*, el cual no fue incluido en la experiencia.

Con la inoculación de 2 dosis de vacuna en el LE, obtuvimos una importante RI, pero no hallamos diferencias significativas en los títulos de Ac H y O entre el LE I y LE II (Tabla VII), por lo que dedujimos que no es importante el tiempo antes del parto, en que estas son administradas, sino buscar en cada caso la situación de manejo más conveniente.

Los niveles de Ac fueron máximos en la microaglutinación realizada aproximadamente 10 días antes del parto, debido en gran parte al incremento fisiológico en la concentración de γ globulinas que ocurre en este período, y que pasarán a formar parte del calostro, representando los Ac que pasivamente obtiene el ternero con la primera toma.

Como es de suponer, el descenso en el nivel de Ac post-parto, fue paulatino pero manteniéndose con títulos más altos que los del LT.

En la determinación de la TPI inespecífica de los 30 terneros empleados, sólo 2 de ellos sufrieron hipogamaglobulinemia, los cuales no fueron incluidos en el desafío para evitar resultados que confundieran el objetivo de la experiencia. Tomando en cuenta este hecho, hay factores genéticos o asociados con stress, estacionales o alguna otra condición (46), que en algunos terneros provoca deficiencias en la absorción de gg y por lo tanto, son proclives a contraer salmonelosis cuando no son vacunadas sus madres.

La utilización de terneros con una concentración de gg dentro de los valores medios normales ($X:2,96 \text{ g\%}$), nos llevó a interpretar el comportamiento del LT después del desafío, los animales manifestaron signos evidentes de salmonelosis y excretaron microorganismos por materia fecal por 10 días, pero no murieron, tal vez debido a la protección no específica conferida con la absorción de calostro en el tiempo y en la cantidad adecuada (43) (18) (133). Los títulos de Ac H y O fueron bajos, similares al de sus madres y se mantuvieron estables durante la experiencia, no atribuyéndose por lo tanto un rol en la protección.

Jones (63) no observó un marcado incremento de Ac H y O en los terneros que tomaron calostro de vacas vacunadas, pero si una probada resistencia al desafío con *Salmonella typhimurium*, a diferencia de lo comprobado por nosotros, donde el incremento de esos Ac muestra diferencias significativas ($p < 0,001$) con los terneros que provenían de vacas no vacunadas, y un grado de protección o una protección total conferida a los animales del LE que no manifestaron ninguna sintomatología de salmonelosis.

La infección provocada por el desafío con *S. dublin*, no condujo a un incremento de Ac H y O en los terneros testigos ni experimentales durante el trabajo; resultado muy similar al

obtenido por otros autores (63). Solamente se halló un mínimo descenso en 2 de los animales del lote de desafío, que podría ser debido a una parcial neutralización por los Ac específicos transferidos por el calostro.

Se demostró (113) una reducción en la excreción de *Salmonella* por materia fecal, debido a la protección pasiva de los terneros por administración de una dosis subletal de *S. typhimurium*; éste mismo efecto fue observado con *S. dublin*; característica importante en la difusión de la infección por reducir la contaminación del medio y la posibilidad de la infección humana por terneros enfermos, en plantas faenadoras.

La vacuna fue preparada con *S. dublin* muerta por formol, ya que esta bacteria es la prevalente en terneros del lugar. Podría darse una protección cruzada con otras especies como ha sido establecido en una experiencia con *S. Typhimurium* (63) y otros serotipos con los que comparte una gran cantidad de determinantes antigénicos (13). Se ha reportado (3) que terneros nacidos de vacas con una elevada infección natural con *Salmonella saintpaul* son más resistentes al desafío experimental con *Salmonella dublin* que los terneros control, lo que demostraría inmunidad cruzada entre diferentes integrantes del género.

La vacuna y la vacunación pueden ser mejoradas, pero títulos significativos de Ac H y O son transferidos con el calostro al ternero. Para algunos autores (1) (2) (3) (122) los Ac aglutinantes probablemente no estén involucrados en la protección, pero lo innegable es la resistencia a la enfermedad, conferida por la vacunación de la madre. Los mecanismos puestos en juego, no han sido específicamente estudiados, pero se incluyen efectos bactericidas o bacteriostáticos, agregación u opsonización de células y neutralización de enterotoxinas o adhesinas (63). Cada mecanismo merece un estudio detallado que escapa al objetivo de éste trabajo.

La presencia de Ac maternas podría interferir con la respuesta a una vacunación activa en los terneros (58) (142) y esto supuestamente sería una desventaja para la vacunación de las vacas gestantes, con la finalidad de proteger a los terneros hasta las 4 semanas de edad. Esta falta de respuesta, ocurre igualmente en los terneros control, este problema va más allá del presente estudio, aunque la presencia de Ac maternas, según autores (67), no interferiría con la respuesta inmune cuando se aplica la vacuna oral de *S. dublin*.

Experiencias basadas en la vacunación de las madres, realizadas recientemente, en campos de Alemania (54) e Israel (82) establecen por sus resultados, que es un método empleado para controlar los brotes de salmonelosis en los tambos, otorgándole resistencia a los terneros neonatos y limitando la infección en la crianza de animales.

TABLAS Y GRAFICOS

Tabla I: Sensibilidad comparativa de las técnicas para medir concentraciones mínimas de gg

Vacas	Diluciones	Uds. SO ₄ Zn	SO ₃ Na ₂			Glutaraldehído
			14%	16%	18%	
A	Puro	6,7	X	X	X	X
	1/2	3,9	-	X	X	X (*)
	1/4	1,9	-	-	-	-
	1/8	1,1	-	-	-	-
	1/16	0,4	-	-	-	-
	1/32	0,2	-	-	-	-
	167	Puro	9,1	X	X	X
1/2		5,2	X	X	X	X (*)
1/4		2,6	-	-	X	-
1/8		1,1	-	-	-	-
1/16		0,5	-	-	-	-
1/32		0,3	-	-	-	-
168		Puro	9,3	X	X	X
	1/2	4,5	X	X	X	X (*)
	1/4	2,5	-	-	X	-
	1/8	0,9	-	-	-	-
	1/16	0,3	-	-	-	-
	1/32	0,2	-	-	-	-
	833	Puro	7,5	X	X	X
1/2		4,0	X	X	X	X (*)
1/4		2,0	-	-	-	-
1/8		1,0	-	-	-	-
1/16		0,5	-	-	-	-
1/32		0,1	-	-	-	-
974		Puro	8,3	X	X	X
	1/2	4,9	X	X	X	X (*)
	1/4	2,7	-	-	X	-
	1/8	1,1	-	-	-	-
	1/16	0,5	-	-	-	-
	1/32	0,1	-	-	-	-
	979	Puro	8,7	X	X	X
1/2		4,5	X	X	X	X (*)
1/4		2,3	-	-	X	-
1/8		1,2	-	-	-	-
1/16		0,6	-	-	-	-
1/32		0,3	-	-	-	-

Vacas	Diluciones	Uds. SO ₄ Zn	SO ₃ Na ₂			Glutaraldehído
			14%	16%	18%	
535	Puro	9,1	X	X	X	X
	1/2	4,5	X	X	X	X (*)
	1/4	2,2	-	-	X	-
	1/8	1,0	-	-	-	-
	1/16	0,5	-	-	-	-
	1/32	0,3	-	-	-	-
	602	Puro	8,8	X	X	X
1/2		4,5	X	X	X	X (*)
1/4		2,3	-	-	X	-
1/8		1,2	-	-	-	-
1/16		0,6	-	-	-	-
1/32		0,2	-	-	-	-
733		Puro	7,2	X	X	X
	1/2	3,6	X	X	X	X (*)
	1/4	1,8	-	-	-	-
	1/8	0,9	-	-	-	-
	1/16	0,4	-	-	-	-
	1/32	0,2	-	-	-	-

(*) En la técnica del glutaraldehído la dilución 1:2 lleva más tiempo en la formación del coágulo.

Tabla II: Valores medios de proteínas séricas en vacas no gestantes.

Sueros	Proteínas totales g %	Globulinas plasmáticas g%			Albúminas
		α	β	γ	
X	7,585	0,933	1,416	2,466	2,733
\pm DS	0,494	0,398	0,581	0,625	0,784
R	6,5-8,0	0,50-1,6	0,8-2,2	1,6-3,3	2,0-4,2
n	10	10	10	10	10

Tabla III: Valores medios de proteínas séricas en vacas gestantes y terneros neonatos.

Sueros	Proteínas totales g %	Globulinas plasmáticas g%			
		α	β	γ	Albúminas
V X A \pm DS	7,543 0,587	0,526 0,304	0,548 0,264	3,130 0,730	3,335 0,691
C R A n	6,4-8,9 30	0,04-1,2 30	0,08-1,1 30	1,3-4,4 30	2,1-5,02 30
T X E \pm DS	7,878 0,786	1,020 0,467	1,293 0,365	2,960 1,162	2,583 0,742
R R N n	6,4-9,2 30	0,03-2,1 30	0,58-2,0 30	0,1-4,6 30	1,46-4,60 30

Tabla IV: Valores medios de μg séricas en vacas no gestantes, vacas gestantes y terneros medidos por la técnica de PZn.

Unidades SO_4Zn	Vacas no gestantes	Vacas gestantes	Terneros
X	8,250	10,393	9,125
\pm DS	0,991	1,761	2,712
R	6,7-9,3	7,60-14,2	1,3-12,5
n	10	30	30

Tabla V: Valores de PT en suero calostroal (g%), análisis estadístico (p) y porcentaje de reducción para cada tratamiento.

Item	Calostro fresco	Tratamientos		
		I	II	III
X	14,260	12,890	11,310	10,050
DE	2,141	2,042	1,123	1,472
Rango	9,8-17,7	9,1-16,4	7,9-14,1	6,9-12,7
n	26	26	26	26
p	-	< 0,005	< 0,001	< 0,001
%	100	90,4	79,3	70,5

Tabla VI: Valores de gg en suero calostroal ($g\%$), análisis estadístico (p) y porcentaje de reducción para cada tratamiento.

Item	Calostro fresco	Tratamientos		
		I	II	III
X	8,450	7,740	6,580	6,000
DE	1,697	1,592	1,259	1,446
Rango	4,9-11,7	4,2-10,2	3,7-9,2	3,1-8,2
n	26	26	26	26
P	-	n.s.	< 0,001	< 0,001
%	100	91,6	77,9	71,0

Tabla VII: Valores de Ac H y O en vacas durante la experiencia

Sueros	LT		LE I		LE II	
	Ac H	Ac O	Ac H	Ac O	Ac H	Ac O
pre-vacuna						
X	1/80	1/18	1/80	1/22	1/80	1/20
DS	32,65	14,75	46,18	17,51	83,34	24,94
Rango	1/40-1/160	(-)-1/40	1/40-1/160	(-)-1/40	1/40-1/320	(-)-1/80
n	10	10	10	10	10	10
10 días pre-parto						
X	1/92	1/24	1/352	1/46	1/354	1/48
DS	37,94	12,64	165,24	25,03	164,93	28,59
Rango	1/40-1/160	(-)-1/40	1/160-1/640	1/20-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80
n	10	10	10	10	10	10
30 días post-parto						
X	1/66	1/18	1/320	1/42	1/352	1/44
DS	40,05	14,75	184,75	22,01	165,24	20,65
Rango	1/20-1/160	(-)-1/40	1/160-1/640	1/20-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80
n	10	10	10	10	10	10
45 días post-parto						
X	1/66	1/32	1/288	1/38	1/352	1/20
DS	40,05	45,41	147,02	23,90	165,24	24,94
Rango	1/20-1/160	(-)-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80
n	10	10	10	10	10	10
Calostrál						
X	1/384	1/128	1/672	1/208	1/608	1/192
DS	187,80	41,31	352,16	77,28	280,19	93,90
Rango	1/160-1/640	1/80-1/160	1/320-1/1280	1/160-1/320	1/320-1/1280	1/80-1/320
n	10	10	10	10	10	10

Tabla VIII: Valores de Ac H y O en terneros durante las experiencias

Sueros	LT		LE I		LE II	
	Ac H	Ac O	Ac H	Ac O	Ac H	Ac O
96 hs post-nacimiento						
X	1/76	1/20	1/326	1/46	1/368	1/42
DS	50,59	16,32	189,51	25,03	200,26	18,37
Rango	1/20-1/160	(-)-1/40	1/160-1/640	1/20-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80
n	10	10	10	10	10	10
15 días post-nacimiento						
X	1/78	1/18	1/320	1/36	1/326	1/36
DS	48,48	17,51	184,75	20,65	176,08	18,37
Rango	1/20-1/160	(-)-1/40	1/160-1/640	(-)-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80
n	10	10	10	10	10	10
30 días post-nacimiento						
X	1/72	1/20	1/304	1/40	1/320	1/36
DS	36,75	13,33	191,50	23,09	184,75	18,43
Rango	1/40-1/160	(-)-1/40	1/160-1/640	1/20-1/80	1/160-1/640	1/20-1/40
n	10	10	10	10	10	10
45 días post-nacimiento						
X	1/76	1/22	1/288	1/40	1/304	1/38
DS	35,82	17,51	147,02	23,90	140,09	17,51
Rango	1/40-1/160	(-)-1/40	1/160-1/640	1/20-1/80	1/160-1/640	1/20-1/80
n	10	10	10	10	10	10

Tabla IX: Títulos de anticuerpos H y O en los terneros del lote testigo y del lote de desafiados

Sueros	Lote testigo			Lote desafiado		
	1	2	3	1 (LE I)	2 (LE II)	3 (LE III)
Al desafío						
Ac H	1/80	1/80	1/40	1/320	1/320	1/640
Ac O	1/20	1/20	(-)	1/40	1/40	1/80
10 días post-desafío						
Ac H	1/160	1/160	1/160	1/320	1/160	1/320
Ac O	1/40	1/20	1/40	1/40	1/40	1/40
20 días post-desafío						
Ac H	1/320	1/320	1/160	1/320	1/160	1/320
Ac O	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40	1/40
45 días post-desafío						
Ac H	1/320	1/320	1/160	1/320	1/160	1/320
Ac O	1/40	1/40	1/40	1/20	1/40	1/40

Tabla X: Comparación de diferentes técnicas para evaluar la concentración de $\beta\beta$ séricas.

Técnica	Costo de equipamiento	Costo de drogas	Destreza manual	Sesibilidad	Rapidez
PZn	+	+	+	+++	++
PNa	+	++	+	+	+
CGI	+	+	++	++	++
EF	+++	+++	+++	+++	+
IDR	++	+++	+++	+++	+

+++ Alto

++ Moderado

+ Bajo

White, 1986 (132)

Tabla XI: Relación entre concentración de Igs séricas y morbi mortalidad en terneros.

Concentración de Igs	N° de terneros	% de mortalidad	Morbilidad
< 16 g/l	398	13,6	107 (de 355)
> 16 g/l	143	0,7	80 (de 121)

White y Andrews, 1986 (133)

Tabla XII: Relación entre concentración de IgG₁ circulante en sangre y morbi mortalidad en terneros.

Concentración de IgG ₁	N° de terneros	% de mortalidad	% morbilidad
< 10 g/l	3603	12,2	46
> 10 g/l	2963	3,3	25

White y Andrews, 1986 (133)

Tabla XIII: Concentración de Igs séricas e incidencia de diarreas, enfermedades respiratorias y mortalidad en terneros de raza Friesian.

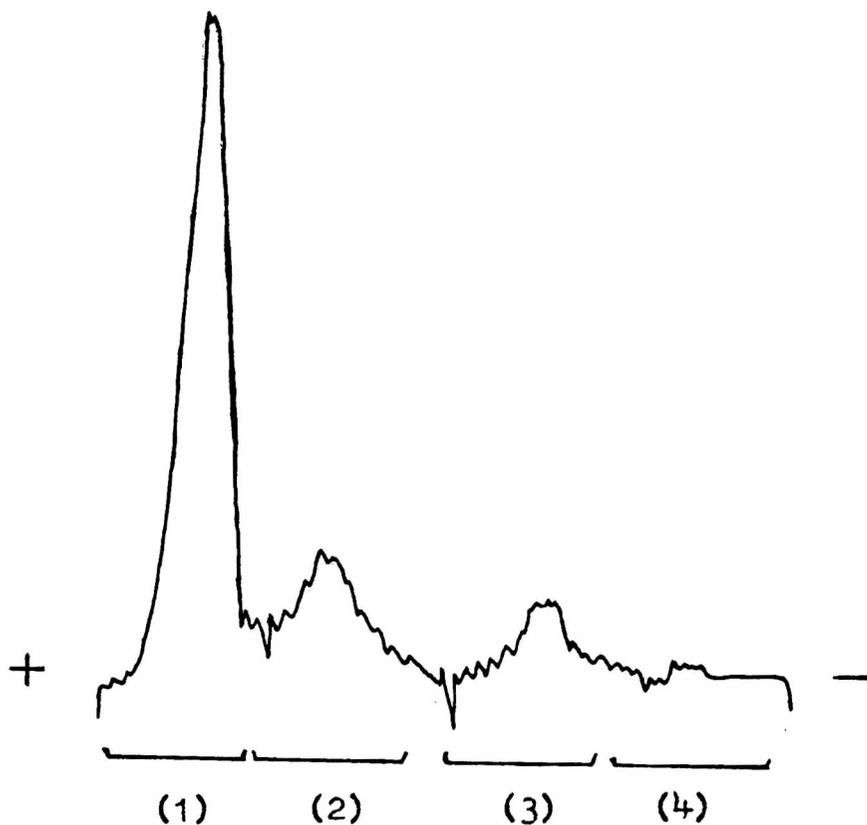
	Baja Igs	Alta Igs
N° de terneros	1376	3187
Diarrea (%)	21	14
Enfermedades respiratorias (%)	36	28
Mortalidad (%)	11	3

Baja: 0-5 U SO Zn₄

Alta: 5-10 U SO Zn₄

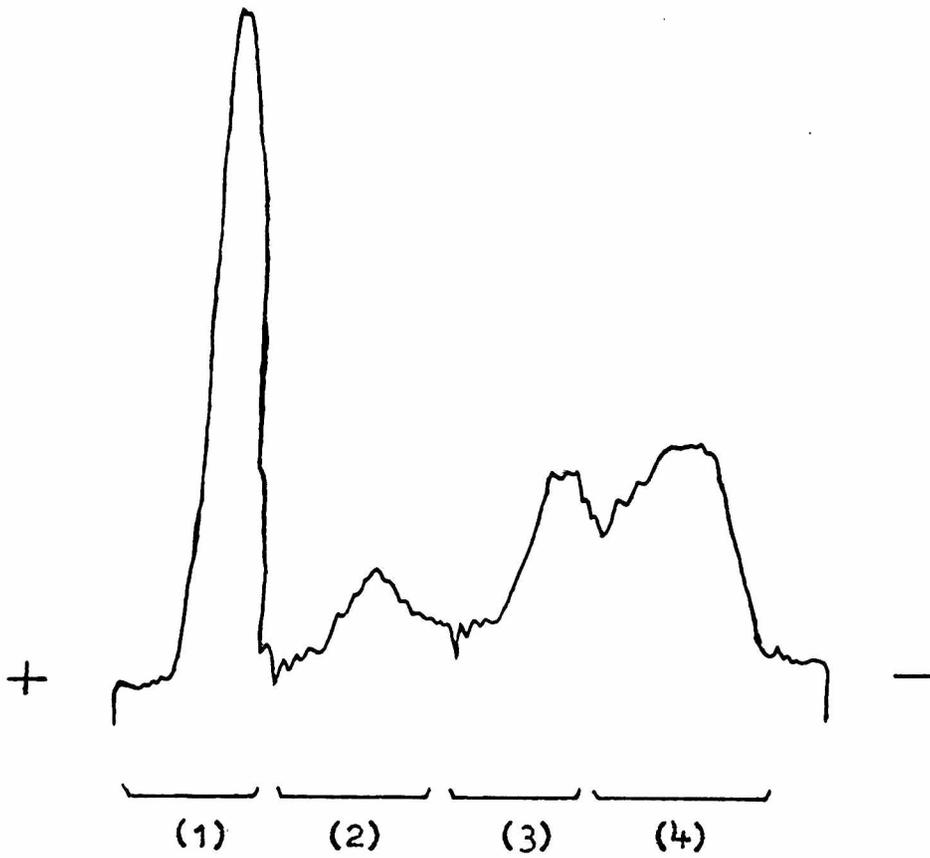
Fallon y Harte, 1987 (39)

GRAFICO 1: Curva densitográfica del suero precalostral.



Proteinas totales	6,5 g%
(1) Albumina	5,74g%
(2) Alfaglobulina	0,14g%
(3) Betaglobulina	0,51g%
(4) Gamaglobulina	0,10g%

GRAFICO 2: Curva densitografica del suero postcalostrual.



Proteinas totales	8,2g%
(1) Albumina	1,91g%
(2) Alfaglobulina	0,62g%
(3) Betaglobulina	1,40g%
(4) Gamaglobulina	4,26g%

GRAFICO 3: Curva densitografica del suero calostroal fresco.

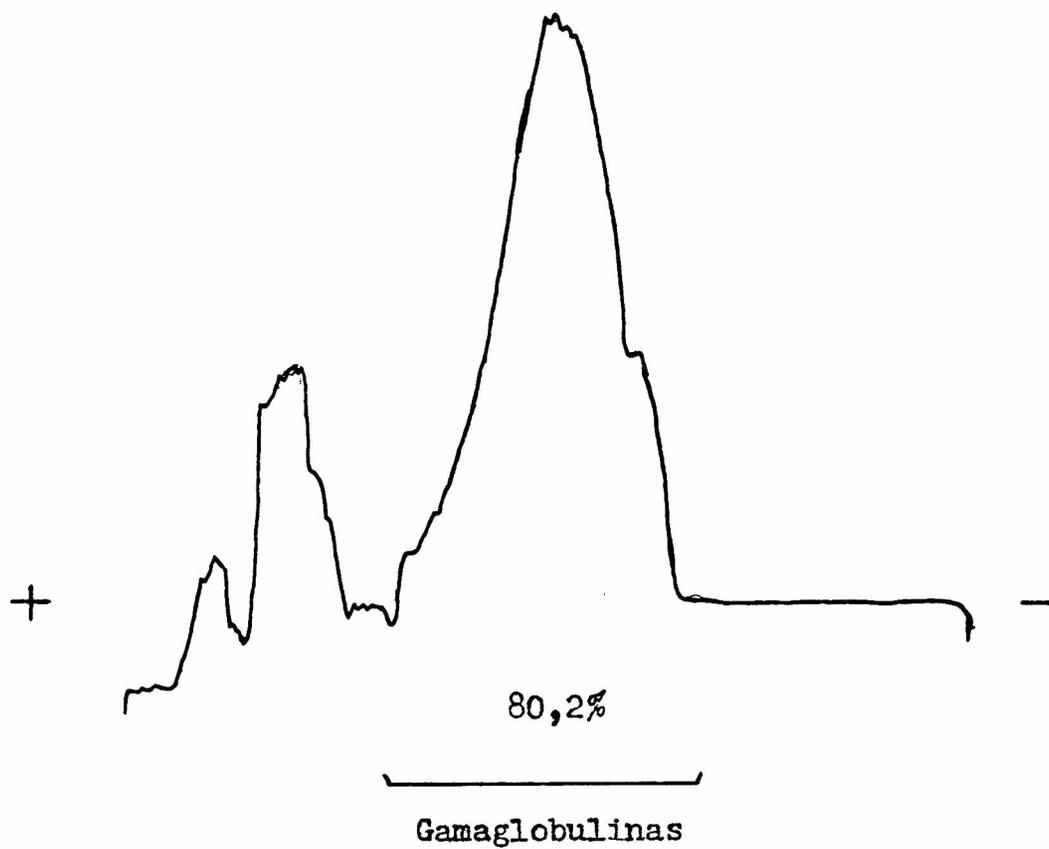


GRAFICO 4: Curva densitografica del suero calostrual
sometido al T I.

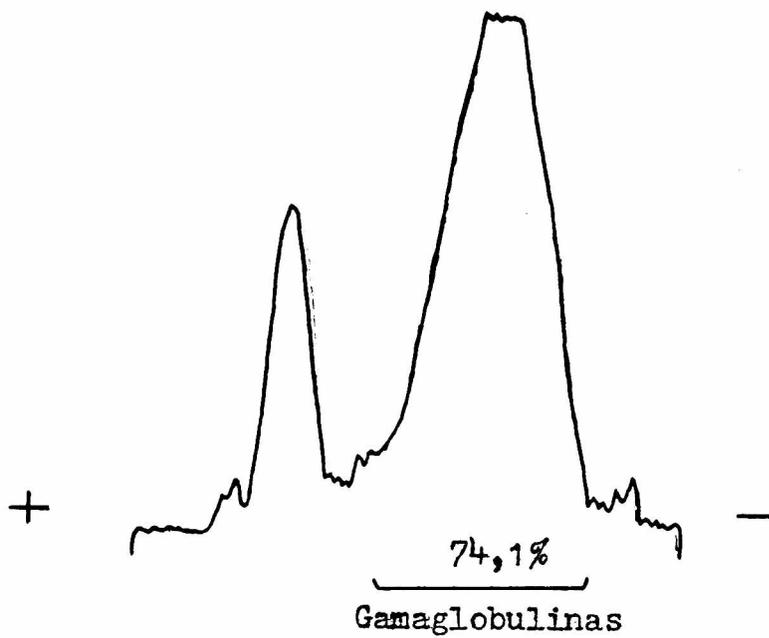


GRAFICO 5: Curva densitografica del suero calostroal
sometido al T II.

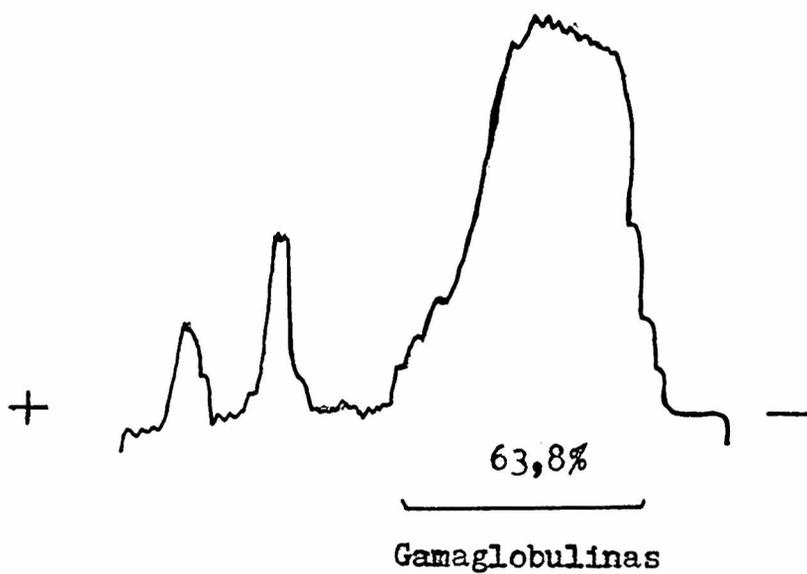


GRAFICO 6: Curva densitografica del suero calostrual
sometido al T III.

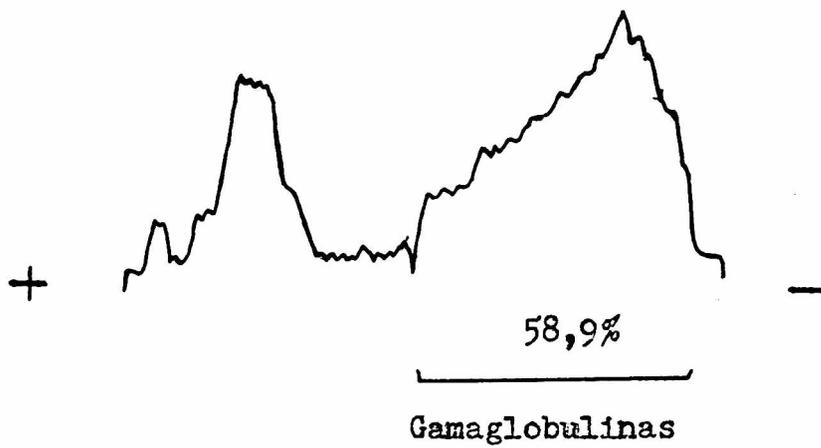
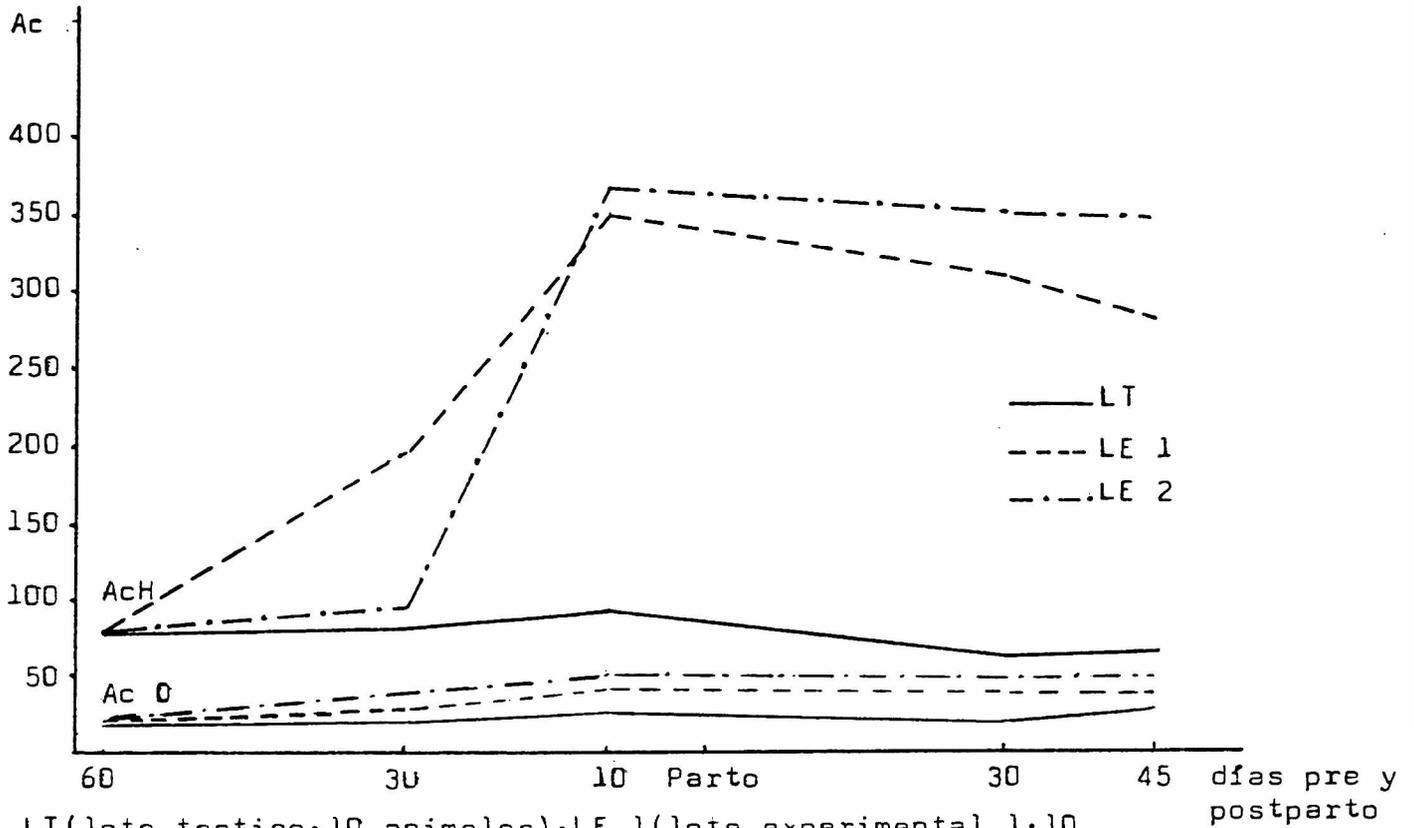


GRAFICO 7 : Valores medios de Ac H y O en suero vacas vacunadas contra Salmonella dublin.



LT(lote testigo:10 animales);LE 1(lote experimental 1:10 animales);LE 2(lote experimental 2:10 animales)

GRAFICO B: Valores medios de Ac H y O en suero de terneros no desafiados.

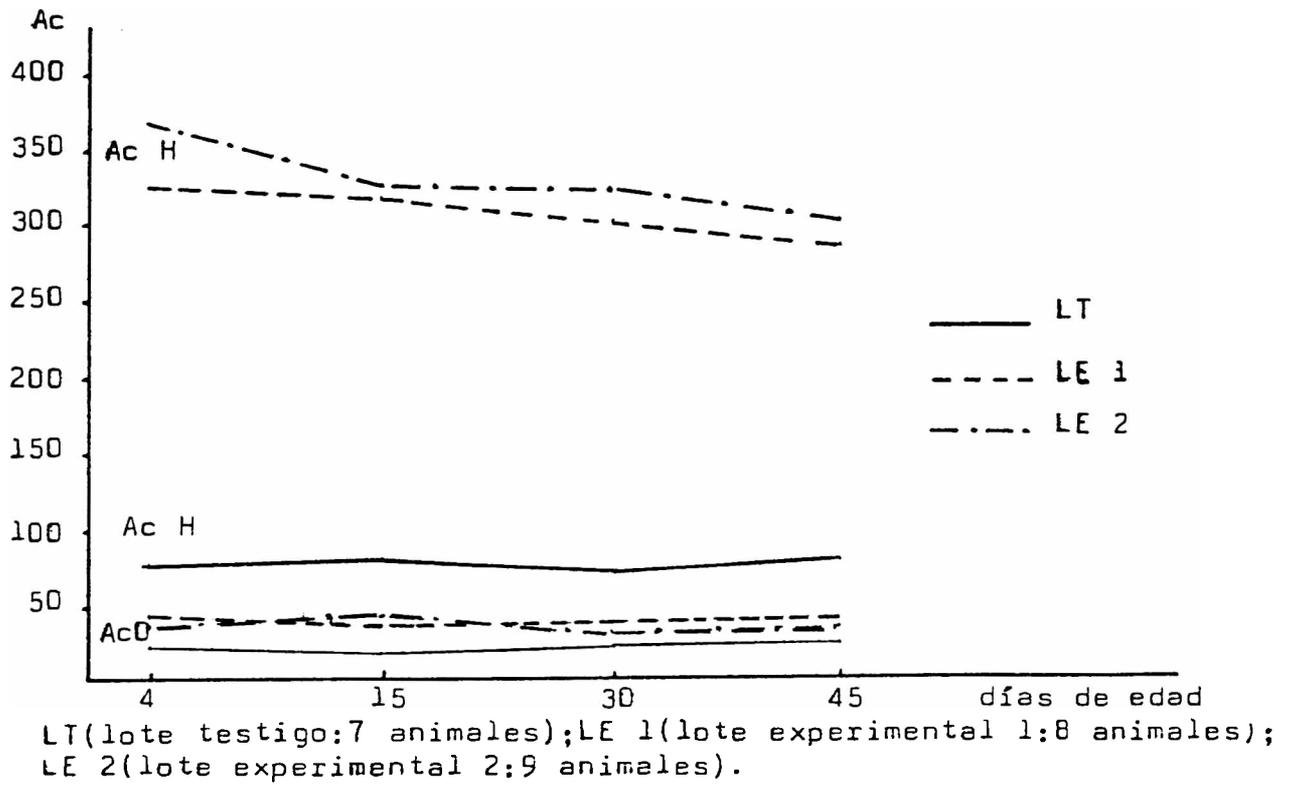
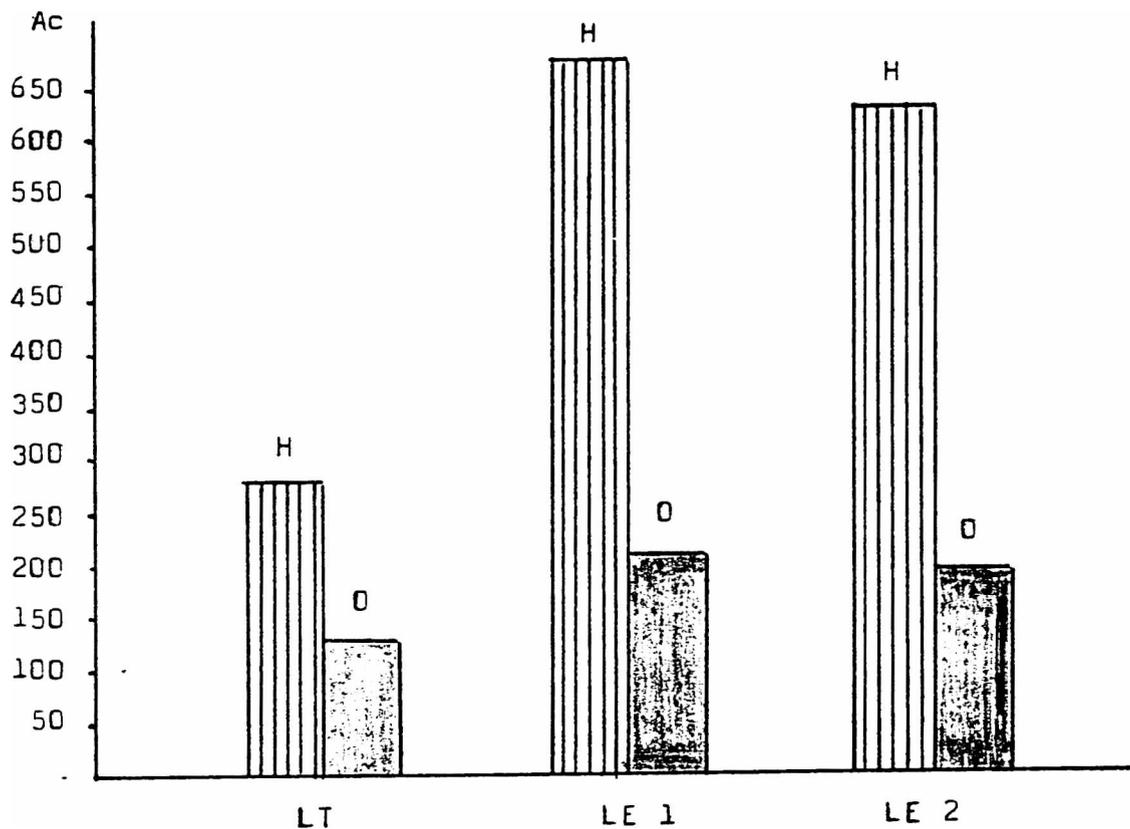


GRAFICO 9: Valores medios de Ac H y O en suero calostrual.



LT(lote testigo:10 animales);LE 1(lote experimental 1:10 animales);
LE 2(lote experimental 2:10 animales).

6.- Bibliografía

- 1.- AITKEN, M.M.; JONES, P.W., HALL,G.A.; HUGHES,D.L. y BROWN, G.T.H..Research in Veterinary Science 31,120.1981.
- 2.- AITKEN,M.M.; JONES,P.W. y BROWN,G.T.H..Research in Veterinary Science 32,368.1981.
- 3.- AITKEN,M.M..Irish Veterinary News January,3.1986.
- 4.- ALMEIDA,R.A.; CALVINHO,L.F.; VITULICH,C.A.: Descripcion de dos casos de salmonelosis em terneros.Vet.Arg. Vol.IV. 35, julio 1987.
- 5.-BALFOUR,W.E. y COMLINE,R.S.: Acceleration of the absorpction of unchanged globulin in the newborn calf factors in colostrum. J.Physaiol.Lond. 160:234-354.1962.
- 6.-BENJAMIN,W.H. y col..Infect.Immun. 50:392-397.1984
- 7.- BERGEY`S: Manual of determinative bacteriology. Eight Edition. Ed. Board. Baltimore USA, 1975
- 8.- BESSER,T.E.; McGUIRE,T.C. y GAY,L.C.: The transfer of serum IgG1 antibody into the gastrointestinal tract in newborn calves. Vet.Immunol. and Immunopath.,17:51-56,1987.
- 9.- BLACK,L.;FRANCIS,M.J.y NICHOLS,M.J.: Protecting young domestical animals from infectinus diseases. Vet.Ann. 25:46-61, 1985.
- 10.- BLAKKMORE, F. y GARNER,R.J.: The maternal transference of antibodies in the bovine. J.Comp.Path.Ther. 66:287-289, 1976.
- 11.- BOEDEKER,E.C. y McQUEEN,C.E.: Intestinal immunity to bacterial and parasitic infections. Immunol.and Allergy Clinics of North America. 8:3,1988.
- 12.- BOURNE,F.J.; NEWBY,T.J.; EVANS,P. y MORGAN,K.: Les besoins en inmunité passive du veau et du porc. Annlis.Rech.Vet. 9,1,239,1978.
- 13.- BROWN,G.T.H. y JONES,P.W.. Journal of Gral. Mircrob. 116:315, 1980.
- 14.- BURLEIGH,P.A.: Cow vaccination checks long-standing scours problem in dairy herds. Norden News, summer, 1981.
- 15.- BUSH,I.J. y STALEY,T.E.: Absorptiuon of colostrual immunoglobulins in newborn calves. J.Dairy Sci. 63:672-680,1980.
- 16.- BUTLER,J.E.: Bovine immunoglobulins: An augmented review.

- Vet.Immunol. and Immunopath..4:43-152,1983.
- 17.- CABELLO,G. y LEVIEUX,D.: Comparative absorption of colostral IgG1 and IgM the newborn calf effects of thiroxine, cortisol and environmental factors. Ann.Rech.Vet. 11:1-7,1980.
 - 18.-CALDOW,G.L.; WHITE,D.G.; KELSEY,M.; PETERS,A.RySOLLY,K.J.: Relation of calf antibody status to disease and performance. The Vet.Record. January 16,1988.
 - 19.- CAMPBELL,B. y PETERSEN,W.E.: Immune milk a historial survey . J. Dairy Sci. 25:345-358,1963.
 - 20.- CAMPBELL,B.; SARVAR,M. y PETERSEN,W.E.: Diathelic immunisation. Sci. N.Y. 125:932-933,1977.
 - 21.- CARLSON,S.M.A. y MULLER,L.D.: Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. J. Dairy Sci. 60:556,1977.
 - 22.- CARTER,G.R.: Procedimientos de diagnostico en bacteriologia y micologia veterinaria. Acribia. Espana. pag.75-95,1969.
 - 23.- COLOMBO,L.L. y HERKOVITS,J.: Relacion materno fetal: Aspectos inmunologicos. Rev.Med.Vet. Bs. As. 55:212-219,1984.
 - 24.- COWLES,R.R. y COPETAND,D.: A new test for detection an immunoglobulin levels in the neonatal foal. Proc.An.Conu.Am.Annls.Eq.Pract. 341-343,1983.
 - 25.- CUNNINGHAN,B.: Etude des macro et micro inmunoglobulines contre Brucella abortus et de leur transfer de la vache au veau par le colostrum. Annls.Rech.Vet. 9:1,293-300,1978.
 - 26.- CURTIS,R.; KELLY,S.M.; GULIG,P.A.; GENTRY,C.R. y GALAN,J.: Avirulent salmonellas expressing virulence antigens form others pathogens for use as orally vaccines . Am.Soc.Microb.Virul.Rech. 109:10-19,1987.
 - 27.- CHEVILLE,N.F..Patologia celular. Ed.Acribia. Espana,1980.
 - 28.- DAM,A.: Studies on the gammaglobulins levels in sera of calves from herds with colisepticaemia as a problem and some investigations on the content of specificantibodies in colostrum. Nord.Vet.Med. 20:449-457,1968.
 - 29.- DARDILLAT,J.: Colibacillose et maladiea neo-natals du veau these Doct.Vet.Lyon,1968.
 - 30.- DAVIDSON,J.N.; YANCEY,S.P.; CAMPBELL,S.G. y WARNER,R.G.: Realationship between serum immunoglobulin values and incidence of respiratory disease in calves. JAVMA, 179:708-710,1981.

- 31.- DAVIS,B.D.; DULBECO,R.; EISEN,H.N.; GINSBERG,H.S. y WOOD,W.B.: Microbiology. Hoeber & Row. New York. pag. 774-779,1967.
- 32.- DE LOUIS,C.: Physiologie de la production du colostrum. Annls.Rech.Vet. 9,1:193,1978.
- 33.- EDWARDS,P.H. y EWING,W.H.: Identification of enterobacteriaceae. Burgess Publ.Company.Second Edition,1970.
- 34.- EDWARDS,S.A.; BROOM, D.M. y COLLINS, S.C.: Factors affecting levels of passive immunity in dairy calves. Br.Vet.J. 138:233-240,1982.
- 35.-ELNAGEH,M.M.: Siege de l'absorption intestinale des gammaglobulines du colostrum chez le veau nouveau-ne. Annls.Med.Vet. 111:380-383,1967a.
- 36.- ELNAGEH.M.M.: Voie d'absorption des gammaglobulines du colostrum au niveau de l'intestin grele du nouveau-ne. Annls.Med.Vet.111:384-398,1967b.
- 37.- ELNAGEH,M.M.: Relation entre l'arret de la resorption intestinale des anticorps et le renouvellement de l'epithelium intestinae. Annls.Med.Vet. 111:400-425,1967c.
- 38.- FALLON,R.J.: Immunoglobulins and the newborn calf Teagasc, Grange Res.Centre Dunsay, Co.Meath Ireland.295-313,1992.
- 39.- FALLON,R.J. y HARTE,F.J.: A survey of factors affecting calf blood serum immunoglobulin level. Ir.J.Ag.Res. 26:1-7,1987.
- 40.- FENNESTAD,K.L. y BORG-PETERSEN,C.: Antibody formation in bnovine foetuses with Leptospirasax-koebing. A.Path.Microbiol.Scand.,1962.
- 41.- FEY,H.: Pathogenie de la colisepticemie chez le veau. XVIII Congr.Mondial Vet. Paris 1:402-403,1967.
- 42.- FINLAY,B.B. y FALKOW,S.: Virulence factors associated with Salmonella sp.. Microbiol. Sci. Vol.5,11,1988.
- 43.- FISHER,E,W,; MARTINEZ, A.A.; TRAININ,Z. y MEIRON,R.: Studies of neonatal diarrhoea II: Serum and fecal immunoglobulins in enteric colibacillosis. Br.Vet.J. 131:402-415,1975.
- 44.- FOLEY,J.A.; HUNTER,A.G. y OTTERBY,D,E,: Absorption of colostral proteins by newborn calves fed unfermented, fermented or buffered colostrum. J.Dairy Sci. 61:1450-1456,1978.
- 45.- FUQUAY,J.W.; KESLER,E.M. y ZARKOWER,A.: Effect of prepartum

and postpartum diet on histamine metabolism of young holstein cows. J.Dairy Sci. 52:1781-1785,1969.

46.- GAY,C.C.: Proceeding of the fourth International Symposium on neonatal disease. Ed. S.D.Acres.Saskatoon.Veterinary Infectious Disease Organisation, pag.346,1984.

47.- GARDNER,R.J. y CRAWLEY , W.: Further observation on the maternal transference of antibodies in the bovine. J.Comp.Path.Ther. 68:112-0114,1978.

48.- GIBSON,C.D. y ZEMJAMIS.R.: Immune response of the bovine foetus to several antigens. Am.J.Vet.Res. 34,10:1277-12890,1973.

49.- GIRARD,D.: Contribution a l`etude de l`etiologie de la colibacillose du veau. These Doct.Vet.Paris,1969.

50.- GOMEZ,C.M. y PENNIMPEDE,E.F.F.: Aduvantes e inmunidad. ACOVEZ.Colombia. 16:17-20,1991.

51.-GORET,P.; BERTRAND.M. y JOUBERT,L.: Allaitement et immunite.Rec.Med.Vet. 137:827-874,1960.

52.- GUIDRY,A.J.; PAAPE,M.J. y PEARSON,R.E.: Effects of parturitionand lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids and neutrophil phagocytosis in the cow. Am.J.Vet.Res. 37:1195-1200,1976.

53.- GREEN,S.A.; JENKINS,S.J.; CLARK,P.A.: A comparison of chemical and electrophoretic methods of serum protein determination in clinically normal domestic animals of various ages. Cornell Vet. 72:416-426,1982.

54.- HAHN,I. y SCHOLL,W.. Monatschefte fur Veterinarmedizin 29: 208,1984.

55.- HALLIDAY,R.: The effect of steroid hormones on the absorption of antibodies by the young rat. J.Endocr. 18:55-66,1959.

56.- HAMMER,D,D,K. y MOSSMAN,H.: L`importance des recepteurs membranaires dans le transfert des immunoglobulines du plasma vers le colostrum. Annls.Resch.Vet. 9,1:229-232,1978.

57.- HUDSON,R.J.; SABEN,H.S. y EMSLIED,D.: Physiological and enviromental influences on immunity. The Vet.Bull. 44: 120-128,1974.

58.- INGRAM,D.G. y MALCOMSON,M.E.. American Journal of Veterinary Research. 31,61,1970.

59.- IOVINE-SELVA: El laboratorio en la clinica.. 2da.

- Edicion. Ed. Panamericana. Bs. As., 1979.
- 60.- JACQUET, J.: L'immunité mammaire. Econ. Med. Anim. 1:72-80, 1979.-
- 61.- JEFFCOT, L.B.: Passive immunity and its with special reference to the horse. Biol. Rev. 47:439-464, 1972.
- 62.- JOHNSTON, N.E.; ESTRELLA, R.A. y UXENDER, W.D.: Resistence of neonatal calves given colostrum diet tu ural challenge with a septicemia producing Escheriquia coli. Am. J. Vet. Res. 38:1323-1326, 1977.
- 63.- JONES, P.W.; COLLINS, P. y AITKEN, M.M.: Passive protection of calves against experimental infection with Salmonella typhimurium. Vet. Record. 123:536-541, 1988.
- 64.- KEREN, D.F.; LOWELL, G.H.; RAPPOVOLI, A. y NENCIONI, L.: IgA dependent cell-mediated activity agains enteropathogenic bacteria: distribution, specifity and characterization of the effector cells. J. Immunol. 133:988-992, 1984.
- 65.- KIDDY, C.A.; McCANN, R.; MAXWELL, C.; ROCK, C.; PIERCE, C. y BUTLER, J.E.: Changes in levels of immunoglobulins in serum and other body fluids immediathy before and after parturition. J. Dairy Sci. 54:1325-1327, 1971.
- 66.- KLAUS, G.G.B.; BENETT, A. y JONES, E.W.: A quantitative study of the transfer of colostrum immunoglobulins to the newborn calf immunology. 16:293-299, 1969.
- 67.- KRAMER, A.. Von Monatshefte fur Veterinarmedizin. 37, 861, 1982.
- 68.- KRAMS, S.: Etude immunologique du serum de colostrum de bovin. Tesis .Toulouse. Francia. 64p., 1969.
- 69.- LACHERETZ, A.; CHANTAL, J; DESMETTRE, P.: Dosage et evaluation de l'hypogammaglobulinemie chez le veau nouveau-ne. Rev. Med. Vet. .138, 10:819-826, 1987.
- 70.- LALA, P.K.; KEARNS, M. y COLAVICENZO, V.: Cells of the fetomaternal interface: heir role in the manteinance of viviparous pregnancy. The American J. of Anatomy. 170:501-517, 1984.
- 71.- LEVINE, B.B.; KAPER, J.B.; BLACK, R. y CLEMENTS, M.: New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. Microbiol. Rev. p510-550, 1963.
- 72.- LIGGIT, H.D.; DEMARTINI, J.C. y PEARSON, L.D.: Immunologic

- responses of the bovine fetus to Parvovirus infection. Am.J.Vet.Res.43:1355-1356,1982.
- 73.- LOGAN,E.F.: Absorption of colostral immunoglobulin by the neo-natal calf. Br.Vet.J. 134,3:258-262,1978.
- 74.- MACH,J.P. y PAHUD,J,J,: Secretary IgA; a major immunoglobulin in most bovine external secretions. J.Immuol.106:552-562,1971.
- 75.- MAIDMENT,D.C.J.: Changes in immunoglobulins levels during storage of fermented bovine colostrum. Depart.Sci.,Bath College of Higher Educ.,1981.
- 76.- McEWAN,A.D.; FISHER,E.W.; SELMAN,I.E. y PENHALE,W.J. : A turbidity test for the estimation of immunoglobulins levels in neonatal calf serum. Clin.Chim.Acta,27:155-163,1970.
- 77.- McNABB,P.C. y TOMASI,T.B.: Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Ann.Rev.Microbiol. 35:477-496,1981.
- 78.- McNULTY,M.S.y LOGAN,E.F.: Effect of vaccination of the dam on rotavirus infection in young calves.Vet.Record, march 14, 1987.
- 79.- MENSİK,J.; SALAJKA,E.; STEPANEK, J.; ULMAN,L.; PROCHAZKA,Z y DRESSLER,J.: Utilization d'un colostrum bovin polyvalent dans la prevention des infections enteriques chez veaux et les porcelets. Anns.Rech.Vet. 9,1:255-261, 1978.
- 80.- MERRIMAN,M.G.S.: Serum immunoglobulins in newborn calves before and after colostrum feeding. Can.J.Comp.Med. 35:269-273,1971.
- 81.- METZGER,J.J. y PARAF,A.: Problemes poses par l'immunisation du jeune: cas particulier du veau colloque sur la diarrhee des veaux nouveau-ne. SEI.Ed.CNRA Versailles. 49:107-116,1972.
- 82.- MICHAEL,A.; ZILBER,D.; TODER,H.; COHEN-ARAZI,E.;FRANK,D. y BAR-MOSHE,B..Israel J. Vet. Med. 43,72,1987.
- 83.- MITCHEL,C.A.: Production of antibodies in the mammary gland with special refence to virus neutralizing antibody. Can.J.Comp.Med. 29:262-265,1965.
- 84.- MOLLA,A.: Estimation of bovine colostral immunoglobulins by refractometry. The Vet.Record.July 12,1980.
- 85.- MYERS,L.L. y SNODGRASS,D,R,: Colostral and milk antibody titers in cows vaccinated with a modified live-rotavirus-coronavirus vaccine. JAVMA, Vol,181,5,1982.

- 86.- NOSEDA,R.P.; MARTINEZ,A.H.; BARDON,J.C.; CORDEVIOLA,J.M.: Salmonelosis humana y animal . Vet.Arg.Vol.VI,54, 1989.
- 87.- ODEON,A.C.: Inmunidad pasiva en terneros : realacion entre valores de proteinas sericas e incidencia de diarras durante las primeras semanas de vida. Rev. Med.Vet. Bs.As. 65,5:260-266,1984.
- 88.- OGRA,P.L. y KARZON,D.T.: Poliovirus response in serum and nasal secretions following intranasal inoculation with inactivated poliovirus. J.Immunol. 102:15-23,1969.
- 89.- OLSON,D.P. y WAXLER,G.L.: Immune responses of the bovine fetus and neonate to Escherichia coli: Plaque-forming and intestinal immune responses. Am.J.Vet.Res. 38:639-647,1976..
- 90.- OLSON,D.P. y WAXLER,G.L.: immune responses of the bovine fetus and neonate to Escherichia coli: Plaque-forming and intestinal immune responses.Am.J .Vet.Res. 38:1177-1181,1977.
- 91.- OUDAR,J.; LARVOR,P.; DARDILLAT,J. y RICHARD,Y.: Revue de medecine veterinaire. Tome CXXVII,1976.
- 92.- OSBURN,B.I.; STABENFELDT,G.H.; ARDANS,A.; TREES,C. y SAWYER,M.S.; Perinatal immunity in calves. JAVMA. 164:295-297,1974.
- 93.- PAM AMERICAN HEALTH ORGANIZATION.. Production and testig methos for thyhoid vaccine, 1972.
- 94.- PFEIFFER,N,; McGUIRRE,T.C.: A sodium sulfiter precipitation test of assessment of colostral immunoglobulin transfer to calves. JAVMA. 170,8:809-811,1977.
- 95.- PELLERIM,J.L.: L`immunite neo-natal des bovins Revue. Med.Vet. 133,8-9:521-537,1982.
- 96.- PENHALE,W.J.; CHRISTIE,G.; McEWAN,A.D.; FISHER,E.W. y SELMAN,I.E.: Quantitative studies on bovine immunoglobulins.Br.Vet.J. 126:30-37,1970.
- 97.- PENNIMPEDE,E.F.F.; y GOMEZ,C.M.: Vacunas y vacunaciones en los animales domesticos. Therios 4:126-139,1984.
- 98.- PENNIMPEDE,E.F.F.: Inmunoprofilaxis en las pequenas especies domesticas. En prensa, 1992.
- 99.- PENNIMPEDE,E.F.F.: Inmunidad neonatal en el ternero e inmunoprofilaxis. Vet.Arg. IV(31):64-70,1987.
- 100.- PENNIMPEDE,E.F.F. y GOMEZ,C.M.: Inmunologia e

- inmunoprofilaxis en los animales domesticos. Rev. Col. Med. Vet. Prov. Bs. As. 1:18-24, 1988.
- 101.- PENNIMPEDE, E.F.F. y DILORENZO, C.L.: Inmunoserologia en Brucelosis bovina. II parte. Therios, 87:78-87, 1991.
- 102.- PENNIMPEDE, E.F.F.; MORTOLA, E.C.; NAUMOVICH, D. y BARRAGAN, J.R.: Transferencia pasiva de la inmunidad en le bovino. I. Breve estudio bibliografico. Med. Vet. Barcelona. Vol. 9, 1, 1992.
- 103.- PERRYMAN, L.E.: Primary and secondary immunodeficiencies of domestic animals. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 23:23-52, 1979.
- 104.- PIVONT, P.; ANTOINE, H. y GREGOIRE, R.: Les test de detection rapide de l'hypogammaglobulinemie de veau nouveau-ne: Comparaison et developments. Ann. Med. Vet. 126:621-628, 1982.
- 105.- POPOFF, M.R.: Les enterotoxemies. Revue Med. Vet. 140, 6:479-491, 1989.
- 106.- PORTER, P.: Structural and functional characteristics of immunoglobulins of the common domestic species, Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 23:1-21, 1979.
- 107.- POSPIZIL, Z.; KREJCI, J. y RODAK, L.: Demostration of colostral antibodies in the nasal secretions of calves and their protective effect against infection. Acta Vet. Brno. 52:59-65, 1983.
- 108.- REDMAN, D.R.: Prenatal influence on immunocompetence of the neonate. J. Anim. Sci. 49:258-267, 1979.
- 109.- REITER, B.: Les facteurs antimicrobiens non specifiques du colostrum: Revue bibliog. Annl. Rech. Vet. 9, 1:205, 1978.
- 110.- ROBISON, J.D.; STOTT, G.H. y DENISE, S.K.: Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. J. Dairy Sci. 71:1283-1287, 1988.
- 111.- ROSSI, C.R.; KIESEL, G.K. and HUDSON, R.S.: Cell mediated and humoral immune responses of cattle to Brucella abortus, Mycobacterium bovis and Tetanus toxoid: immunization of the fetus. Am. J. Vet. Res. 39:1742-1747, 1978.
- 112.- ROSSI, C.R.; KIESEL, G.K.; HUDSON, R.S.; POWE, T.A. y FISHER, L.F.: Evidence for suppression or incomplete maturation of cell-mediated immunity in hypersensitivity responses. An. J. Vet. res. 42:1369-1370, 1981.
- 113.- ROYAL, W.A.; ROBINSON, R.A. y DUGANZICH, D.M.. New Zealand Veterinary Journal 16, 141, 1968.

- 114.- SAIF,L.S.: Passive immunity in animals: The central role of early protection in non-ruminants and ruminants food an health. Res.Prog.Ohio Agric. Res. and Dev.Center The Ohio State Univer. 223-239,1992.
- 115.- SARVAR,M.; CAMPBELL,B. y PETERSEN, W.E.: Observations on the presence and concentration of natural antibodies in colostrum. Can.J.Comp.Med. 28:157-160,1964.
- 116.- SAXEN,H.: Microbiol. Pathogen. 2:15-28,1967.
- 117.- SCHULTZ,R.D.; DUNNE,H.W. y HEIST,C.E.: Ontogeny of the bovine immune response. Infect. Immun. 7:981-991,1973.
- 118.- SELMAN,L.E.; McEWAN,A.D. y FISHER, E.W.: Absorption of immune lactoglobulin by newborn dairy calves. Res.Vet.Sci. 12:205-210,1971.
- 119.- SETO,A.; OKABE,T.; SASAKI,N. y ITO,Y.: Opsonic activity and O-agglutinins against Escherichia coli in bovine colostrum. Am.J.vet.Res. 37:635-638,1976.
- 120.- SIMENSEN,E.: Calf mortality epidemiological consideration. World Review of Animal Pord. Vol.XXII,3,1986.
- 121.- SMITH,H.W..Journal of Hygiene. 63:117,1965.
- 122.- SMITH.K.L.; MUIR,L.A.; FERGUSON.L.C. y CONRAD,H.R.: Selective transport of IgG, into the mammary gland, role of estrogen and progesterone. J.Dairy Sci. 54:1886-1894,1971.
- 123.- SNYDER,A.C.; SCHUH,J.D.; WEGNER,T.N. y GEBBERT,J.R.: Passive immunization of the newborn dairy calf via fermented colostrum. J. Dairy Sci. 57:641,1974.
- 124.- STONE, S.S. y GITTER, M.: The validity of the sodium sulfite test for detecting immunoglobulins in calf sera. Br.Vet.J. 125:68-73,1969.
- 125.- STONES,S.S.: Comparison of bovine serum and colostrum antibody. Immunology. 18:369-377,1970.
- 126.- STOTT,G.H.: Immunoglobulin absorpction im calf neonates with special consideration of strees. J.Dairy Sci. 63:681-688,1980.
- 127.- TENNAT,B.; BALDWIN,B.H.; BRAUM,R.K.; NORCROSS,N.L. y SANDHOLM.M.: Useof the glutaraldehyde coagulatuiou test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal calves. JAVMA, 174,8,1974.
- 128.- TIZARD,I.: Basic immunology-3: The impoprtance of

- macrophages. *Vet.Med.* 2:250-258,1986.
- 129.- TOPLEY,W.W.C. y WILSON,G.S.: *Bacteriologia e inmunidad.* Ed. Savat. Barcelona, 1942.
- 130.- TRUEBLOOD,M.S.; SWIFT,B,L. y BEAR,P.D.: Bovine fetal response to *Anaplasma marginale.* *Am.J.Vet.Res.* 32:1089-1090,1971.
- 131.- VENA,M.M.; RIVERO,V.B.; BOUISSOU,H.G. y COSTA,J.: Salmonelosis en terneros de tambo. Primer aislamiento de *Salmonella dublin* en terneros de la Republica Argentina. *Vet.Arg.Vol.* 1,6,1984.
- 132.- WHITE,D.G.: Evaluation of a rapid specific test for detecting colostral IgG1 in the neonatal calf. *Vet.Rec.* 118:68,1986.
- 133.- WHITE, D.G. y ANDREWS, A.H.: Adequate concentrations of circulating colostral proteins for market calves. *Vet.Rec.* 119:112-113,1986.
- 134.- VILLOUTA,G.; GONZALEZ,M. y RUADPH,W.: Quantitative study on serum immunoglobulin levels in suckled calves and their relationship to post natal diarrhoea in Chile. *Br.Vet.J.* 136:394-400,1980.
- 135.- WALDMAN,R,M.: l'immunoglobuline A et l'immunité cellulaire au cours de l'immunization locale. *Bull.Inst.Pasteur Paris,* 69:79-90,1971.
- 136.- WATSON,D.L.: Immunological functions of the mammary gland and its secretion: Comparative review. *Aust.J.Biol.Sci.*33:403-422,1980.
- 137.- WEINSTEIN,D.L.: *Infect.Immunol.* 46:819-826,1984.
- 138.- WILLIAMS,R.L. y GIBBONS, H.L.: Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 177:697-699,1972.
- 139.- WILLIAMS,M.R. y HINSON,G.: Stages in bacterial invasion. *Journal Applied bacteriology Symp.Supl.* 1315-1475,1988.
- 140.- WINTER,A.J.: Basic principles of immunity in bacterial infections. *Adv.Vet.Sci.Comp.Med.* 23:53-69,1979.
- 141.- WOOLCOCK,J.B.: Bacterial infections and immunity in domestic animal. Elsevier Amsterdam.Holland. 1:198-200,1979.
- 142.- WRAY,C. y SOJKA,W.J..J. *Dairy Research* 44:383,1977.
- 143.- ZANETTI,M.; SERCARZ.E. y SALK,J.: The immunology of new

generation vaccines. *Immunology Today* 8,1:12-25,1987.

144.- ZARKOWER,L.: Histamine in the cow: pre and post parturition histamine concentrations in plasma, milk and tissue. *Am.J.Vet.Res.* 28:1751-1757,1967.

Art.11: La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una tesis.