

Guía para la crianza y mantenimiento de terneros privados de calostro para su utilización como modelo animal

Dr. Malacari Dario Amilcar, PhD



INTA // Ediciones

Colección
RECURSOS

Guía para la crianza y mantenimiento de terneros privados de calostro para su utilización como modelo animal

Dr. Malacari Dario Amilcar



Guía para la crianza y mantenimiento de terneros privados de calostro para su utilización como modelo animal.

Dr. Malacari Dario Amilcar

636.2 Malacari, Dario Amilcar
M29 Guía para la crianza y mantenimiento de terneros privados de calostro para su utilización como modelo animal / Dario Amilcar Malacari. – Buenos Aires : INTA, 2016. 30 p. : il.

ISBN N° 978-987-521-700-3

i. título

GANADO BOVINO – TERNERO – ALIMENTACION DE LOS ANIMALES
– CALOSTRO – MANEJO DEL GANADO – MODELOS ANIMALES

INTA - DD



**Dirección Nacional Asistente de Sistemas de Información,
Comunicación y Calidad**
Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional
Comunicación Visual Diseño: DG. *Liliana Estela Ponti*

No se permite la reproducción total o parcial de este libro, ni su almacenamiento en un sistema informático, ni su transmisión en cualquier formato o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia u otros métodos, sin el permiso previo del editor.

Índice

Introducción	5
Agradecimientos	6
Capítulo 1.	7
Obtención y cuidado inicial del TPC	
Capítulo 2.	9
Antibioticoterapia	
Capítulo 3.	11
Alimentación	
Capítulo 4.	15
Instalaciones	
Capítulo 5.	18
Bienestar animal	
Capítulo 6.	20
Parámetros hematológicos	
Capítulo 7.	23
Evaluación de la respuesta inmune del modelo de TPC	
Bibliografía	28

Introducción

Los modelos animales son de suma importancia para la obtención de conocimiento básico en distintos campos de la medicina veterinaria. Gracias a la utilización de estas herramientas se ha podido abordar la resolución de problemas científicos y biomédicos. El conocimiento de la fisiología del animal utilizado como modelo para el estudio de diferentes mecanismos biológicos es imprescindible y determinante para conocer sus posibles aplicaciones. La obtención de un animal “estandarizado o definido” es fundamental para conseguir resultados fehacientes de la experimentación. Esto implica que el animal utilizado como modelo de estudio posea características genéticas y sanitarias definidas, que sea criado en un ambiente controlado que respete los requerimientos de la especie, cumpliendo con los principios éticos de bienestar animal (Hernández, D. S., 2006).

El estudio de enfermedades causadas por agentes infecciosos requiere, en muchos casos de forma indispensable, de la utilización del hospedador natural como modelo de infección. Es muy importante recrear los signos involucrados en el curso de una afección causada por el agente infeccioso ya que esto permite entender la patogenia del agente y cómo se relaciona con el hospedador natural (Griffin, J.F. y col., 1995). Obtener datos estandarizados y comparables facilita, en una siguiente etapa, reemplazar el modelo por otras alternativas como ensayos in vitro.

El bovino es utilizado en estudios de enfermedades infecciosas ya que permite recrear signos involucrados en la patogenia causada por diferentes agentes infecciosos y parasitarios (Herath, S. y col., 2006; Lee, C. M. y col., 1999; Santos, R. L. y col., 2001). Las diferencias entre el sistema inmune del bovino y de los animales de laboratorio dificultan la interpretación de resultados de estudios de inmunología comparada (Bailey, M. y col., 2013). Esto se pone de relevancia, muchas veces, en estudios de inmunidad vacunal.

Para poder evaluar el comportamiento del sistema inmunológico del bovino ante infecciones o inmunizaciones experimentales se requiere de animales libres de anticuerpos específicos o de memoria inmunológica contra el agente en estudio. Estas características son difíciles de encontrar en países como Argentina donde muchas enfermedades infecciosas son endémicas y la vacunación contra diversos patógenos de importancia pecuaria constituye una herramienta frecuentemente utilizada en los sistemas productivos (Mation, N. y col., 2004; Pecora, A., Malacari D. A. y col., 2014). La utilización de animales jóvenes sin vacunación, que han sido estudiados en los últimos años, tiene como desventaja la presencia de componentes inmunológicos adquiridos de la madre a través del calostro. La inmunidad calostrual, que en el caso de bovinos no es solamente humoral, puede interferir en los estudios de inmunopagenia y modificar la respuesta a la vacunación (Bucafusco, D. y col., 2014; Endsley, J. J. y col., 2003; Sadir, A. M. y col., 1988) . Un punto

importante es que en los bovinos la inmunidad materna se transfiere exclusivamente por el calostro; en consecuencia, un ternero que no consume calostro carece por completo de elementos inmunológicos maternos (Reber, A. J. y col., 2006). Esto hace que el ternero privado de calostro (TPC) sea un modelo con las características adecuadas para estudiar la respuesta inmunológica del bovino ante infecciones o inmunizaciones experimentales evitando interferencias inducidas por componentes inmunológicos adquiridos de forma pasiva.

Establecer el modelo TPC conlleva a la dificultad de mantener viable e inmunológicamente competente al ternero. Es preciso también determinar los parámetros normales del animal en las condiciones que se estandaricen para el uso de este. Estos parámetros (“normales” para la edad, el sexo, la raza, el lugar geográfico y otras variables) serán luego considerados como valores de referencia en experimentos comparativos con TPC afectados por distintos tratamientos.

Este manual está dirigido al personal involucrado en la utilización del modelo TPC con fines científicos. Contiene indicaciones sobre el protocolo de nutrición sanitario y de manejo de terneros privados de calostro desde el nacimiento hasta su empleo como modelo animal. El manual indica las condiciones que deben seguirse con el fin establecer un modelo animal utilizando TPC, asegurando que posea las características adecuadas para el uso en estudios de inmunopatogenia y eficacia de vacunas. Cabe aclarar que esta guía pretende ser una herramienta de referencia para dicho propósito y se recomienda complementarlo con el constante asesoramiento con técnicos especializados en el tema.

Agradecemos los aportes de los médicos veterinarios Danilo Bucafusco, Sebastián Di Giácomo, María Sol Perez Aguirregurualde y al personal de apoyo, José Vallejos y Ramón Escobar.

El equipo que desarrolló este Manual está conformado por:
Malacari Dario Amilcar, M.V., PhD.

Autor corresponsal: malacari.dario@inta.gob.ar
INTA, CICVyA, Instituto de Virología. Nicolas Repetto y de los Reseros s/n.
Castelar, CP 1712. Provincia de Buenos Aires, Argentina. Teléfono: 4621-1447.
Pecora Andrea, Lic., PhD.
Capozzo Alejandra Victoria, Lic., PhD.
Odeón Carlos Anselmo, M.V., M.Sc., PhD.

Obtención y cuidado inicial del TPC

Uno de los aspectos más importantes para la obtención y sobrevivencia de un TPC es presenciar el parto de este y si es posible ubicar un protector plástico para evitar el contacto del ternero con el piso. Es imprescindible mantener un ambiente limpio ya que el ternero es especialmente susceptible a la entrada o contaminación con patógenos durante las primeras horas de vida. Muchos pueden enfermar y morir a causa de infecciones por bacterias y virus que contraen en el área de maternidad.

Una vez terminado el parto se debe dejar que la madre limpie al ternero de forma natural. Este proceso no solamente sirve para la limpieza del líquido amniótico, sino para estimular, mediante masajes, la circulación sanguínea periférica y la respiración del ternero.

Ante la incorporación del neonato, es fundamental que este sea retirado inmediatamente del pie de la madre para evitar el consumo de calostro.

Acondicionamiento del ternero neonato

El TPC debe ser ubicado en un lugar limpio y seco si es posible con piso de paja de al menos 10 cm de espesor y continuar con el proceso de secado utilizando, esta vez, toallas limpias y secas. El ternero no debe ser expuesto a bajas temperaturas durante las primeras 48 h de vida, dado a que son muy susceptibles a sufrir hipotermias dentro de este período de vida. En estos casos es recomendable colocarles una capa sobre el lomo para ayudar a mantener su temperatura corporal (foto 2).



Foto 1. Ternero posparto siendo secado por su madre.



Foto 2. Ternero con capa para conservar la temperatura corporal.

Examen clínico

Se debe realizar la inspección clínica objetiva del neonato para detectar posibles afecciones que puedan prevenirse. Tenemos que tener en cuenta que el TPC es muy susceptible a contraer enfermedades que pueden desencadenar la muerte de este en cuestión de horas.

Los parámetros fisiológicos normales de un ternero recién nacido son:

- Temperatura Rectal: 38,5 a 39,5 °C.
- Frecuencia Respiratoria (inhalación + exhalación): 20-40 respiraciones por min.
- Frecuencia Cardíaca: 72-100 latidos por min.

Desinfección del cordón umbilical

Es importante realizar una rápida desinfección del cordón umbilical con alcohol yodado al 20 % para evitar la entrada de patógenos. Para este procedimiento se debe sumergir el fragmento de cordón en un frasco de boca ancha conteniendo la solución desinfectante durante mínimo 30 segundos al menos dos veces por día hasta que se observe deshidratación de este (foto 3). La incorrecta desinfección del ombligo predispone a la formación de artritis séptica o poliartitis teniendo un pronóstico reservado con altos índice de mortalidad. Según reportes de Grupo de Sanidad Animal del INTA EEA Mercedes, Corrientes (Draghi, M.G. y col., 2006) solo en el noroeste de la Argentina se registra que el 4,9 % de las causas de mortandad de terneros es debido a onfalitis.



Foto 3. Cordón umbilical de un ternero bien desinfectado y deshidratado.

Tratamientos preventivos de infecciones en el TPC

Antibioticoterapia

Se debe realizar tratamiento con dos antibióticos (ATB) de amplio espectro como preventivo ante infecciones bacterianas. La administración de la primera dosis de antibióticos debería ser dentro de las primeras horas después del nacimiento para que la quimioterapia comience su actividad lo antes posible. El tratamiento consiste en Cefalosporina de última generación, Ceftiofur Sódico, administrada de forma intramuscular profunda y un aminoglucósido, Gentamicina Sulfato, administrado de forma endovenosa. Para el Ceftiofur Sódico se prepara una dosis de 6 miligramos por kilo de peso vivo que se aplica una vez por día durante los primeros 10 días de vida del animal. La Gentamicina Sulfato se administra durante los primeros 5 días de vida cada 24 horas utilizando una dosis de 8 miligramos por kilo de peso (tabla1). La gentamicina no puede ser aplicada por más de 5 días consecutivos debido a su efecto nefrotóxico. En caso de observar alteraciones en la orina (hematuria, hemoglobinuria) de los terneros suspender inmediatamente el tratamiento con este antibiótico.

Mediante el examen periódico de los terneros hay que tener en consideración sustituir el antibiótico, previo antibiograma, ante el caso de una posible infección bacteriana que no responda a los antibióticos utilizados como preventivos.

Luego de los diez días de vida se suspende por completo el tratamiento preventivo con antibióticos utilizando los mismos solamente para un posible tratamiento terapéutico.



Vitaminas

Junto con el protocolo de antibioticoterapia se debe suministrar un complejo vitamínico de forma parenteral. Se aplica 1 mililitro por ternero vía subcutánea de complejo vitamínico que contenga: Vitamina A 500.000 U.I., Vitamina D3 75.000 U.I. y Vitamina E 50 mg. Es recomendado repetir esta dosis cada 30 días.

	Antibióticos		Vitaminas
	Ceftiofur	Gentamicina	
Día 1	6 mg / Kg. IM	8 mg / Kg. EV	1 ml (según fórmula)
Día 2	6 mg / Kg. IM	8 mg / Kg. EV	
Día 3	6 mg / Kg. IM	8 mg / Kg. EV	
Día 4	6 mg / Kg. IM	8 mg / Kg. EV	
Día 5	6 mg / Kg. IM	8 mg / Kg. EV	
Día 6	6 mg / Kg. IM		
Día 7	6 mg / Kg. IM		
Día 8	6 mg / Kg. IM		
Día 9	6 mg / Kg. IM		
Día 10	6 mg / Kg. IM		
Día 30			1 ml (según fórmula)

Tabla 1. Protocolo de antibiótico-terapia y vitaminas para suministrar por vía parenteral.

Mantenimiento del TPC

Alimentación

La correcta alimentación es muy importante en la vida de un neonato y más aún en un pre-rumiante ya que el desarrollo ruminal es uno de los procesos más importantes en la vida de un bovino y está altamente relacionado con factores nutricionales. La alimentación líquida de bovinos pre-rumiantes es la fuente de nutrientes más importante hasta que la dieta sólida sea del 1 % del peso corporal, esto hace que el desarrollo del abomaso e intestino delgado tome lugar en las primeras semanas de vida. El comienzo temprano de la estimulación al consumo de dietas sólidas con altos contenido proteico promueve la formación de ácido butírico y el correcto desarrollo ruminal, por esto es que en este trabajo se complementó la dieta líquida con balanceado al partir del segundo día de vida.

También se debe proveer agua potable ad libitum. El consumo abundante de agua potable promueve la ingesta de alimento concentrado más allá de obtener una buena hidratación, lo cual será ventajoso en caso de contraer alguna enfermedad diarreica. El protocolo de alimentación focaliza en el mantenimiento de los animales y no en su ganancia de peso; no obstante, en el transcurso de la puesta a punto del modelo los terneros tuvieron una ganancia de peso constante.

El protocolo de alimentación se basa en la administración de sustituto lácteo (SL) utilizando mamaderas correctamente higienizadas y desinfectadas con lavandina diluida en agua (5 gotas de hipoclorito de sodio por cada litro de agua, sumergir los elementos durante un mínimo período de 20 minutos, luego enjuagar con abundante agua). Los terneros reciben aproximadamente el 10 % (entre 4 y 4,5 l) de su peso vivo al nacimiento de SL por día. El volumen se divide en dos tomas de aproximadamente 2 l cada una. Administrando 4 l diarios nos aseguramos que el ternero consuma aproximadamente 1,6 Mcal de energía metabolizable por kg de materia seca por día solamente por el SL. Teniendo en cuenta que el objetivo de este protocolo es obtener TPC clínicamente sanos e inmunocompetentes es necesario utilizar, en los protocolos de alimentación, productos de incluyan en su formulación componentes de buena calidad y en concentraciones adecuadas. Se requiere de un SL que

contenga aproximadamente un 80 % de proteína cruda de origen lácteo.

El principal objetivo a la hora de administrar el SL es garantizar el correcto cierre de la gotera esofágica (GE). Para lograr esto es necesario tener en cuenta algunos factores que estimulan el funcionamiento de esta y hacen que el SL vaya directo al abomaso donde se formará la correcta coagulación y la formación de paracaseinato de calcio.

Los factores que garantizan el cierre de la GE son:

Temperatura: La temperatura de toma ideal es de 38-39 °C. Todos los días debe administrarse el SL a la misma temperatura.



Foto 4. Instalaciones para calentar el agua necesaria para diluir el SL y mamaderas utilizadas.

Horario: la rutina es esencial para el estímulo del correcto cerrado de la GE, hay que respetar el mismo horario todos los días y realizar el mismo procedimiento de alimentación. De este modo se logra que el ternero ya esté preparado y anticipando la toma de SL. Sugerimos incluir factores a la rutina de alimentación, como por ejemplo, programar una radio dentro de la sala de crianza que se encienda a la misma hora todos los días 1 h antes de la administración del SL.

Administración del SL: Como mencionamos anteriormente, se utilizaron mamaderas con tetinas correctamente higienizadas y desinfectadas¹, el reflejo de succión utilizando tetinas es un elemento más que complementa el estímulo para el cerrado de la GE.



lizaron mamaderas con tetinas correctamente higienizadas y desinfectadas¹, el reflejo de succión utilizando tetinas es un elemento más que complementa el estímulo para el cerrado de la GE.

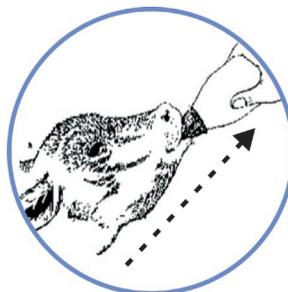


Figura 1. Inclinación recomendada para la administración del SL en los terneros.

¹ Higienización y desinfección de elementos para la alimentación del ternero.

La posición del ternero a la hora de toma el SL tiene que ser de pie y con la cabeza y el cuello aproximadamente a 45° (figura 1); un signo claro que nos indica que se ha cerrado la GE es la elevación de la base de la cola y el movimiento de esta mientras consume el SL.

Es importante retirar los baldes de agua de las instalaciones hasta pasada las 2 h luego de la administración del SL para permitir que el coágulo formado en el abomaso sea lentamente digerido por el ácido clorhídrico y que los hidratos de carbono se asimilen rápidamente. Una vez transcurrido el tiempo indicado luego del consumo de SL hay que ofrecer agua potable *ad libitum*, la formación del líquido ruminal que estimula el desarrollo de este tiene como componente principal el agua, haciendo esencial el consumo de esta. A su vez, un ternero bien hidratado² probablemente tenga un mejor pronóstico ante un posible cuadro de diarrea.

A partir del segundo día se debe ofrecer alimento balanceado con un 18 % de contenido proteico para favorecer el crecimiento la población microbiana necesaria para el desarrollo ruminal.

En la siguiente tabla se detalla el protocolo de alimentación del TPC y la energía metabolizable ofrecida por día:

	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5
Balanceado (gr / día)	200	400	800	1000	1000
Agua	ad libitum				
SL (2veces por día)	2 L	2 L	1 L	1 L	-
Kcal (EM) Balanceado	560	1120	2240	2800	2800
x día SL	1600	1600	800	800	
Total	2160	2720	3040	3600	2800

Tabla 2. Protocolo de alimentación utilizado para el protocolo de crianza de terneros privados de calostro. SL: sustituto lácteo. Kcal: kilo calorías. EM: Energía metabolizable.

El desleche se debe realizar de forma gradual entre la 4.a y 5.a semana de vida. La administración de una sola toma de SL por día estimula el consumo de alimento balanceado y cuando los terneros consumen aproximadamente 1 kg por día durante 3 días consecutivos se debe eliminar el consumo de SL (tabla 2).

El protocolo de alimentación y desleche descrito en esta guía nos permitió obtener 15 terneros clínicamente sanos e inmunológicamente competentes de 50 días de vida consumiendo solamente alimento balanceado y agua, una dieta libre de componentes inmunológicos. Los valores de ganancia de peso diario obtenidos (0,476 kg/día) (figura 2) resultaron similares a los reportados por otros autores (Williams, D. R. y col., 2014), donde se observó la evolución de 275 terneros Holstein de 39,4 kg en promedio de peso al nacer y 57 kg de peso en promedio a los 60 días de vida, (ganancia de peso diaria de 0,405 kg) alimentados con sustituto lácteo y balanceado arranque con maíz quebrado, similar a la dieta utilizada en el protocolo presentado en este manual (Aly, S.S. y col., 2013).

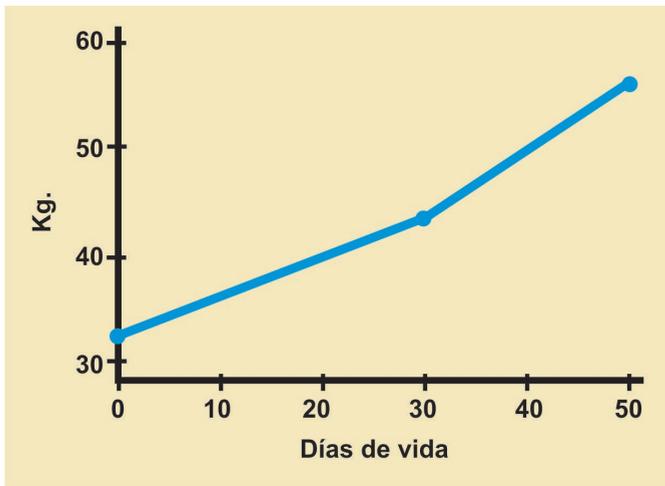


Figura 2. Ganancia de peso de los terneros alimentados mediante el protocolo de alimentación descrito.

CAPITULO 4

Instalaciones



Boxes de bioseguridad nivel 2 del CICVyA del INTA, CNIA Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Las instalaciones para alojar a TPC deben ser de fácil limpieza ya que la desinfección del ambiente juega un papel crucial en la sobrevivencia de estos. En nuestra práctica y a modo de ejemplo para la crianza de los TPC se acondicionó una sala de 42 m² ubicada dentro del box con nivel de bioseguridad 2 (NBS 2) instalado en el Centro de Investigaciones Ciencias Veterinarias (CICV) del INTA, CNIA Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Esta sala se utilizó como “sala de crianza”. Es importante aclarar que se utilizó esta sala solamente por cuestiones de bioseguridad ya que los TPC fueron utilizados como modelo para ensayos en infecciones experimentales. No obstante, hay que tener en cuenta que la sala debe ser preparada para poder asistir a los animales hasta los primeros 50 días de vida. La desinfección debe realizarse tres veces por semana utilizando de forma alternada amonio cuaternario, hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio.

La temperatura ambiental debe mantenerse dentro del rango de los 15-22 °C. La ubicación de los terneros debe ser, desde el primer día hasta los 10 días de vida, en corrales especialmente diseñados de 3 m² cada uno y utilizando un piso aislante de plástico para grandes animales (foto 5). Una vez transcurrido este período deben retirarse las jaulas para que los terneros queden sueltos en la sala (fotos 6 y 7).

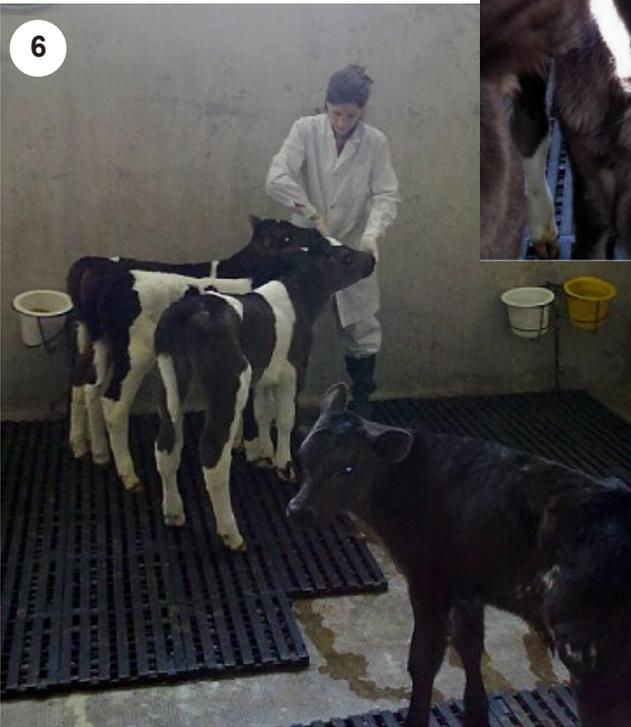


5

Foto 5. Jaulas diseñadas para alojar a los terneros hasta los 10 días de vida.



7



6

Foto 6, 7, 8 y 9. Terneros de más de 10 días de vida sueltos en la sala de crianza.

Sugerimos el uso de un sistema de corral individual hasta el día 10 de vida y luego pasar a un sistema colectivo hasta el día 50 de vida.

Teniendo en cuenta las instalaciones utilizadas para la crianza de un TPC es importante enfocarse en el principal objetivo que es mantener el ambiente (jaulas, pisos aislantes, baldes y sala) limpio, seco y desinfectado.



Bienestar animal

Los terneros alojados en la sala de crianza deben tener un riguroso control orientado al manejo del estrés que podrían sufrir debido a su empleo como animal de experimentación. Se debe seguir la normativa de bienestar animal utilizando la menor cantidad de alternativas para el manejo del dolor. Todos los procedimientos realizados en este trabajo son avalados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CI-CUAE) del CICVyA de INTA CNIA.

Dentro de las salas de crianza se trabaja bajo “el principio de las cinco libertades”:

- Ausencia de hambre y sed.
- Ausencia de incomodidad física y térmica.
- Ausencia de dolor, enfermedades y lesiones.
- Posibilidad de mostrar una conducta normal.
- Ausencia de miedo y distrés.

Para asegurar el cumplimiento de estos principios se establece un protocolo de alimentación descrito en el capítulo 3 y bebederos que aseguraban el consumo *ad libitum* de agua, el control de la temperatura ambiental mediante estufas y ventiladores, la prevención de enfermedades mediante la correcta aplicación de antibióticos y desinfección del ombligo, el uso de tetinas para mimetizar la alimentación natural, el estricto seguimiento mediante un examen clínico periódico en busca de afecciones y con la importancia de generar una familiarización entre el animal y el investigador para reducir el estrés.

La crianza de TPC para ser utilizados como modelo de infección requiere instalaciones que muchas veces no son las ideales para ofrecer un ambiente confortable para este tipo de animales. No obstante, es necesario que el ambiente elegido sea limpio, seco y ventilado. La implementación de

elementos de distracción es una buena herramienta para la reducir el estrés que puedan sufrir los animales. Sugerimos colocar objetos colgados de las jaulas y bidones sueltos en la sala (foto 10).



Foto 10. Pendiente logrado con un sachet de solución fisiológica y una venda cambric para generar distracciones y reducir el estrés.

Parámetros hematológicos

La determinación de parámetros hematológicos tiene como objetivo comparar los valores normales para la edad y especie citados en la bibliografía con los obtenidos en los TPC bajo el protocolo de crianza aquí descrito. Por un lado, también es importante establecer los valores normales para este protocolo, en especial, dado que la crianza de terneros sin consumo de calostro puede llevar a cambios en alguno de los parámetros normales de la edad y de la especie sin que esto afecte las variables del modelo. Por otro lado, la obtención de TPC que posean parámetros hematológicos y fisiológicos similares entre sí permite en cierta forma normalizar el modelo y obtener así mejores resultados en los ensayos que incluyan la utilización de los TPC.

Los valores de la serie roja deben mantenerse siempre dentro de los parámetros normales descritos en la tabla “datos hematológicos”. Normalmente se suele observar un aumento en el hematocrito a partir de los 30 días de vida. Se ha descrito que este aumento es debido a un incremento en el

		Día	X	SD	IC±95%		WS	Sign.
Eritrocitos	gr x 10 ⁶ / μl	0	9,7	1,3	9,0	10,4	0,975	ns
		30	9,8	2,0	8,7	10,9	0,938	ns
		50	9,4	1,9	8,3	10,4	0,919	ns
Hematocrito	%	0	36,1	1,7	35,1	37,0	0,899	ns
		30	37,7	2,4	36,4	39,1	0,922	*
		50	39,2	2,0	38,1	40,3	0,906	ns
Hemoglobina	g / dl	0	10,9	1,4	10,1	11,7	0,898	ns
		30	11,4	1,2	10,8	12,1	0,884	ns
		50	11,7	1,2	11,1	12,4	0,929	ns
V.C.M.	fL	0	37,5	3,6	35,5	39,5	0,986	ns
		30	40,5	9,9	35,0	45,9	0,951	ns
		50	43,9	11,3	37,6	50,1	0,831*	ns
H.C.M.	pg	0	11,3	1,6	10,4	12,2	0,955	ns
		30	12,2	2,9	10,6	13,8	0,925	ns
		50	12,9	2,5	11,6	14,3	0,939	ns

C.H.C.M.	g / dl	0	30,3	4,6	27,8	32,8	0,937	ns
		30	30,4	3,7	28,3	32,5	0,952	ns
		50	30,0	3,9	27,9	32,2	0,963	ns
Leucocitos	p/mm3 x mil	0	9,0	2,7	7,5	10,5	0,944	ns
		30	8,7	2,1	7,6	9,9	0,933	ns
		50	9,2	2,7	7,7	10,7	0,888	ns
Linfocitos	p/mm3 x mil	0	5,8	1,9	4,8	6,8	0,882	ns
		30	5,2	1,2	4,5	5,9	0,892	ns
		50	5,2	2,1	4,1	6,4	0,921	ns
Eosinófilos	p/mm3 x mil	0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,903	ns
		30	0,2	0,1	0,1	0,2	0,954	ns
		50	0,2	0,1	0,2	0,3	0,913	ns
Basófilos	p/mm3 x mil	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,958	ns
		30	0,1	0,0	0,0	0,1	0,941	ns
		50	0,1	0,1	0,1	0,1	0,961	ns
N. seg.	p/mm3 x mil	0	2,0	0,8	1,6	2,5	0,946	ns
		30	2,6	1,0	2,1	3,2	0,896	ns
		50	2,1	0,8	1,6	2,5	0,905	ns
Monocitos	p/mm3 x mil	0	0,7	0,4	0,5	1,0	0,945	ns
		30	0,5	0,4	0,3	0,7	0,916	ns
		50	0,4	0,3	0,3	0,6	0,952	ns
P tot.	g / dl	0	3,7	0,5	3,4	3,9	0,933	*
		30	5,6	0,8	5,1	6,0	0,959	*
		50	5,8	0,7	5,5	6,2	0,933	ns
TP	seg	0	27,1	1,8	26,1	28,1	0,905	ns
		30	27,5	1,3	26,8	28,2	0,903	ns
		50	27,3	1,7	26,3	28,2	0,964	ns

Tabla 3. Datos hematológicos de 15 terneros privados de calostro determinados a los días 0, 30 y 50 de vida. X: promedio, SD: desvió estándar, IC±95 %: intervalo de confianza, WS: valor del test de Wilk-Shapiro, ns: no significativo. (*) Estadísticamente significativo. VCM: volumen corpuscular medio. HCM: hemoglobina corpuscular media. CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media. P tot: proteínas totales. TP: tiempo de protrombina².

² Tiempo de protrombina

Nuestro objetivo consistió en el desarrollo de un modelo animal utilizando TPC tuvo como propósito evaluar la patogenia del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y la eficacia de diferentes vacunas destinadas al uso en bovinos. Dentro de los ensayos comparativos de patogenia que se realizaron con el modelo se tuvieron en cuenta algunos aspectos relacionados con la hemostasia en los terneros, ya que se han descrito ciertas coagulopatías en infecciones con el VDVB. Es por esto que se determinó el tiempo de protrombina en los terneros sanos previo a la infección experimental con dicho virus y se establecieron los valores normales de este parámetro en condiciones de crianza bajo el protocolo descrito. Es importante realizar este tipo de determinaciones en parámetros específicos previo a los tratamientos que se realicen en el modelo animal.

tamaño de los eritrocitos, este cambio coincide con un crecimiento moderado del V.C.M (Coppo, J., 2006). Existe una correlación significativa entre la concentración de proteínas e inmunoglobulinas séricas postcalostrales. Una concentración de proteínas totales en plasma por debajo de 5 g/dl dentro de las primeras 24 h de vida en un ternero es debido a la falta de consumo de calostro (Donovan, G. A. y col., 1998). A los 50 días de vida los TPC deben tener una concentración de proteínas plasmáticas ligeramente inferior a los bovinos adultos, pero en el rango de los reportados para terneros de 6 a 12 meses de edad de la raza Holando Argentina (5 a 6,6 g/dl) (Edmonds, C. H. y col., 1975). A continuación se detalla la tabla 3 con los valores hematológicos determinados en 15 animales bajo el protocolo de crianza descripto.

Evaluación de la respuesta inmune del modelo de TPC

El sistema inmune de todos los mamíferos comienza a desarrollarse en etapas tempranas de la gestación. El feto es inmunocompetente a múltiples antígenos, siendo capaz de desarrollar respuestas basadas en anticuerpos (Acs) específicos (Baintner, K., 2007; Barrington, G. y col., 2001; Brandtzaeg, P., 2003). En terneros el timo puede evidenciarse tempranamente hacia los días 27-30 de la gestación. El desarrollo y diferenciación de los timocitos ocurren durante la gestación. Las células B, por otro lado, se desarrollan en la médula ósea. A lo largo de la gestación aumenta el número de linfocitos circulantes, la mayoría de los cuales son linfocitos T (Cortese, V. S., 2009). Se considera que el sistema inmune del neonato está completamente desarrollado, aunque inmaduro. Esto significa que no ha sido aún estimulado inicialmente (“primado”) por los distintos antígenos involucrados en el ambiente. Se cree que el período neonatal es crítico con respecto al reconocimiento de patógenos. En cada caso, el desbalance de la respuesta inmune conduciría a una infección, o bien al desarrollo de una alergia alimentaria, respiratoria o de diversa índole, dado que la barrera epitelial y la red inmunoregulatoria están aún poco desarrolladas. En el caso particular de la mucosa intestinal del adulto, esta contiene más del 80 % de las células B activadas (finalmente diferenciadas en plasmocitos). Por ello, esta mucosa es, con gran diferencia, el mayor órgano productor de anticuerpos (Cortese, V. S., 2009; Brandtzaeg, P., 2003).

En los bovinos no existe transferencia transplacentaria de anticuerpos, por lo que los terneros neonatos nacen agammablobulinémicos. Por ello, dependen de modo crítico de la transferencia pasiva de anticuerpos y otras moléculas bioactivas por parte de sus madres a través del calostro. El ternero presenta una permeabilidad intestinal inusualmente elevada durante las primeras horas de vida fundamentalmente basada en procesos de pinocitosis de las macromoléculas. Este fenómeno le permite absorber y transferir con mejor eficiencia los componentes nutricionales presentes en el calostro a través de las células epiteliales y hacia la linfa desde la cual entrarán luego en sangre vía el conducto torácico. El pico de absorción ocurre en las primeras 4 h de vida y alrededor de las 48 h de vida ya se habrá producido la denominada “clausura intestinal”, poniéndole fin a este proceso (Weaver, D.

y col., 2000). Por lo tanto, el recién nacido depende en gran medida de la transferencia de Ac maternos presentes en el calostro (inmunidad pasiva) para protegerse frente a los agentes infecciosos presentes en el medio tales como virus y bacterias (Cortese, V. S., 2009; Fernandez, F., 1998; Parreño, V. y col., 2004; Barrington, G. y col., 2001).

Los anticuerpos IgG 1 son activamente transportados desde la sangre de la madre gestante hacia las secreciones de la glándula mamaria antes del nacimiento del ternero y en los primeros días luego de ocurrido este. El desarrollo de una respuesta activa por parte del sistema inmune del ternero es sumamente importante, especialmente en relación con la generación de una memoria inmunológica que prevenga contra futuras infecciones.

El TPC tiene la gran desventaja de no contar con la inmunidad pasiva transferida por la madre a través del calostro por lo que su sobrevivencia depende del éxito de su respuesta activa contra agentes del medioambiente donde se encuentra. Es por estas características del modelo animal desarrollado que es muy importante disminuir la carga microbiológica presente en el ambiente utilizando desinfectante. La acción microbicida de los antibióticos administrados pueden conferir en cierto grado de protección solamente ante patógenos sensibles a estos (figura 2).

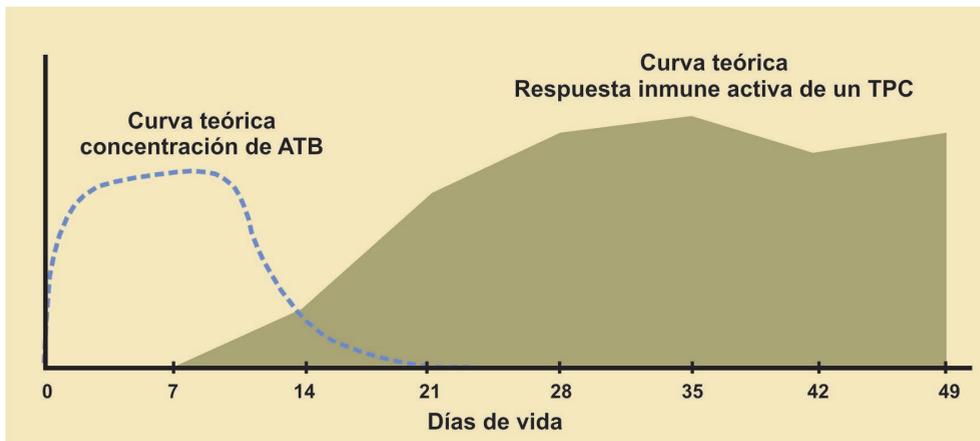


Figura 2. Curva teórica de concentración de ATB y respuesta inmune activa de los TPC.

Está ampliamente demostrado que los terneros son capaces de presentar una respuesta inmune ante la inmunización con múltiples antígenos a temprana edad. Trabajos previos han demostrado la capacidad de los TPC de responder ante la vacunación con *Pasteurella hemolítica* A1 a las 2 semanas

de vida presentando una fuerte respuesta de IgM a la semana postvacunación y de anticuerpos neutralizantes a los 15 días postvacunación (Hodgins, D. C. y col., 2000). Otros autores expusieron resultados de la presentación de una respuesta inmune ante la inmunización a los 3 días de vida contra una vacuna multivalente oral; los TPC estuvieron protegidos ante el desafío con BVDV, PI-3, HVB-1 y BRSV presentando títulos de anticuerpos neutralizantes a las tres semanas postvacunación (Xue, W. y col., 2010).

En nuestro caso, el modelo animal descrito en este manual fue desarrollado para evaluar la acción protectora de vacunas contra el VDVB, entre otros propósitos. Se evaluó la capacidad de los TPC de presentar una respuesta humoral ante la inmunización con una vacuna inactivada experimental del VDVB. Dos TPC fueron inmunizados a los 15 y 35 días de vida con una vacuna formulada con dos cepas del VDVB (VDVB 1b y VDVB 2) y un adyuvante acuoso nanoparticulado (Mansilla, F. C. y col., 2013). Evaluamos la inducción de anticuerpos neutralizantes contra cada cepa y el perfil de isotipos presentados ante la vacunación (figuras 3 y 4). Observamos una respuesta activa frente ambas cepas virales lo que demuestra la capacidad de los TPC de responder ante la inmunización con este virus a temprana edad.

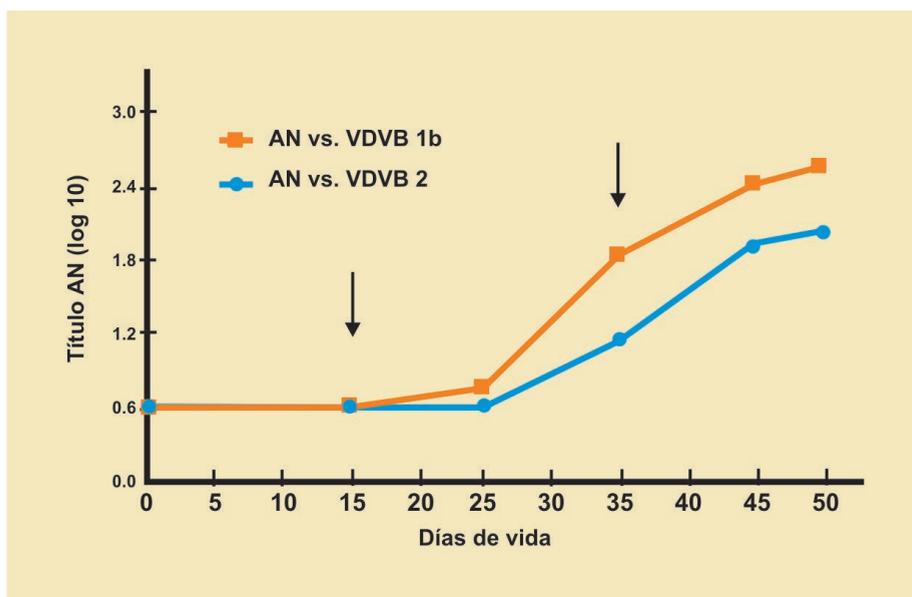


Figura 3. Curva de anticuerpos neutralizantes de los dos terneros inmunizados con la vacuna patrón. Las flechas indican el día de vacunación. AN: anticuerpos neutralizantes.

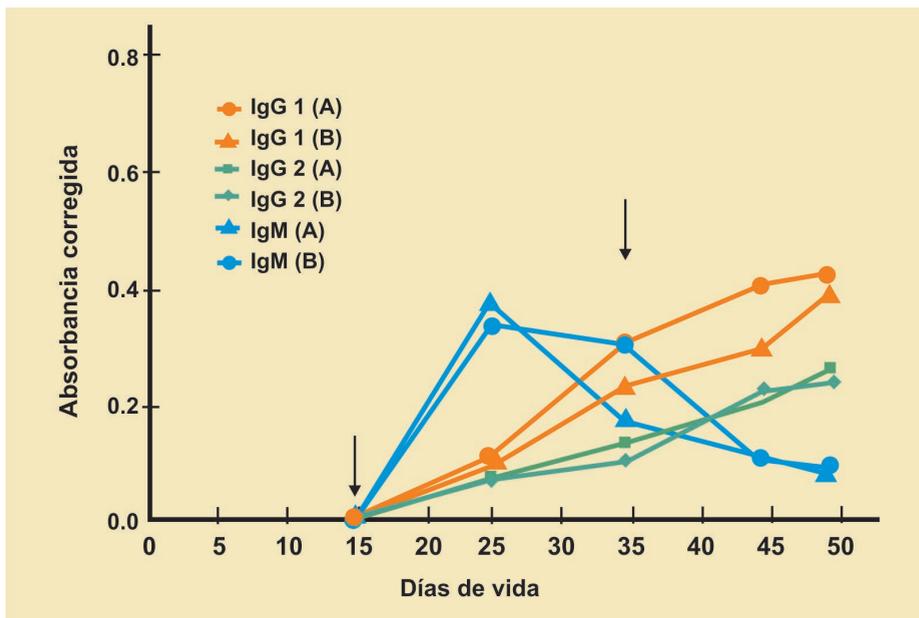


Figura 4. Curva de isotipos de los dos terneros inmunizados con la vacuna patrón. Las flechas indican el día de vacunación. (A) ternero A, (B) ternero B. TPC: ternero privado de calostro.

En un segundo ensayo se evaluó la capacidad de proliferación de células mononucleares de sangre periférica ante un mitógeno. Para este propósito se comparó esta respuesta proliferativa de linfocitos obtenidos de 2 TPC de 1 mes de vida, 2 terneros calostrados de 1 mes de vida y dos terneros calostrados de 8 meses. Notamos que no hubo diferencias significativas entre los animales evaluados, todos los terneros más allá de la edad o condición ante el consumo de calostro presentaron índices de linfoproliferación similares entre sí (figura 5).

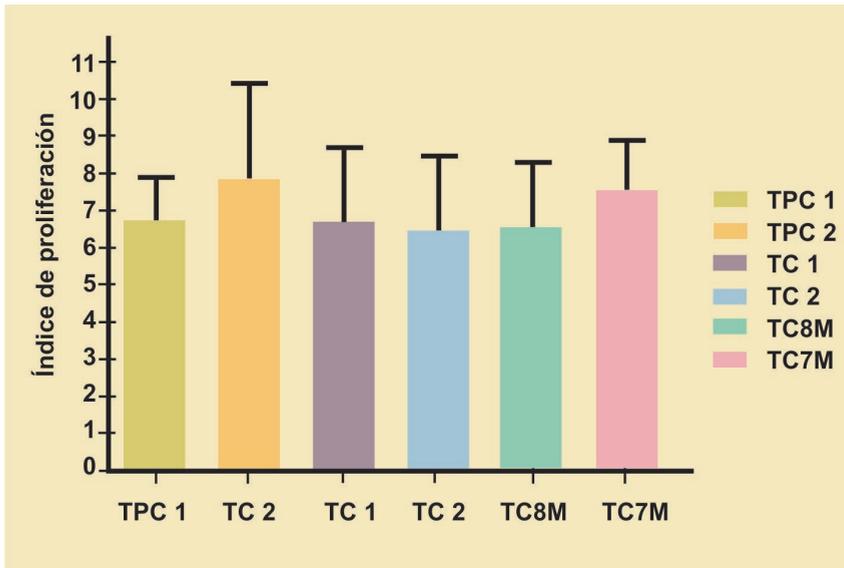


Figura 5. Índice de proliferación de células mononucleares de sangre periférica de terneros privados de calostro luego de 72 h de estimulación con Concavalina A. TPC: ternero privado de calostro, TC: ternero calostrado, TC8M: ternero calostrado de 8 meses, TC7M: ternero calostrado de 7 meses.

Concluimos que los TPC empleados en este trabajo fueron capaces de desarrollar una respuesta humoral de similar magnitud que animales adultos o terneros calostrados con títulos de AN contra VDVB al día 15 post-revacunación suficientes para proteger ante un desafío viral (Pecora, A. y col., 2012; Pecora, A., Malacari D. A. y col., 2014) . Los resultados obtenidos sumados a otros estudios de inmunización realizados en TPC (Nonnecke, B. J. y col., 2012; Xue, W. y col., 2010) indican que el modelo sería adecuado para poder realizar pruebas de eficacia de vacunas.

Bibliografía

- Hernández, D.S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas, *Biomedicina*, vol. 2, n.o 3, pp. 252–256, 2006.
- Griffin, J.F., Mackintosh, C.G.; Buchan, G.S. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines, *Trends Microbiol.*, vol. 3, n.o 11, pp. 418–24, nov. 1995.
- Herath, S.; Dobson, H.; Bryant, C.E.; Sheldon, I.M. “Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity,” vol. 69, pp. 13–22, 2006.
- Lee, C.M.; Boileau, A.C.; Boileau, T.W.M.; Williams, A.W.; Swanson, K.S.; Heintz, K.A.; Erdman, J.W. *Nutritional Methodology — Review Review of Animal Models in Carotenoid Research 1, 2*, n.o August, pp. 2271–2277, 1999.
- Santos, R.L.; Zhang, S.; Tsohis, R.M.; Kingsley, R.A.; Adams, L.G.; Bäumlner, A.J. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever, *Microbes Infect.*, vol. 3, n.o 14–15, pp. 1335–44, 2001.
- Bailey, M.; Christoforidou, Z.; Lewis, M.C. The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants, *VetImmunol. Immunopathol.*, vol. 152, n.o 1–2, pp. 13–9, mar. 2013.
- Mattion, N.; König, G.; Seki, C.; Smitsaart, E.; Maradei, E.; Robiolo, B.; Duffy, S.; León, E.; Piccone, M.; Sadir, A.; Bottini, R.; Cosentino, B.; Falczuk, A.; Maresca, R.; Periolo, O.; Bellinzoni, R.; A. Espinoza, A.; La Torre, J.; Palma, E.L. Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease, *Vaccine*, vol. 22, n.o 31–32, pp. 4149–62, oct. 2004.
- Pecora, A.; Malacari, D.A.; Ridpath, J.F.; Aguirreburualde, M.S.P.; Combessies, G.; Odeón, A.C.; Romera, S.A.; Golemba, M.D.; Wigdorovitz, A. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina, *Res Vet Sci.*, vol. 96, n.o 1, pp. 204–12, 2014.
- Bucafusco, D.; Di Giacomo, S. Pega, J.; Juncos, M.S.; Schammas, J.M.; Pérez-Filgueira, M.; Capozzo, A.V. Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines, *Vaccine*, jun. 2014.
- Endsley, J.J.; Roth, J.A.; Ridpath, J.; Neill, J. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV, *Biologicals*, vol. 31, n.o 2, pp. 123–125, jun. 2003.
- Sadir, A.M.; Schudel, A.A.; Laporte, O.; Braun, M.; Margni, R.A. Response to foot-and-mouth disease vaccines in newborn calves. Influence of age, colostrum antibodies and adjuvants, *Epidemiol. Infect.*, vol. 100, n.o 1, pp. 135–44, feb. 1988.
- Reber, A.J.; Lockwood, A.; Hippen, A.R.; Hurley, D.J. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 109, n.o 1–2, pp. 139–50, enero, 2006.
- Williams, D.R.; Pithua, P.; Garcia, A.; Champagne, J.; Haines, D.M.; Aly, S.S. Effect of Three Colostrum Diets on Passive Transfer of Immunity and Preweaning Health in Calves on a California Dairy following Colostrum Management Trai-

- ning, *Vet. Med. Int.*, vol. 2014, p. 698741, enero, 2014.
- Aly, S.S; Pithua, P.; Champagne, J.D.; Haines, D.M. A randomized controlled trial on preweaning morbidity, growth and mortality in Holstein heifers fed a lacteal-derived colostrum replacer or pooled maternal colostrum, *Vet. Res.eterinary Res.*, vol. 9, n.o 1, p. 168, enero 2013.
- Coppo, J. Evolución de parámetros hemáticos de terneros media sangre cebú en crecimiento, *Agrotecnia*, vol. 16, 2006.
- G. a Donovan, G.A.; I. R. Dohoo, I.R.; D. M. Montgomery, D.M.; and F. L. Bennett, F.L. Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA, *Prev. Vet. Med.*, vol. 34, n.o 1, pp. 31–46, feb. 1998.
- Edmonds, C.H.; Mccmillan, M.K.; Hughes, D.A.; Milam, J.D. “Biochemical, hematologic, vol. 2, n.o 3, 1975.
- Baintner, K. Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 117, n.o 3–4, pp. 153–61, jun. 2007.
- Barrington, G.; Parish, S. Bovine neonatal immunology, *Vet Clin North Am Food Anim Pr.*, vol. 17, n.o 3, pp. 463–76, 2001.
- Brandtzaeg, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant, *Vaccine*, vol. 21, n.o 24, pp. 3382–3388, jul. 2003.
- Cortese, V.S. Neonatal immunology, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, vol. 25, n.o. 1, pp. 221–7, mar. 2009.
- Weaver, D.; Tyler, J.; VanMetre, D.; Hostetler, D.; Barrington, G. Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves, *J Vet Intern Med*, vol. 14, n.o. 6, pp. 569–77, 2000.
- Fernandez, F. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines, *Vaccine*, vol. 16, n.o. 5, pp. 507–516, mar. 1998.
- Parreño, V.; Béjar, C.; Vagnozzi, A.; Barrandeguy, M.; Costantini, V.; Craig, M.I.; Yuan, L.; Hodgins, D.; Saif, L.; Fernández, F. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 100, n.o 1–2, pp. 7–24, jul. 2004.
- Hodgins, D.C.; Shewen, P.E. Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves against *Pasteurella haemolytica* A1, *Can. J. Vet. Res.*, vol. 64, n.o. 1, pp. 3–8, enero 2000.
- Xue, W.; Ellis, J.; Mattick, D.; Smith, L.; Brady, R.; Trigo, E. “Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 , infectious bovine rhinotracheitis virus , bovine parainfluenza-3 virus , and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young cal,” *Vaccine*, vol. 28, no. 22, pp. 3784–3792, 2010.
- Mansilla, F.C.; Czepluch, W.; Malacari, D.A.; Hecker, Y.P; Bucafusco, D.; Franco-Mahecha, O.L.; Moore, D.P.; Capozzo, A.V. Dose-dependent immunogenicity of a soluble *Neospora caninum* tachyzoite-extract vaccine formulated with a soy lecithin/ β -glucan adjuvant in cattle, *Vet. Parasitol.*, vol. 197, n.o. 1–2, pp. 13–21, oct. 2013.

- Pecora, A.; Aguirreburualde, M.S.P.; Aguirreburualde, A.; Leunda, M.R.; Odeon, A.; Chiavenna, S.; Bochoeyer, D.; Spitteler, M.; Filippi, J.L.; Dus Santos, M.J.; Levy, S.M.; Wigdorovitz, A. Safety and efficacy of an E2 glycoprotein subunit vaccine produced in mammalian cells to prevent experimental infection with bovine viral diarrhoea virus in cattle, *Vet. Res. Commun.*, vol. 36, n.o 3, pp. 157–64, sep. 2012.
- Nonnecke, B.J.; Waters, W.R.; Goff, J.P.; Foote, M.R. Adaptive immunity in the colostrum-deprived calf: response to early vaccination with *Mycobacterium bovis* strain bacille Calmette Guerin and ovalbumin, *J. Dairy Sci.*, vol. 95, n.o 1, pp. 221–39, Jan. 2012.
- Draghi M.G., Soni C.A., Beckwith B., Zurbriggen M. A, Homse A.C., Rochinotti D., Alcaraz E.L., Rizzi, C., Caspe, S.G., Ramírez J.C., Pereyra M., Biotti G.M. Principales causas de mortalidad perinatal en bovinos en el Nordeste Argentino. *Revista de Medicina Veterinaria* VOL. 87, N 4 , 2006.

Los modelos animales son de suma importancia para la obtención de conocimiento básico en distintos campos de la medicina veterinaria. El estudio de enfermedades causadas por agentes infecciosos requiere, en muchos casos de forma indispensable, de la utilización del hospedador natural como modelo de infección. Por todo esto, es importante recrear los signos involucrados en el curso de una afección causada por el agente infeccioso, ya que esto permite entender la patogenia del agente y cómo se relaciona con el hospedador natural. Para poder evaluar el comportamiento del sistema inmunológico del bovino ante infecciones o inmunizaciones experimentales, se requiere de animales libres de anticuerpos específicos o de memoria inmunológica contra el agente en estudio. La utilización de animales jóvenes sin vacunación tiene como desventaja la presencia de componentes inmunológicos adquiridos de la madre a través del calostro. La inmunidad calostrada, tanto humoral como celular, puede interferir en los estudios de inmunopagenia y modular la respuesta a la vacunación. Un punto importante es que en los bovinos, la inmunidad materna se transmite exclusivamente por el calostro; en consecuencia, un ternero que no consume calostro carece por completo de elementos inmunológicos maternos. Esto hace que el ternero privado de calostro (TPC) sea un modelo con características adecuadas para estudiar la respuesta inmunológica del bovino ante infecciones o inmunizaciones experimentales.

Este Manual está dirigido al personal involucrado en la utilización de terneros privados de calostro como modelo con fines científicos. El mismo contiene indicaciones sobre nutrición, plan sanitario y manejo de TPC desde el nacimiento hasta su empleo como modelo animal en estudios de inmunopatogenia y eficacia de vacunas.



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación