

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE

TEZĂ DE DOCTORAT

Doctorand,
IOANA MINEA (PIPIRIG)

Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. ELENA VELESCU

2021

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE

TEZĂ DE DOCTORAT

CONSIDERAȚII PRIVIND ROLUL STATUSULUI IMUN ÎN PREVENIREA BOLILOR INFECȚIOASE LA VIȚEI

Doctorand,
IOANA MINEA (PIPIRIG)

Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. ELENA VELESCU

2021

„ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES
AND VETERINARY MEDICINE OF IAȘI, ROMANIA
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD VETERINARY MEDICINE
SPECIALTY INFECTIOUS DISEASES

PhD THESIS

CONSIDERATIONS REGARDING THE ROLE OF IMMUNE STATUS IN THE PREVENTION OF INFECTIOUS DISEASES IN CALVES

PhD student,
IOANA MINEA (PIPIRIG)

PhD coordinator,
Prof. univ. dr. ELENA VELESCU

2021

CUPRINS

LISĂ ABREVIERI	9
INTRODUCERE	10
REZUMAT	14

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1 - SISTEMUL IMUN AL VIȚELOR NOU-NĂSCUȚI	23
1.1. Dezvoltarea sistemului imun	23
1.2. Transferul pasiv de imunoglobuline la vițelii nou-născuți	25
1.3. Factorii care influențează absorbția imunoglobulinelor la vițel	27
CAPITOLUL 2 - INFLUENȚA COLOSTRULUI ASUPRA STATUSULUI IMUN AL VIȚELOR NOU-NĂSCUȚI	31
2.1. Colostrogeneza	31
2.2. Compoziția imunologică a colostrului bovin	33
2.3. Factori care influențează calitatea imunologică a colostrului	36
2.4. Testarea calității colostrului în fermă	39
CAPITOLUL 3 - BOLILE INFECȚIOASE ALE VIȚELOR NOU-NĂSCUȚI	41
3.1. Diareea neonatală a vițelilor	41
3.2. Sindromul respirator bovin	45
CAPITOLUL 4 - ACTUALIZĂRI PRIVIND IMPORTANȚA STATUSULUI IMUN ÎN BOLILE NEONATALE LA VIȚEL	49

PARTEA II - CERCETĂRI PROPRII

CAPITOLUL 5 - SCOPUL, OBIECTIVELE ȘI CADRUL ORGANIZATORIC AL CERCETĂRILOR	52
CAPITOLUL 6 - INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE, CLINICE ȘI ANATOMOPATOLOGICE PRIVIND PREZENȚA ȘI PREVALENȚA INFECȚIILOR LA VIȚEL	54

6.1. Evaluarea condițiilor de creștere a vițelor	54
6.2. Anchetă epidemiologică	56
6.3. Aspecte anatomo-clinice	62
6.4. Concluzii parțiale	66
CAPITOLUL 7 - DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN BOLILE INFECȚIOASE LA VIȚEI	68
7.1. Materiale și metode	68
7.2. Rezultate și discuții	69
7.3. Concluzii parțiale	76
CAPITOLUL 8 - INFLUENȚA CONSUMULUI DE COLOSTRU ASUPRA PROTEINELOR SERICE TOTALE LA VIȚEII NOU-NĂSCUȚI	77
8.1. Materiale și metode	77
8.2. Rezultate și discuții	78
8.3. Concluzii parțiale	87
CAPITOLUL 9 - INFLUENȚA CONSUMULUI DE COLOSTRU ASUPRA LACTOFERINEI SERICE LA VIȚEII NOU-NĂSCUȚI	89
9.1. Materiale și metode	90
9.2. Rezultate și discuții	94
9.3. Concluzii parțiale	101
CAPITOLUL 10 - INFLUENȚA CONSUMULUI DE COLOSTRU ASUPRA HAPTOGLOBINEI SERICE LA VIȚEII NOU-NĂSCUȚI	102
10.1. Materiale și metode	103
10.2. Rezultate și discuții	107
10.3. Concluzii parțiale	110
CAPITOLUL 11 - INVESTIGAȚII PRIVIND RĂSPUNSUL IMUN AL VIȚEILOR ÎN URMA APLICĂRII UNEI SCHEME DE IMUNIZARE ACTIVĂ	111
11.1. Materiale și metode de cercetare	111
11.2. Rezultate și discuții	121

11.5. Concluzii parțiale	131
CAPITOLUL 12 - CERCETĂRI PRIVIND MANAGEMENTUL COLOSTRULUI ȘI EVALUAREA TRANSFERULUI PASIV IMUN ÎN FERME DE VACI DE LAPTE	132
12.1. Materiale și metode	133
12.2. Rezultate și discuții	136
12.3. Concluzii parțiale	145
CAPITOLUL 13 - CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI	146
BIBLIOGRAFIE	152
LISTA DE FIGURI	170
LISTA DE TABELE	173
LISTA DE LUCRĂRI	174

CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
ABSTRACT	14

PART I - CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CHAPTER 1 - THE IMMUNE SYSTEM OF NEWBORN CALVES	23
1.1. Development of the immune system	23
1.2. Passive immunoglobulin transfer in newborn calves	25
1.3. Factors influencing the absorption of immunoglobulins in calves	27
CHAPTER 2 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM ON THE IMMUNE STATUS OF NEWBORN LIVES	31
2.1. Colostrogenesis	31
2.2. Immunological composition of bovine colostrum	33
2.3. Factors influencing the immunological quality of colostrum	36
2.4. Colostrum quality testing on the farm	39
CHAPTER 3 - INFECTIOUS DISEASES OF NEWBORN CALVES	41
3.1. Neonatal calf diarrhea	41
3.2. Bovine respiratory syndrome	45
CHAPTER 4 - UPDATES ON THE IMPORTANCE OF IMMUNE STATUS IN NEONATAL CALF DISEASES	49

PART II - PERSONAL CONTRIBUTIONS

CHAPTER 5 - PhD THESIS AIM, OBJECTIVES AND ORGANIZATIONAL FRAMEWORK OF THE RESEARCHES	52
CHAPTER 6 - EPIDEMIOLOGICAL, CLINICAL AND ANATOMOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING THE PRESENCE AND PREVALENCE OF INFECTIOUS DISEASES IN CALVES	54

6.1. Assessment of calf rearing conditions	54
6.2. Epidemiological inquiry	56
6.3. Anatomical-clinical aspects	62
6.4. Partial conclusions	66
CHAPTER 7 - LABORATORY DIAGNOSIS IN INFECTIOUS DISEASES IN CALVES	68
7.1. Materials and methods	68
7.2. Results and discussions	69
7.3. Partial conclusions	76
CHAPTER 8 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM CONSUMPTION ON TOTAL SERUM PROTEINS IN NEWBORN LIVES	77
8.1. Materials and methods	77
8.2. Results and discussions	78
8.3. Partial conclusions	87
CHAPTER 9 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM CONSUMPTION ON SERUM LACTOFERRIN IN NEWBORN CALVES	89
9.1. Materials and methods	90
9.2. Results and discussions	94
9.3. Partial conclusions	101
CHAPTER 10 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM CONSUMPTION ON SERUM HAPTOGLOBIN IN NEWBORN CALVES	102
10.1. Materials and methods	103
10.2. Results and discussions	107
10.3. Partial conclusions	110
CHAPTER 11 - INVESTIGATIONS REGARDING THE IMMUNE RESPONSE OF CALVES AS A RESULT OF THE APPLICATION OF AN ACTIVE IMMUNIZATION SCHEME	111
11.1. Materials and methods	111
11.2. Results and discussions	121

11.5. Partial conclusions	131
CHAPTER 12 - RESEARCHES REGARDING COLOSTRUM MANAGEMENT AND EVALUATION OF PASSIVE IMMUNE TRANSFER IN DAIRY FARMS	132
12.1. Materials and methods	133
12.2. Results and discussions	136
12.3. Partial conclusions	145
CAPITOLUL 13 - FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	146
BIBLIOGRAPHY	152
LIST OF FIGURES	170
LIST OF TABLES	173
LIST OF PAPERS	174

LISTA DE ABREVIERI

$\bar{X}$ - media	NAHMS - National Animal Health Monitoring System
°C - grade Celsius	neg - negativ
A/G - raport albumine/globuline	nr. - număr
ADN - acid dezoxiribonucleic	PBS - Phosphate Buffered Saline
ARN - acid ribonucleic	PCR - Reacția de polimerizare în lanț
BHV-1 - Herpesvirus bovin -1	PI% - procente de inhibare %
BoCV - Coronavirus bovin	PI3 - Virusul Parainfluenza tip 3
BoRV - Rotavirus bovin	poz - pozitiv
BRSV - Virusul respirator sincițial bovin	PST - proteine serice totale
CI 95% - Coeficient de încredere 95%	RT-PCR - Revers transcripție - Reacția de polimerizare în lanț
COVID19 - Infecție provocată de noul coronavirus 2019	ș.a. - și alții
dl - deciletri	SARS-COV2 - Sindromul respirator acut sever coronavirus 2
DO - densitate optică	SCC - celule somatice
DVB-BM - Diareea virală bovină - Boala mucoaselor	SD - deviație standard
E. coli - <i>Escherichia coli</i>	SE - eroare standard
ETEC - <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenă	SG - specific gravity
Fe3+ - fier 3+	spp. - specie
Fig. - figură	SRB - sindrom respirator bovin
fl - flacon	SUA - Statele Unite ale Americii
FNT - factor de necroză tumorală	TMB - Tetrametilbenzidină
g - gram	val. - valoare
h - ore	vs. - versus
Hp - haptoglobină	α - alfa
IBR (gE) - Proteina gE a virusului rinotraheitei virale bovine	β - beta
Ig - imunoglobulina	γ - gamma
IL - interleukina	μ g - microgram
inh % - procentul de inhibiție	
l - litru	
L % - letalitate	
Mb - morbiditate	
mg - miligram	
miARN - micro ARN	
ml - mililitru	
Mt - mortalitate	

INTRODUCERE

În fiecare zi învățăm mai multe despre sistemul imunitar al bovinelor, dar, în încercarea de a crește performanța și de a scădea costurile de producție, este ușor să uităm că, pentru a avea un efectiv sănătos și performant, trebuie să începem prin acordarea unei atenții deosebite vițelului nou-născut.

Vițelul se naște cu o particularitate esențială din punct de vedere imunologic: titrul de anticorpi la naștere este zero, în perioada vieții intrauterine transferul de anticorpi pe cale transplacentară de la mamă la făt fiind nul. În consecință, singura cale de apărare post-partum pentru vițel este imunitatea pasivă sistemică achiziționată integral după naștere, prin intermediul colostrului (Carp-Cărare M., 2002).

Absorbția inadecvată a imunoglobulinelor colostrale în primele ore de viață a vițelului au ca și consecință un transfer imun pasiv deficitar. Transferul pasiv de imunoglobuline este strâns legat de susceptibilitatea vițelilor nou-născuți la bolile infecțioase. Astfel, monitorizarea vițelilor nou-născuți este esențială pentru a identifica deficiențele de gestionare din perioada neonatală și pentru a asigura detectarea și implementarea în timp util a măsurilor de intervenție, care pot reduce ratele de morbiditate, mortalitate și producție asociate cu eșecul transferului pasiv de imunoglobuline în efectiv (Kehoe ș.a., 2007).

Dintre toate categoriile de animale dintr-o fermă, tineretul bovin până la înțărare are cele mai mari rate de mortalitate și morbiditate. În urma unui studiu retrospectiv realizat de NAHMS (2007) în SUA în 1811 ferme de vaci de lapte, mortalitatea în rândul vițelilor înainte de înțărare a fost de 6,8%. Cauza principală a mortalității a fost diareea neonatală (52,2%), urmată de tulburările respiratorii (21,3%), traumatismele (2,4%), problemele articulare (2,2%) și alte cauze necunoscute (21,9%).

Managementul deficitar al bolilor neonatale și consecințele acestora asupra sănătății, a ratei de creștere și a potențialului de producție și reproducție al vițelilor supraviețuitori pot duce la o pierdere economică semnificativă (Sato, 1997; Millemann, 2009; Cho și Yoon, 2014). Mediul, dimensiunea fermei și practicile de management din această perioadă pot influența prevalența bolilor neonatale în efectiv (Bartels ș.a., 2010; Meganck ș.a., 2014). Acești factori trebuie evaluați și monitorizați în mod corespunzător pentru a diminua prevalența bolilor.

Patologia infecțioasă din primele săptămâni de viață a vițelilor este o problemă importantă, care are efecte semnificative asupra supraviețuirii și productivității vițelilor. Diareea neonatală și bolile respiratorii sunt cele mai frecvente cauze de morbiditate și mortalitate în rândul vițelilor sugari (Velescu, 2002). Previziunea timpurie a acestor

patologii este considerată a fi o condiție esențială pentru tratamentul lor cu succes (Davis ș.a., 1998).

Tot mai mulți fermieri, precum și cercetători din întreaga lume, sunt preocupați de bunăstarea animalelor, iar mortalitatea animală este considerată acum cel mai crucial indicator al nivelului de bunăstare, fiind și un indicator important al calității managementului (Cummins ș.a., 2016). Prin urmare, sunt necesare strategii fiabile și practice pentru a prognoza riscul individual de eșec al transferului pasiv și a evalua riscul de dezvoltare a bolilor infecțioase la viței în vederea obținerii unei precizii mai mari în protocoalele de management.

INTRODUCTION

Every day we learn more about the immune system of cattle, but in an attempt to increase performance and lower production costs, it is easy to forget that in order to have a healthy and efficient herd, we must start by giving special attention to the newborn calf.

The calf is born with an essential feature from an immunological point of view: the antibody titer at birth is zero, during the intrauterine life the transfer of antibodies by transplacental route from mother to fetus is null. Consequently, the only postpartum defense for the calf is passive systemic immunity acquired in full after birth, through colostrum (Carp-Cărare M., 2002).

Inadequate absorption of colostrum immunoglobulins in the first hours of the calf's life results in a deficient passive immune transfer. Passive immunoglobulin transfer is closely linked to the susceptibility of newborn calves to infectious diseases. Thus, monitoring of newborn calves is essential to identify short-term management deficiencies and to ensure timely detection and implementation of intervention measures that can reduce morbidity, mortality and production rates associated with passive immunoglobulin transfer failure (Kehoe et al., 2007).

Of all the categories of animals on a farm, young cattle up to weaning have the highest mortality and morbidity rates. Following a retrospective study by the NAHMS (2007) in the US in 1811 of dairy farms, mortality among calves before weaning was 6,8%. The leading cause of death was neonatal diarrhea (52.2%), followed by respiratory disorders (21,3%), trauma (2,4%), joint problems (2,2%) and other unknown causes (21,9%).

Poor management of neonatal diseases and their consequences on the health, growth rate and production and reproduction potential of surviving calves can lead to significant economic loss (Sato, 1997; Millemann, 2009; Cho and Yoon, 2014). The environment, farm size and management practices of this period may influence the prevalence of neonatal diseases in the herd (Bartels et al., 2010; Meganck et al., 2014). These factors need to be properly assessed and monitored to reduce the prevalence of disease.

Infectious pathology in the first weeks of calf life is an important problem, which has significant effects on the survival and productivity of calves. Neonatal diarrhea and respiratory diseases are the most common causes of morbidity and mortality among newborn calves (Velescu, 2002). Early prediction of these pathologies is considered to be an essential condition for their successful treatment.

More and more farmers, as well as researchers around the world, are concerned about animal welfare, and animal mortality is now considered the most crucial indicator

of the level of welfare, being also an important indicator of the quality of management. Therefore, reliable and practical strategies are needed to predict the individual risk of passive transfer failure and to assess the risk of developing infectious diseases in calves in order to achieve greater accuracy in management protocols.

REZUMAT

Cuvinte-cheie: boli infecțioase, colostru, imunitate pasivă, vaccinare, viței.

Teza de doctorat intitulată *„Considerații privind rolul statusului imun în prevenirea bolilor infecțioase la viței”* este structurată, conform normelor în vigoare, în două părți principale: prima parte, intitulată *„Stadiul actual al cunoașterii”* care cuprinde 35 pagini și partea a 2-a, *„Cercetări proprii”*, cu un număr de 125 de pagini.

Teza de doctorat are un volum total de 174 pagini și este ilustrată cu 23 tabele și 73 figuri.

Prima parte *„Stadiul actual al cunoașterii”* cuprinde 4 capitole ce descriu succint datele legate de fiziologia sistemului imun a vițelilor și influența colostrului în dobândirea imunității pasive la vițelii nou-născuți. În această parte sunt sintetizate, de asemenea, noțiuni privind patologia infecțioasă din perioada neonatală, precum și datele disponibile la ora actuală despre rolul statusului imun în prevenirea bolilor infecțioase la viței. Aceste date din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei au fost folosite ulterior pentru interpretarea și compararea rezultatelor obținute în cea de-a doua parte.

Partea a doua *„Cercetări proprii”* este structurată în 9 capitole fiecare reprezentând detaliat rezultatele obținute pe durata studiilor doctorale, ultimul dintre acestea reprezentând o sinteză a concluziilor finale aferente cercetărilor întreprinse. Fiecare capitol al acestei părți are în alcătuirea sa subcapitole în care se prezintă materialul și metoda de cercetare, rezultatele obținute și concluziile parțiale desprinse în urma realizării fiecărui studiu.

CAPITOLUL 5 descrie *„Scopul, obiectivele și cadrul organizatoric al cercetărilor”* prezentei teze de doctorat. Probele luate în studiu au fost recoltate dintr-o fermă de vaci de lapte cu sistem de creștere intensiv din județul Iași. Analizele probelor au fost efectuate în laboratoare de specialitate din Iași și Bacău. Tot în acest capitol sunt sistematizate scopul și obiectivele tezei de doctorat, care se dorește a fi un studiu amplu privind influența statusului imun asupra rezistenței dobândite a vițelilor nou-născuți față de bolile neonatale.

CAPITOLUL 6, intitulat *„Investigații epidemiologice, clinice și anatomo-patologice privind prezența și prevalența infecțiilor la viței”* redă rezultatele unei anchete epidemiologice care a fost realizată pe parcursul a 3 ani de studiu, respectiv în perioada 2017-2019. Cercetările întreprinse au avut ca scop identificarea patologiilor de tip infecțios care afectează vițelii nou-născuți și stabilirea indicilor de morbiditate și mortalitate în cadrul efectivului de viței luat în studiu.

Rezultatele obținute evidențiază faptul că, în efectivul de viței luat în studiu, morbiditatea a înregistrat o rată de 6,20%, iar rata letalității a fost de 15,10%, cu o rată de mortalitate de 0,94%. Morbiditatea afecțiunilor digestive ocupă primul loc, cu o medie de 60,89%, fiind urmată de afecțiunile respiratorii care înregistrează o medie de 39,11%.

În funcție de categoriile de vârstă care au prezentat interes în această anchetă epidemiologică, am observat că vițeii cu vârsta de peste 2 luni au fost cei mai afectați de infecțiile respiratorii, iar vițeii cu vârsta de 0-1 lună au prezentat predominant afecțiuni digestive.

CAPITOLUL 7 prezintă **„Diagnosticul de laborator în bolile infecțioase la viței”** în vederea stabilirii unui diagnostic cert. Metodele de diagnostic au fost reprezentate de teste imunocromatografice rapide, teste bacteriologice, serologice, imunoenzimatic și de biologie moleculară.

La vițeii cu diaree neonatală, *Cryptosporidium parvum* a fost cel mai frecvent agent patogen detectat (17,53%), urmat de *Clostridium perfringens* (11,69%) și *E.coli* factorul F5 (5,19%).

Mycoplasma bovis a fost cel mai frecvent agent patogen detectat din lavajul bronhoalveolar de la vițeii cu vârsta de 2-3 luni, în 10% din cazuri ca agent patogen unic, în 12,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida* și în 7,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* și *Coronavirusul bovin*. *Coronavirusul bovin* a fost identificat doar în 5% din cazuri ca agent patogen unic, în 10% în asociație cu *Mycoplasma bovis* și în 2,5% în asociație cu *Pasteurella multocida*.

CAPITOLUL 8 evidențiază **„Influența consumului de colostru asupra proteinelor serice totale la vițeii nou-născuți”**. Concentrațiile de proteine serice totale în raport cu vârsta vițelor și consumul de colostru au prezentat modificări puternic semnificative în prima săptămână de viață. Dintre proteinele serice totale, albumina a fost cea mai proeminentă fracție proteică constituind, la naștere, 56,7% din totalul proteinelor serice. Concentrația medie de γ -globuline la naștere a fost de numai 0,24 g/l, dar a crescut semnificativ la o zi după aportul de colostru la 35,10 g/l. Proteinele serice totale sunt marcate și influențate semnificativ de vârsta, creșterea și dezvoltarea vițelor. În toate cele 6 fracțiuni proteice au fost găsite schimbări variabile evaluate pe întreaga perioadă de studiu. Ele reflectă răspunsul vițelor nou-născuți la aportul de colostru și la modificările mediului înconjurător în perioada neonatală.

CAPITOLUL 9 intitulat **„Influența consumului de colostru asupra lactoferinei serice la vițeii nou-născuți”** a avut ca scop evaluarea variațiilor concentrațiilor serice de lactoferină în urma aportului de colostru și rolul lactoferinei în prevenirea bolilor infecțioase la viței. Lactoferina din colostru și laptele bovin a devenit tot mai importantă datorită gamei variate de proprietăți biologice. În studiul de față, concentrația medie a lactoferinei serice în ziua 0 (2,68 μ g/ml) a crescut de aproximativ 2 ori la o zi după aportul de colostru (5,24 μ g/ml). De asemenea, am observat că nivelul concentrațiilor serice de lactoferină la vițeii nou-născuți sunt dependente de concentrația de lactoferină din colostrul ingerat și de cantitatea de colostru administrată. În studiul comparativ efectuat pe 2 loturi de viței care au primit colostru cu diferite cantități de lactoferină, vițeii din lotul care a avut o concentrație mai mare de lactoferină colostrală, au avut de asemenea valori mai ridicate ale lactoferinei serice.

Studiile anterioare au indicat faptul că lactoferina colostră are un rol important în imunitatea neonatală și oferă protecție împotriva bolilor. În urma studiului comparativ a două loturi de vițe care au primit colostru pe perioade diferite de timp, s-a observat că morbiditatea diareei clinice a fost mai mare în lotul 1, care a primit colostru doar la naștere (26,6%), comparativ cu lotul 2 (20%), care a continuat să primească colostru zilnic, amestecat în laptele integral. De asemenea, durata medie a diareei la cazurile înregistrate în lotul 1 a fost mai mare (3,5 zile) comparativ cu cea înregistrată în lotul 2 (2,8 zile), însă diferențele nu au fost semnificative, durata totală a simptomelor clinice fiind în medie de aproximativ 3 zile în ambele loturi. Durata tratamentului specific și nespecific aplicat a avut variații mai mari în lotul 1 (4-7 zile) față de lotul 2 (3-5 zile).

CAPITOLUL 10 prezintă **„Influența consumului de colostru asupra haptoglobinei serice la vițeii nou-născuți”**. Haptoglobina este o glicoproteină care are ca funcție principală legarea hemoglobinei libere din sânge. Gruparea haptoglobina-hemoglobină reduce și disponibilitatea rezidului de hem din creșterea bacteriană, prin urmare, haptoglobina are o activitate antibacteriană indirectă. Pe lângă numeroasele sale funcții biologice, haptoglobina este implicată în răspunsurile de apărare ale gazdei la infecție și inflamație. La nou-născuți, sistemul imunitar este imatur și se presupune că producția endogenă de haptoglobina (pe baza cercetărilor la oameni) este scăzută (Gruse ș.a., 2016).

Scopul acestui studiu a fost evaluarea variațiilor concentrațiilor serice de haptoglobină în urma aportului de colostru. Analiza statistică a rezultatelor obținute a arătat că media concentrației de haptoglobină a înregistrat valori mici la parturiție (2,03 μg/ml), care au crescut discret, dar semnificativ după administrarea colostrului (2,86 μg/ml).

Proteinele de fază acută sunt proteine plasmatică sintetizate de hepatocite ca răspuns la stres, infecție, leziuni tisulare sau inflamații. Pentru a testa această ipoteză, am analizat probele de sânge ale unui eșantion de 20 de vițe, în momentul episoadelor de diaree și după vindecare. Concentrațiile de haptoglobină serică au fost de 5,8 ori mai mari la vițeii cu diaree, cu o diferență semnificativă statistic ($p < 0,001$) între vițeii bolnavi și vițeii vindecați.

CAPITOLUL 11 cuprinde o serie de **„Investigații privind răspunsul imun al vițeilor în urma aplicării unei scheme de imunizare activă”**. Scopul acestui studiu a fost evaluarea nivelului de anticorpi specifici anti-BoRV, anti-BoCV și anti-E.coli F5 (K99) în serul vacilor gestante, în colostru și în serul vițeilor nou-născuți pentru a putea pune în evidență transferul imun pasiv. Răspunsurile imune au fost comparate pe baza titrurilor de anticorpi (evaluate prin ELISA) evidențiate în probele analizate (digestive) în efectivele de bovine.

În urma imunizării active a vacilor în ultima perioadă de gestație titrurile de anticorpi specifici anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin și anti-E.coli F5 (K99) au crescut semnificativ în lotul experimental față de lotul martor, atât în serul vacilor gestante, cât și în colostru, respectiv în serul vițeilor nou-născuți. Vițeii sunt în totalitate

dependenți de transferul pasiv al anticorpilor specifici prin intermediul colostrului, întrucât în probele de ser recoltate înaintea administrării colostrului nu s-a decelat prezența anticorpilor anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin sau anti-E.coli F5 (K99). În ceea ce privește impactul vaccinării asupra patologiei infecțioase la viței sugari, morbiditatea diareei clinice a fost mai mare în lotul de viței născuți din mame nevaccinate (20%) comparativ cu lotul de viței născuți din mame vaccinate (13,6%), iar durata tratamentului specific și nespecific aplicat a avut variații mai mari în primul caz (3-7 zile).

CAPITOLUL 12, intitulat „***Cercetări privind managementul colostrului și evaluarea transferului pasiv imun în ferme de vaci de lapte***”, a avut ca scop formarea unei imagini de ansamblu asupra metodelor de gestionare a colostrului în fermele de vaci din România și a avut ca obiectiv obținerea informațiilor cât mai actuale despre recoltare, manipulare, stocare și modul de administrare al colostrului la viței, precum și importanța acestor metode asupra stării de sănătate a vițelilor nou-născuți. Înțelegerea rolului informațiilor în identificarea și îmbunătățirea gestionării colostrului în ferme este un domeniu cheie de interes în cercetarea bunăstării animalelor. Creșterea gradului de conștientizare și educare a fermierilor este direct proporțională cu îmbunătățirea stării de sănătate a efectivului de animale.

CAPITOLUL 13 prezintă succint un număr de 30 **concluzii finale și recomandări** extrase din cercetările întreprinse în prezenta teză de doctorat.

Referințele bibliografice însumează un număr de 221 titluri din literatura națională și internațională. De asemenea, în conținutul tezei se regăsesc rezultatele cercetărilor proprii publicate în volume de lucrări științifice susținute în cadrul Simpozioanelor cu participare internațională organizate de Facultatea de Medicină Veterinară Iași în perioada 2019-2020.

ABSTRACT

Keywords: infectious diseases, colostrum, passive immunity, vaccination, calves.

The doctoral thesis entitled "**Considerations on the role of immune status in the prevention of infectious diseases in calves**" is structured, according to the rules in force, in two main parts: the first part, entitled "*Current state of knowledge*" which contains 35 pages and part 2, "*Personal Research*", with a number of 125 pages.

The doctoral thesis has a total volume of 174 pages and is illustrated with 23 tables and 73 figures.

The first part "**Current state of knowledge**" contains 4 chapters that briefly describe the data related to the physiology of the immune system of calves and the influence of colostrum in the acquisition of passive immunity in newborn calves. This section also summarizes notions of infectious pathology in the neonatal period, as well as currently available data on the role of immune status in the prevention of infectious diseases in calves. These data from the literature on the subject of the thesis were subsequently used to interpret and compare the results obtained in the second part.

The second part "**Personal Research**" is structured in 9 chapters, each representing in detail the results obtained during the doctoral studies, the last of which represents a synthesis of the final conclusions related to the research undertaken. Each chapter of this part has in its composition subchapters in which the research material and method are presented, the results obtained and the partial conclusions drawn from the conduct of each study.

CHAPTER 5 describes "**PhD thesis aim, objectives and the organizational framework of the researches**" of this doctoral thesis. The samples taken from the study were collected from a dairy farm with an intensive breeding system in Iași County. The analyzes of the samples were performed in specialized laboratories in Iași and Bacău. Also in this chapter are systematized the purpose and objectives of the doctoral thesis, which is intended to be a comprehensive study on the influence of immune status on the acquired resistance of newborn calves to neonatal diseases.

CHAPTER 6, entitled "**Epidemiological, clinical and anatomopathological investigations regarding the presence and prevalence of infectious diseases in calves**" presents the results of an epidemiological investigation that was conducted during 3 years of study, respectively in 2017-2019. The research aimed to identify infectious pathologies that affect newborn calves and to establish morbidity and mortality rates in the calf population studied.

The obtained results highlight the fact that, in the calf herd studied, the morbidity registered a rate of 6.20%, and the lethality rate was 15.10%, with a mortality rate of

0.94%. The morbidity of digestive diseases occupies the first place, with an average of 60.89%, being followed by respiratory diseases which register an average of 39.11%.

Depending on the age groups that showed interest in this epidemiological investigation, we noticed that calves over 2 months of age were the most affected by respiratory diseases, and calves aged 0-1 months were predominantly digestive.

CHAPTER 7 presents "**Laboratory diagnostic in infectious diseases in calves**" in order to establish a definite diagnosis. The diagnostic methods were rapid immuno-chromatographic tests, bacteriological, serological, enzyme-linked immunosorbent assays and molecular biology techniques.

In calves with neonatal diarrhea, *Cryptosporidium parvum* was the most commonly detected pathogen (17.53%), followed by *Clostridium perfringens* (11.69%) and *E.coli* factor F5 (5.19%).

Mycoplasma bovis was the most common pathogen detected in bronchoalveolar lavage in 2-3 month old calves, in 10% of cases as a single pathogen, in 12.5% of cases in association with *Pasteurella multocida* and in 7, 5% of cases in association with *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* and bovine coronavirus. Bovine coronavirus was identified in only 5% of cases as a single pathogen, in 10% in association with *Mycoplasma bovis* and in 2.5% in association with *Pasteurella multocida*.

CHAPTER 8 highlights "**The Influence of colostrum consumption on total serum protein in newborn calves**". Total serum protein concentrations relative to calf age and colostrum consumption showed strongly significant changes in the first week of life. Of the total serum proteins, albumin was the most prominent protein fraction, accounting for 56.7% of total serum proteins at birth. The average concentration of γ -globulins at birth was only 0.24 g/l, but increased significantly the day after the intake of colostrum - 35.10 g/l. Total serum proteins are marked and significantly influenced by the age, growth and development of calves. Variable changes evaluated over the entire study period were found in all 6 protein fractions. They reflect the response of newborns to the intake of colostrum and changes in the environment in the neonatal period.

CHAPTER 9, entitled "**The influence of colostrum consumption on serum lactoferrin in newborn calves**" aimed to evaluate variations in serum lactoferrin concentrations following colostrum intake and the role of lactoferrin in the prevention of infectious diseases in calves. Lactoferrin from colostrum and bovine milk has become increasingly important due to its wide range of biological properties. In the present study, the mean serum lactoferrin concentration on day 0 (2.68 μ g/ml) increased approximately 2 times a day after colostrum intake (5.24 μ g/ml). We also observed that the levels of serum lactoferrin concentrations in newborn calves are dependent on the concentration of lactoferrin in the ingested colostrum and the amount of colostrum administered. In the comparative study performed on 2 groups of calves that received colostrum with different amounts of lactoferrin, the calves in the group that had a higher concentration of colostrum lactoferrin also had higher serum lactoferrin values.

Previous studies have shown that colostrum lactoferrin has an important role in neonatal immunity and there is a possibility to provide protection against disease. Following the comparative study of two groups of calves that received colostrum over different periods of time, we observed that the morbidity of clinical diarrhea was higher in group 1, which received colostrum only at birth (26.6%), compared to the group 2 (20%), which continued to receive colostrum daily, mixed in whole milk. Also, the mean duration of diarrhea in the cases recorded in group 1 was longer (3.5 days) compared to that recorded in group 2 (2.8 days), but the differences were not significant, the total duration of clinical symptoms being on average about 3 days in both groups. The duration of the specific and non-specific treatment applied had greater variations in group 1 (4-7 days) than in group 2 (3-5 days).

CHAPTER 10 presents "**The influence of colostrum consumption on serum haptoglobin in newborn calves**". Haptoglobin is a glycoprotein whose main function is to bind free hemoglobin in the blood. The haptoglobin-hemoglobin group also reduces the availability of heme residue from bacterial growth, therefore haptoglobin has an indirect antibacterial activity. In addition to its many biological functions, haptoglobin is involved in the host's defense responses to infection and inflammation. In newborns, the immune system is immature and endogenous haptoglobin production (based on research in humans) is thought to be low (Gruse ş.a., 2016).

The aim of this study was to evaluate changes in serum haptoglobin concentrations following colostrum intake. The statistical analysis of the obtained results showed that the average haptoglobin concentration registered low values at parturition (2.03 µg/ml), which increased discreetly, but significantly after the administration of colostrum (2.86 µg/ml).

Acute phase proteins are plasma proteins synthesized by hepatocytes in response to stress, infection, tissue damage, or inflammation. To test this hypothesis, we analyzed the blood samples of a sample of 20 calves, during the episodes of diarrhea and after healing. Serum haptoglobin concentrations were 5.8-fold higher in calves with diarrhea, with a statistically significant difference ($p < 0.001$) between diseased calves and recovered calves.

CHAPTER 11 contains a series of "**Investigations regarding the immune response of calves as a result of the application of an active immunization scheme**". The aim of this study was to evaluate the level of specific anti-BoRV, anti-BoCV and anti-E.coli F5 antibodies (K99) in the serum of pregnant cows, in colostrum and in the serum of newborn calves in order to highlight the passive immune transfer. Immune responses were compared based on antibody titers (evaluated by ELISA) found in the analyzed samples in cattle.

Following the active immunization of cows in the last gestation period, the specific antibody titers anti-bovine rotavirus, anti-bovine coronavirus and anti-E.coli F5 (K99) increased significantly in the experimental group compared to the control group, both in the serum of pregnant cows, as well as in colostrum, respectively in the serum of newborn calves. Calves are totally dependent on the passive transfer of specific antibodies via colostrum, as the presence of bovine anti-rotavirus, bovine anti-coronavirus or anti-E.coli F5 (K99) antibodies was not detected in the serum samples collected prior to colostrum. Regarding the impact of vaccination on infectious pathology in suffering calves, the morbidity of clinical diarrhea was higher in the group of calves born from unvaccinated dams (20%) compared to the group of calves born from vaccinated dams (13.6%), and the duration of specific and non-specific treatment applied had larger variations in the first case (3-7 days).

CHAPTER 12, entitled “**Researches regarding colostrum management and assessment of passive immune transfer in dairy farm**”, aimed to form an overview of colostrum management methods in cow farms in Romania and aimed at obtaining the most up-to-date information on the collection, handling, storage and administration of colostrum in calves, as well as the importance of these methods on the health of newborn calves. Understanding the role of information in identifying and improving colostrum management on farms is a key area of interest in animal welfare research. Increasing the awareness and education of farmers is directly proportional to improving the health of livestock.

CHAPTER 13 briefly presents a number of 30 **final conclusions and recommendations** extracted from the research undertaken in this doctoral thesis.

The bibliographic references sum up a number of 221 titles from the national and international literature. Also, in the content of the thesis are found the results of own research published in volumes of scientific papers held at the Symposiums with international participation organized by the Faculty of Veterinary Medicine Iasi during 2019-2020.

PARTEA I

STADIUL ACTUAL AL

CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1 – SISTEMUL IMUN AL VIȚELOR NOU-NĂSCUȚI

CHAPTER 1 - THE IMMUNE SYSTEM OF NEWBORN CALVES

1.1. Dezvoltarea sistemului imun

Imunologia neonatală continuă să fie un domeniu activ de cercetare atât în medicina umană, cât și în medicina veterinară. Metodele noi și avansate de evaluare a statusului imun și a funcției imunologice sunt utilizate pe scară largă pentru a reevalua unele dintre vechile teorii despre sistemul imun al animalelor nou-născute.

Vițeei se nasc agamaglobulinici, datorită placentei sindesmocoriale întâlnite la rumegătoare, iar dobândirea imunității pasive se realizează în exclusivitate prin ingestia și absorbția unei cantități adecvate de imunoglobuline colostrale. La naștere, ieșirea din mediul uterin steril expune nou-născuții la condiții de mediu încărcate cu microorganisme și, deși sunt capabili să asigure un răspuns imun, vițeei nou-născuți nu sunt considerați a fi imunocompetenți (Fox ș.a., 1987). Această incapacitate de a iniția un răspuns imun de succes este atribuită imaturității mecanismelor de protecție și timpului îndelungat în inițierea și producerea mecanismelor necesare pentru generarea imunității umorale și mediată celular. Prin urmare, cu excepția cazului în care se oferă protecția imunologică maternă adecvată, vițeei nou-născuți au o probabilitate crescută de a ceda chiar și la cele mai inofensive infecții (Barrington, 2001).

Dezvoltarea sistemului imun al tuturor speciilor de mamifere începe destul de devreme în timpul gestației. Pe măsură ce fătul crește, sistemul imunitar trece prin multe modificări în timpul dezvoltării și specializării celulelor. În general, cu cât perioada de gestație este mai scurtă, cu atât sistemul imunitar este mai puțin dezvoltat la naștere. Răspunsul imun al vițelilor la unii viruși poate fi evidențiat încă din a 70-a zi de gestație, iar din al treilea trimestru, pot răspunde imun la multe alte infecții.

Timusul poate fi observat la miei și viței între zilele 27 și 30 de gestație. Din punct de vedere al dezvoltării, acesta atinge dimensiunea maximă aproape de mijlocul gestației și scade apoi rapid după naștere. Regresia reală a timusului începe în jurul pubertății, iar durata și viteza de regresie variază în funcție de practicile de creștere și de genetică. Până la primul ciclu de călduri, funcția timusului ca glandă imună dispare aproape complet (Cortese, 2009). Celulele care se infiltrează inițial în timus sunt de origine necunoscută, dar dezvoltarea timică și diferențierea timocitelor în linii de celule T specifice apar în timpul gestației. O parte din această dezvoltare și diferențiere poate avea loc și în organele limfoide secundare. În schimb, celulele B se dezvoltă și se diferențiază în măduva osoasă fetală. Există o creștere constantă a limfocitelor periferice pe tot parcursul gestației. Dintre aceste limfocite fetale circulante cele mai multe sunt celule T. În același timp, cu

limfocitele se dezvoltă la făt și alte populații de celule albe circulante în sânge (Cartwright ș.a, 2015).

Ficatul fetal la mamifere este locul ontogenezei sistemului imunitar (Davis, 1998). Celulele stem hematopoietice se deplasează din sacul vitelin în ficatul fetal la începutul dezvoltării, la aproximativ 40 de zile de gestație. La fetusul bovin, durata în care ficatul este un organ hematopoietic și limfopoietic major nu este bine definită, dar la om ficatul rămâne un organ imun important pe tot parcursul gestației și ulterior, în perioada postnatală (Robinson ș.a., 2016). Producerea de celule stem hematopoietice fetale la feteșii bovini atinge nivelul maxim la 12-24 săptămâni de gestație (Morarie-Kane ș.a., 2018). Celulele imune imature ale ficatului, în special celulele Kupffer, sunt o parte importantă din răspunsul imun al nou-născutului. Celulele Kupffer, găsite în sinusoidale hepatice, sunt prima populație de macrofage cu care se întâlnesc antigeni precum resturi bacteriene, endotoxine și viruși din conținutul digestiv (Fox ș.a., 1987). Celulele Kupffer sunt arbitrii supremi ai răspunsului imun în mediu hepatic. Ele prezintă măsuri atât de excitare cât și de tolerare în interacțiunile lor cu leucocitele și sunt capabile să secrete mediatori inflamatori, inclusiv interleukina (IL)-1, IL-6, și factorul de necroză tumorală (FNT) - α , precum și citokinele tolerogene precum IL-10 (Risalde ș.a., 2011). Toleranța este răspunsul predominant al ficatului, astfel încât sistemul imunitar să nu reacționeze necorespunzător la antigenii din conținutul digestiv. Studiile anterioare au sugerat că răspunsul imun stabilit în ficat poate avea o influență extinsă asupra răspunsului imun din alte țesuturi (Knolle ș.a., 2000). Toleranța imună hepatică este interesantă în ceea ce privește infecția persistentă cu virusul diareei virale bovine, deoarece în cazul în care celulele din ficatul fetal sunt infectate cu virusul transmis matern, acestea ar putea prezenta antigene virale la limfocite în perioadele critice de dezvoltare (Smirnova ș.a., 2012).

La naștere, sistemul imunitar al vițelilor nou-născuți este funcțional, dar imatur (Chase ș.a., 2008). Organele limfoide primare și secundare sunt populate de celule care s-au dezvoltat independent de stimularea antigenică, iar numărul de limfocite B circulante este de aproximativ 30% din cel găsit la un adult. La vițel, numărul de limfocite B atinge nivelul adulților după aproximativ 20 de zile după naștere (Senogles ș.a., 1978). În general, imunoglobulinele produse de aceste celule apar în sânge la câteva zile după naștere. De exemplu, între vârsta de 36 de ore și 3 săptămâni, producția endogenă de imunoglobulină G1 (IgG1) este estimată la aproximativ 1 gram de IgG1 pe zi. Deși există un număr mai mare de celule fagocitare la nou-născuți, funcția acestor celule este scăzută (la vițel, aceste deficiențe se întâlnesc până la vârsta de 4 luni). Complementul variază la naștere între 12% și 60% din nivelul obținut la maturitate. La vițel, complementul nu atinge nivelul adulților până la vârsta de 6 luni.

Există o maturare lentă a sistemului imunitar la mamifere. Pe măsură ce animalul se apropie de maturitatea sexuală, sistemul imunitar se maturizează și el. La bovine, cea mai mare parte a maturității sistemului imunitar se desfășoară la vârsta de 5 până la 8 luni (Singh ș.a., 2002). De exemplu, celulele T (celulele CD41, CD81 și TCRgd1) nu ating nivelul maxim până când animalul are 8 luni (Hein ș.a., 1994). Asta nu înseamnă că sistemul imun al unui vițel tânăr nu poate răspunde la antigeni, dar răspunsul este mai slab, mai lent și mai ușor de depășit (Elfstrand ș.a., 2002). În toate scopurile practice, această imaturitate poate duce mai degrabă la moderarea bolii decât la prevenirea completă.

Producția endogenă de Ig va fi inițiată deja de la vârsta de aproximativ 36 de ore și va fi de aproximativ 1g IgG/zi (Godden, 2008). În primele 3 săptămâni, producția endogenă nu va fi cantitativ suficientă pentru a proteja vițelul de bolile infecțioase și, prin urmare, imunoglobulinele materne din colostru susțin vițelul în această perioadă (Earley ș.a., 1998). În jurul vârstei de 3 săptămâni, activitatea Ig colostrale va înceta și vițelul trebuie să se bazeze în totalitate pe Ig endogene, deși un sistem imunitar complet funcțional nu va fi obținut înainte de vârsta de 1-2 luni. (Godden ș.a., 2009)

Similar imunității umorale, imunitatea locală și mediată celular este deficitară la vițelii nou-născuți. Imunitatea intestinală locală începe în prima săptămână de viață, când celulele predominante producătoare de imunoglobulină produc imunoglobulină M până la 5 săptămâni de viață. Mai târziu, apar celulele producătoare de imunoglobulină A și predomină până la vârsta adultă (Husband ș.a., 1980).

Vițelii tineri au sistemul lor imunitar pe de o parte și încărcătura patogenă pe de alta. Când sistemele sunt în echilibru, vițelul poate supraviețui. Când încărcătura patogenă devine mai mare, chiar și cu o imunitate puternică, sistemul nu este capabil să o manipuleze. De asemenea, când sistemul imunitar devine deprimat din orice motiv - deficiența de nutrienți, lipsa de colostru, vaccinare și stres meteorologic - nivelul patogenului poate transforma un vițel sănătos în unul grav bolnav. Noi trebuie să înțelegem cât de competent este sistemul imunitar al vițelului și cum exprimă răspunsurile imune la diferiți agenți. Atunci vom putea proiecta programe care folosesc produse specifice acestor probleme (Fuhrmann ș.a., 1989).

1.2. Transferul pasiv de imunoglobuline la vițelii nou-născuți

Transferul imunoglobulinelor din colostrul ingerat în circulația vițelului are loc prin transportul proteinelor mari prin epiteliul absorbant al intestinului subțire (Dewell ș.a., 2006). Termenul „intestin deschis” se referă la capacitatea unică a enterocitului vițelului nou-născut de a absorbi nonselectiv macromoleculele intacte, printre care și imunoglobulinele, prin procesul de pinocitoză (Mann ș.a., 2016). Moleculele de Ig sunt

transportate în celulă și eliberate în sistemul limfatic prin exocitoză, după care pătrund în sistemul circulator prin conducta toracică (Staley ș.a., 1972).

Ingestia colostrului ar trebui să aibă loc, de preferință, cât mai curând posibil după naștere, deoarece creșterea rapidă postnatală a intestinului duce la înlocuirea enterocitelor de tip fetal cu enterocite de tip adult. Această dezvoltare contribuie la închiderea intestinului și la încetarea absorbției macromoleculelor din intestin în sânge după 12 ore, cu un timp mediu de închidere de 24 ore după naștere (Morrill ș.a., 2012). După închiderea intestinului, imunoglobulinele au încă un efect important de protecție enterică locală, dar nu vor mai intra în circulația sistemică a vițelului (Butler ș.a., 2009).

Perioada colostrală reprezintă un moment important în transferul imunității pasive de la vacă la vițel. Modul cum este administrat colostrul, calitatea și cantitatea acestuia, cât și momentul în care acesta se administrează, sunt cei mai importanți factori de care depinde obținerea unei imunități solide a nou-născutului și implicit o protecție eficientă împotriva bolilor neonatale (Mayasari ș.a., 2015).

Asigurarea unei mase adecvate de imunoglobuline din colostrul matern, în special IgG, este definită ca o concentrație de IgG serică de >10 g/l la vițelul nou-născuț în primele 24 de ore de viață și este esențială pentru a reduce riscul de eșec al transferului pasiv al imunității (Godden ș.a., 2008). Reușita transferului pasiv este direct proporțională cu volumul și concentrația în IgG a colostrului ingerat. Concentrația de IgG serică absorbită este influențată de factori precum: capacitatea vițelilor de a o absorbi, mișcarea IgG absorbită din circulație în compartimentele extravasculare și metabolizarea IgG circulante (Razzaque ș.a., 2009). Acești factori diferiți sunt calculați colectiv ca o eficiență aparentă a absorbției, care reprezintă un indice al masei de IgG circulantă raportată la masa de IgG ingerată (Quigley ș.a., 2002).

Absorbția inadecvată a imunoglobulinelor colostrale în primele ore de viață a vițelului determină un transfer imun pasiv deficitar, ceea ce conduce la un risc crescut de mortalitate și la scăderea sănătății și longevității (Mee, 2008). În funcție de managementul perioadei neonatale și de sistemele de creștere a animalelor, prevalența deficitului de absorbție a imunoglobulinelor colostrale este raportată la 20-40% din vițelii nou-născuți. Mortalitatea, în aceste cazuri, a fost raportată ca variind de la 8 la 25% (Novo ș.a., 2017). Nivelul ridicat de mortalitate neonatală și dovezile privind persistența eșecului transferului imunității pasive la vițel, indică faptul că prea mulți vițeli consumă prea puțină IgG din colostru sau nu sunt în măsură să o absoarbă în mod eficient (Godden ș.a., 2008). Eșecul transferului pasiv este suspectat a fi o problemă larg răspândită în rândul efectivelor de vaci de lapte (Weaver ș.a., 2000) și joacă un rol major în complexul unei rate ridicate a mortalității.

Asigurarea unui aport necesar de colostru în timp util este o parte importantă în obținerea unui start bun în creșterea viitorului vițel (Godden, 2009). Deși s-au înregistrat

progrese în ultimii 15 ani, aproximativ unul din cinci viței încă se confruntă cu eșecul transferului pasiv (NAHMS, 2010). Studiile au arătat că eșecul transferului pasiv crește morbiditatea și mortalitatea vițelor, reduce viteza de creștere și scade rata de producție la prima și a doua lactație la vacile de lapte.

Prevenirea bolilor este, desigur, preferată tratamentului. O cheie pentru prevenire, conform unora, este de a menține lucrurile simple sau cât mai naturale posibil. Dar, în natură sau în sălbăticie, bolile nou-născuților cauzează adesea rate de pierdere care ar fi neprofitabile pentru producătorii de animale (Wells ș.a., 1996).

Trei factori sunt extrem de importanți în aprecierea dacă un vițel rămâne sănătos sau supraviețuiește unei boli:

- 1) Valoarea imunității pe care vițelul o primește prin colostru.
- 2) Tipul și cantitatea de agenți infecțioși din mediul înconjurător al vițelului.
- 3) Stresul, un factor care facilitează sau încurajează instalarea bolii (Wilde, 2009).

Mortalitatea vițelor este o problemă crescândă în industriile lactate la nivel internațional. Factorii multipli de gestionare a efectivului contribuie la astfel de pierderi. Studiile au arătat că există factori care diferă între efectivele cu mortalitate ridicată și mică, printre aceștia amintind indicii de reproducție, nutriție, sănătate și management ca având un rol important (Windeyer ș.a., 2014). S-a ajuns la concluzia că managementul perioadei perinatale pare a fi cea mai importantă zonă de îngrijorare la efectivele cu mortalitate neonatală ridicată (Wilde, 2009). Acest lucru indică faptul că fermierii și veterinarii trebuie să se concentreze asupra managementului vacilor în perioada de gestație și a noilor născuți atunci când investighează astfel de probleme și când încearcă să reducă pierderile în efectivele cu rate ridicate de mortalitate neonatală.

1.3. Factorii care influențează absorbția imunoglobulinelor la viței

Probabilitatea ca vițee să asimileze cantitățile de anticorpi necesare prin consumul de colostru depinde de patru factori importanți:

- 1) Calitatea colostrului – un colostru de calitate are o concentrație de IgG de cel puțin 50 g/l.
- 2) Cantitatea de colostru ingerată - vițee trebuie să primească un minim de 100g de IgG și, în mod ideal, 150g. Ținându-se cont de variabilitatea calității colostrului, se recomandă administrarea a aproximativ 4 litri de colostru.
- 3) Timpul - colostrul ar trebui să fie administrat cât mai curând posibil după naștere, preferabil în decurs de 1 până la maxim 2 ore.
- 4) Igiena - trebuie utilizată o igienă adecvată la colectarea și la manipularea colostrului pentru a reduce cât de mult posibil contaminarea bacteriană. În plus, dacă colostrul nu este administrat în decurs de 1-2 ore de la colectare, acesta ar trebui să fie refrigerat sau congelat (NAHMS, 2010).

Alți factorii care afectează absorbția moleculelor de Ig în circulație includ starea metabolică a vițelului, rasa, factori ce țin de mamă precum: vârsta, durata perioadei de repaos mamar, furajarea în perioada de repaos mamar, sezonul fătării, vaccinarea, etc. (Godden, 2008; 2009).

Calitatea colostrului

Colostrul conține un spectru larg de componente imune și nutriționale importante, însă concentrația de IgG a fost considerată parametrul cel mai relevant în evaluarea calității colostrului. Colostru de calitate înaltă conține de titruri de IgG mai mari de 50 g/l (Godden ș.a., 2008). Însă titrurile de IgG colostrale pot varia dramatic de la o vacă la alta. Într-un studiu observațional care a testat 2253 de probe de colostru din 104 ferme din 13 state, nivelul mediu de IgG colostrale a fost de 74,2 g/l, variind de la 24,9 la 130,2 g/l. Un total de 77,4% din probe au avut colostru de calitate înaltă (Shivley, 2018).

Cantitatea de colostru ingerată

La vițeei nou-născuți funcționează numai abomasul, care, deși reprezintă circa 50% din volumul total al stomacului, are capacitate redusă. Stabilirea cantității de colostru care intră în rația vițelilor și a numărului de administrări trebuie să țină cont de acest aspect.

Se recomandă ca prima doză de colostru administrată vițelilor să fie echivalentă cu 10% până la 12% din greutatea lor corporală (respectiv 3-4 l pentru un vițel Holstein). Pentru a obține un transfer pasiv adecvat de imunoglobuline, la 24 de ore după fătare serul vițelilor trebuie să aibă o concentrație de 10 mg/ml IgG (Godden ș.a., 2008).

Într-un studiu realizat de Morin ș.a., 1997, nivelul seric mediu de IgG la 24 de ore a fost semnificativ mai mare la vițeei hrăniți cu 4 l de colostru la 0 ore de viață și cu încă 2 l la 12 ore (IgG serică 31,1 g/l) comparativ cu vițeei care au primit doar 2 l de colostru de înaltă calitate la 0 ore și încă 2 l la 12 ore (IgG serică 23,5 g/l). Un alt studiu a raportat că vițeei din rasa Brună Elvețiană care au primit 3,8 l de colostru (vs. 1,9 l) la prima hrănire au înregistrat rate medii semnificativ mai mari în sporul mediu zilnic și niveluri mai mari în producția de lapte atât în prima, cât și în a doua lactație (Faber ș.a., 2005).

Timpu de administrare a primului colostru

Absorbția macromoleculelor are loc într-o perioadă limitată de timp. Lipsa colostrului în primele 24 de ore de viață determină reducerea IgG, a β -carotenului și a vitaminei A, a raportului glutamină/glutamat, a aminoacizilor esențiali și a acizilor grași, status care persistă timp de câteva săptămâni (Alberghina ș.a., 2011).

Într-un studiu randomizat pe vițeei nou-născuți care au primit o doză de colostru cu aproximativ 200 g de IgG, în timpi diferiți, eficiență mai mare de absorbție și nivelurile

maxime de IgG serice au fost atinse la vițeii hrăniți la 45 de minute de la fătare, comparativ cu vițeii hrăniți la 6 ore sau 12 ore (Fisher ș.a., 2018).

Popularea microbiană a intestinului poate fi de asemenea implicată în reducerea absorbției după fătare. Tractul digestiv al nou-născutului este steril la fătare, iar după câteva ore începe să fie colonizat cu bacterii din mediul înconjurător. Administrarea mai rapidă a colostrului duce la o colonizare bacteriană mai rapidă a intestinului cu organisme benefice precum *Bifidobacterium spp.* (Fisher ș.a., 2018). Logan ș.a., 1977, au evidențiat faptul că în lotul care a fost expus la infecția cu *E. coli* și apoi a primit colostru, mortalitatea a fost de 75%, față de lotul care a primit colostru, apoi a fost infectat cu *E. coli* și nu s-a îmbolnăvit. Astfel, consumul timpuriu de colostru previne septicemia prin reducerea colonizării și a absorbției bacteriilor enterice patogene. De asemenea, Ig care rămân după consumul colostrului în lumenul intestinal asigură o imunitate locală față de infecțiile virale (McVicker ș.a., 2002).

Se recomandă ca prima doză de colostru administrată vițelor să fie în termen de 1 până la maxim 2 ore după naștere, dar Chigerwe ș.a. (2009) au constatat că vițeii hrăniți imediat după fătare consumă o cantitate mai mică de colostru față de vițeii care sunt lăsați să se aclimatizeze câteva ore. Autorii au evidențiat că abilitatea de absorbție a vițelor este aceeași în primele 4 ore după fătare, iar concentrația serică de IgG, la 48 de ore, nu a fost modificată. Timpul optim la care trebuie administrată a doua doză de colostru s-a considerat a fi 12 ore, deoarece reducerea permeabilității intestinale la Ig colostrale scade semnificativ după acest interval de timp.

Metoda de administrare a colostrului

Permisul suptului direct de la vacă este abordarea cel mai puțin preferată, deoarece întârzierile în alăptare și faptul că nu se poate controla calitatea și volumul de colostru ingerat pot duce la rate mai mari de eșec al transferului pasiv. Aproape 9 din 10 fermieri au lăsat vițeii să sugă direct de la mama lor, astfel că 1 din 10 vițeii a murit (NAHMS, 2008). Chiar dacă prezența mamei ajută la absorbția Ig din colostru, vițeii care au fost lăsați să sugă fie au ingerat un volum inadecvat de colostru fie au ingerat colostru contaminat cu agenți patogeni, ceea ce a crescut riscul de a fi afectați de bolile neonatale (Svensson ș.a., 2006).

Administrarea artificială a colostrului însă este folosită la scară largă în industria zootehnică modernă. În SUA, cea mai frecventă metodă de administrare a colostrului este cea la tetină sau la găleată (59,2%), comparativ cu metoda folosirii sondei esofagiene (4,3%). Un dezavantaj al administrării cu tetina este durata mai mare de timp (minim 15 minute/vițel), dar este mai frecventă deoarece nu necesită personal calificat (McGuirk ș.a., 2004). Comparând trei metode de administrare a colostrului, cercetătorii au observat că procentul cel mai mare de eșec în transferul pasiv de imunoglobuline a fost de la vițeii

care au fost lăsați să sugă la mamă (61,4%) față de 19,3% la cei care au fost hrăniți cu tetina și 10,8% la vițeii care au primit colostru cu tubul esofagian (Faber ș.a., 2005).

Igiena colostrului

Deși colostrul furnizează vițelului imunoglobuline și alți factori imuni, poate fi, de asemenea, un drum către transmiterea bolilor de la vaca la vițel. Deoarece mulți dintre agenții patogeni implicați în bolile neonatale la vițel sunt purtați și eliminați de către vaci, aceștia se vor afla în doze mari în mediul înconjurător al vițelului atunci când este născut, mai ales dacă vacile sunt adăpostite într-o zonă comună care servește ca maternitate. Pentru a evita aceste situații, se recomandă separarea vițelului de vacă imediat după fătare și administrarea artificială a colostrului cu ustensile corect igienizate în prealabil (McMartin ș.a., 2006).

Un protocol bun de gestionare a colostrului ar trebui, de asemenea, să evite contaminarea, deoarece bacteriile din colostru pot interfera cu absorbția pasivă a anticorpilor colostali în circulația gazdei.

Colostrul și laptele pot conține agenți patogeni precum *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, *Mycoplasma spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* și *Salmonella enteritidis* (Velescu, 2002). Din fericire, pasteurizarea este o modalitate bună de a reduce încărcătura bacteriană din colostru, dar tratamentul termic trebuie să evite denaturarea și creșterea vâscozității acestuia (NAHMS, 2008). Studiile anterioare au observat că protocolul convențional de pasteurizare pentru lapte poate modifica caracteristicile colostrului (Godden ș.a., 2003). S-a stabilit că încălzirea colostrului la 60°C timp de 30 până la 60 de minute poate fi un bun tratament pentru menținerea calității colostrului (McMartin ș.a., 2006; Elizondo-Salazar ș.a., 2010) și reduce semnificativ agenții patogeni importanți care îl pot contamina.

CAPITOLUL 2 – INFLUENȚA COLOSTRULUI ASUPRA STATUSULUI IMUN AL VIȚELOR NOU – NĂSCUȚI CHAPTER 2 - THE INFLUENCE OF THE COLOSTRUM ON THE IMMUNE STATUS OF NEWBORN CALVES

Colostru oferă nutrienții esențiali și protecția imunologică necesară supraviețuirii și dezvoltării unui nou-născut. La rumegătoare, specie la care nu are loc un schimb de factori imuni *in utero*, colostrul și capacitatea intestinului nou-născutului de a permite trecerea nerestricționată a moleculelor mari de imunoglobuline, oferă vițelului o imunitate pasivă (Godden, 2008; Elsohaby ș.a., 2019).

2.1. Colostrogenza

Colostrogenza cuprinde transferul prepartum al imunoglobulinelor din serul matern în secrețiile glandei mamare. Procesul începe cu câteva săptămâni înainte de fătare și încetează în momentul fătării sub influența modificărilor expresiei hormonale (Barrington ș.a., 2001; Baumrucker ș.a., 2016).

Imunoglobulinele din secrețiile mamare provin fie din serul matern, fie sunt produse local în glanda mamară. Cantități mici de Ig din clasele IgA și IgM sunt produse de plasmocite adiacente epiteliului secretor în timp ce clasa principală de imunoglobulină bovină, IgG, apare din fluxul sanguin (Baumrucker ș.a., 2016).

Transferul de IgG de la serul matern la secrețiile lactate este facilitat de receptori epiteliali secretori ai glandei mamare. Cea mai abundentă clasă de imunoglobulină din colostru și laptele bovin este IgG1 (Barrington ș.a., 2001). În schimb, IgA și IgM sunt prezente la concentrații mult reduse în colostru și lapte bovine (Tabelul 2.1). IgG1 este captată din fluidul extracelular de către un receptor specific pentru IgG1 care determină o creștere de 5-10 ori a concentrației în colostru comparativ cu concentrația din serul matern (Barrington ș.a., 2001). În timpul colostrogenzei, până la 500 g/săptămână de IgG1 sunt transferate în secreția mamară, ceea ce reprezintă aproximativ 85% din conținutul total de imunoglobulină din colostru (Larson ș.a., 1980). Datorită abundenței sale ridicate, IgG1 este adesea folosită ca un marker al eficacității procesului de transfer pasiv.

Marea majoritate a imunoglobulinelor pătrund în colostru și lapte printr-un sistem selectiv - cale intracelulară mediată de receptor, doar o cantitate mică de imunoglobuline poate pătrunde direct din serul sanguin prin calea paracelulară ca urmare a unor „scurgeri” din joncțiunile intercelulare (Lacy-Hulbert ș.a., 1999). Aceste imunoglobuline pot fi derivate din sânge sau produse *in situ* de celule plasmactice intramamare. Prezența unui receptor IgG specific (receptor Fc neonatal) în celulele epiteliale mamare a fost raportată la mai multe mamifere (Schnulle și Hurley, 2003). Recent, Mayer ș.a. (2005) au arătat că

acest receptor joacă un rol activ în transportul IgG în glanda mamară bovină care alăptează.

IgA găsită în colostrul și laptele bovin este produsă de plasmocite intramamare rezidente. Aceste celule plasmatice circulă către glanda mamară prin sânge, unde absorbția lor este mediată de chimiochine produse local (Wilson și Butcher, 2004). Translocarea IgA pe celulele epiteliale mamare este facilitată de receptorul polimeric al imunoglobulinei exprimat pe epiteliul mucoasei. În partea apicală a celulelor epiteliale mamare, receptorul polimeric al imunoglobulinei este clivat și IgA este eliberată în lumenul alveolar împreună cu o porțiune de receptor polimeric, component secretor. Exprimarea și reglarea receptorilor implicați în transportul mamar al IgG și IgA la rumegătoare par a fi reglementate de modificări endocrine în timpul nașterii (Barrington ș.a., 2001).

Componenta secretorie polipeptidică înalt glicozilată este un alt factor imunitar prezent în colostru și lapte care interacționează cu sistemul imunitar adaptativ. Componenta secretorie derivată dintr-o porțiune a receptorului IgA nu numai că îmbunătățește funcționalitatea IgA atunci când este atașată la IgA (Phalipon ș.a., 2002), dar poate avea proprietăți protectoare directe. Motegi și Kita (1998) au arătat că această componentă secretorie a îmbunătățit funcția efectoare a eozinofilelor, indicând un posibil rol în reglarea inflamației țesutului mucoasei. Mai mult decât atât, componenta secretorie poate acționa ca un eliminator microbial. Izolată din colostrul uman, s-a demonstrat că această componentă secretorie leagă *Escherichia coli* enteropatogenă, protejând celulele epiteliale de invazia și aderența bacteriană (Perrier ș.a., 2006).

Componente imune legate de sistemul imunitar înăscut au fost identificate într-o mare varietate în colostru și lapte. Acestea includ neutrofile, macrofage, complement, oligozaharide, gangliozide, specii reactive de oxigen, proteine de fază acută (haptoglobina), factori imunomodulatori (incluzând multe citokine pro- și antiinflamatorii), ribonucleaze și o serie de peptide și proteine cu activitate antimicrobiană directă (Leitner ș.a., 2008).

Epiteliul mamar bovin în sine joacă, de asemenea, un rol activ în apărarea gazdei și sintetizează mai mulți factori imuni înăscuți, cum ar fi lactoferina (Sanchez ș.a., 1992), β -defensina (Swanson ș.a., 2004) și proteina de legare a lipopolizaharidelor (Miles, 2004). Mai mult, în componența membranelor care înconjoară globulele de grăsime din lapte secretate de celulele epiteliale mamare conțin multe peptide, proteine și lipide care sunt implicate în apărarea gazdei (Smolenski ș.a., 2007). Componentele cheie ale membranei globulelor de grăsime din lapte, cum ar fi xantinoxidaza și sfingolipidele, au activitate antibacteriană împotriva unei game largi de bacterii (Hancock ș.a., 2002).

2.2. Compoziția imunologică a colostrului bovin

Colostrul bovin constă dintr-un amestec de secreții lactate și constituenți ai serului sangvin, în special imunoglobuline și alte proteine serice, care se acumulează în glanda mamară în perioada prepartum. Alți constituenți importanți ai colostrului includ leucocitele materne, factorii de creștere, hormonii, factorii antimicrobieni nespecfici ai citokinelor și nutrienții (Godden, 2019). Concentrațiile multora dintre aceste componente sunt mai mari în primele secreții recoltate după fătare (primul colostru muls), apoi scad constant la următoarele 6 mulsori (lapte de tranziție) pentru a atinge concentrațiile mai mici măsurate în mod obișnuit în laptele integral (tabel 2.1).

Tabel 2.1/ Table 2.1

Principalii constituenți din colostru și laptele de vacă (Godden 2019)

The main constituents of colostrum and cow's milk (Godden, 2019)

Parametri	Colostru	Lapte de tranziție		Lapte integral
	Zile de la fătare			
	1	2	3	>3
Densitate	1,056	1,040	1,035	1,032
Substanță uscată (%)	23,9	17,9	14,1	12,9
Grăsime (%)	6,7	5,4	3,9	4,0
Proteine totale (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
Cazeină (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
Albumină (%)	6,0	4,2	2,4	0,5
Imunoglobuline (%)	6,0	4,2	2,4	0,09
IgG (g/100 ml)	3,2	2,5	1,5	0,06
Lactoză (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
IgG-I (mg/l)	341	242	144	15
Insulină (mg/l)	65,9	34,8	15,8	1,1
Calciu (%)	0,26	0,15	0,15	0,13
Magneziu (%)	0,04	0,01	0,01	0,01
Potasiu (%)	0,14	0,13	0,14	0,15
Sodiu (%)	0,07	0,05	0,05	0,04
Clor (%)	0,12	0,1	0,1	0,07
Zinc (mg/100 ml)	1,22	—	0,62	0,3
Fier (mg/100 g)	0,20	—	—	0,05
Cupru (mg/100 g)	0,06	—	—	0,01
Vitamina A (mg/100 ml)	295	190	113	34
Vitamina D (UI/g fat)	0,89-1,81	—	—	0,41
Vitamina E (mg/g)	84	76	56	15
Tiamine (mg/ml)	0,58	—	0,59	0,38
Riboflavină (mg/ml)	4,83	2,71	1,85	1,47
Vitamina B ₁₂ (mg/100 ml)	4,9	—	2,5	0,6
Acid folic (mg/100 ml)	0,8	—	0,2	0,2

Imunoglobulinele colostrale

Un nivel minim de 50g de Ig (g/l) a fost sugerat a fi valoarea prag pentru colostrul de înaltă calitate. Nivelul de imunoglobuline indicat în tabelul 2.1 este o medie, dar în realitate nivelul de Ig prezintă variații uriașe în colostrul vacilor (Gulliksen ș.a., 2008).

Această recomandare se bazează pe studii care arată rate semnificativ mai mari de concentrații inadecvate de Ig serice la vițeii care primesc colostru cu conținut de IgG sub această limită (Bielmann ș.a., 2010).

Butler (1969) a descris cinci clase de Ig în colostrul bovin, IgG1, IgG2, IgM, IgA și IgE. Distribuția colostrală a acestora este de aproximativ 85-90% IgG, 7% IgM și aproximativ 5% IgA, în timp ce IgG1 reprezintă aproximativ 80 până la 90% din totalul IgG. IgE este prezentă și ea în colostru, dar în cantități foarte mici.

Funcția imunologică a imunoglobulinelor este cuprinzătoare și depinde de clasă. IgG și IgM au o serie de funcții printre care activarea reacțiilor bacteriolitice este cea mai importantă (Butler, 1969). De asemenea, ele sporesc recunoașterea și fagocitoza bacteriilor de către leucocite. IgM este considerată a fi mai eficientă decât IgG în funcțiile menționate, dar este prezentă în cantități mai mici (Carp-Cărare, 2002). Deși este prezentă în cantități și mai mici, IgA exercită o protecție locală importantă împotriva tulburărilor de la nivelul intestinului prin prevenirea aderenței bacteriilor enteropatogene la celulele epiteliale ale mucoasei. În plus, ea neutralizează virusii și toxinele bacteriene și aglutinează antigenele. Deși nu este bine înțeles, transferul colostrăl de IgE apare și poate fi important în asigurarea unei protecții timpurii împotriva paraziților intestinali (Chase ș.a., 2008).

După absorbția în circulația vițelului, durata imunității pasive este foarte variabilă și depinde în mare măsură de cantitatea totală de Ig consumată și absorbită în primele 24 de ore de viață (Godden, 2009). Rata de descompunere a anticorpilor colostrali poate fi influențată de mai mulți factori, inclusiv infecții virale active sau vaccinare.

Leucocitele colostrale

Leucocitele colostrale includ macrofage, limfocite T și B și neutrofile. La bovine, neutrofilele predomină în timpul inflamației timpurii, în timp ce macrofagele și limfocitele (celule mononucleare) sunt populația majoră de celule din colostrul și laptele provenit din glanda mamară sănătoasă (Larson, 1980; Wheeler, 2007). S-a sugerat că rolul lor funcțional este de a îmbunătăți răspunsul limfocitelor la mitogeni nespecfici, de a crește fagocitoza și capacitatea de a ucide bacteriile și de a stimula răspunsul imun umoral (Donovan ș.a., 1998).

Administrarea colostrului cu leucocite maternelor a fost asociată la nou-născuți cu răspunsuri imune modificate (Langel ș.a., 2015). Celule mononucleare din sângele vițeilor care au consumat colostru cu leucocite maternelor au dezvoltat capacitatea de activare a răspunsurilor imune mediate celular până la vârsta de 1 săptămână, comparativ cu vârsta de 3 săptămâni în cazul vițeilor care au consumat colostru fără leucocite (Reber ș.a., 2005).

Atât congelarea, cât și tratamentul termic al colostruluiucid majoritatea, dacă nu chiar toate leucocitele colostrale (Godden, 2008). Diferențe semnificative în procentul și gradul de activare a celulelor mononucleare din sânge au fost obținute între vițeii care primesc colostru conținând leucocite materne, comparativ cu vițeii care au consumat colostru matern fără leucocite sau colostru înghețat (Reber ș.a., 2005, Langel ș.a., 2015). Celule mononucleare din sângele vițelilor de o zi care au consumat colostru cu leucocitele materne au fost semnificativ mai receptive la virusul diareei virale bovine, comparativ cu vițeii de o zi care au primit colostru înghețat sau colostru fără leucocite (Donovan ș.a., 2007).

Deși cercetările actuale nu au evaluat gradul de diferență între răspunsurile induse de leucocitele colostrale din colostrul mamei unui vițel versus leucocite colostrale de la o altă mamă, studiile realizate la purcei sugerează că efectele leucocitelor colostrale asupra imunității mediate de celulele neonatale sunt mai mari atunci când colostrul conține leucocite de la mama naturală a nou-născutului (Bandrick ș.a., 2014).

În ceea ce privește efectul leucocitelor colostrale asupra răspunsurilor la vaccin, Meganck ș.a., 2016, au evaluat răspunsurile umorale și mediate celular la tetanos. Studiul comparativ s-a realizat între vițeii vaccinați la vârsta de 2, 5 sau 10 zile, care au primit zer colostrat combinat cu leucocite materne adăugate și vițeii hrăniți numai cu zer colostrat. Rezultatele au sugerat că leucocitele colostrale au influențat atât răspunsurile mediate de celulele specifice anatoxinei tetanice, cât și răspunsurile umorale la viței, iar efectele măsurate au variat substanțial pentru vițeii vaccinați la vârsta de 2, 5 respectiv 10 zile.

Nutrienți și factori nonnutritivi

Colostrul conține cantități mari de nutrienți și factori biologici activi non-nutritivi care stimulează maturarea și funcționarea tractului gastrointestinal neonatal.

Conținutul total de substanță uscată (%) în colostrul și laptele integral la vacile Holstein a fost în medie de 23,9%, respectiv 12,9% (tabelul 2.1). O mare parte din creșterea solidelor din colostru este atribuită unei creșteri de peste 4 ori a conținutului de proteine comparativ cu laptele, acest lucru fiind cauzat de creșteri semnificative ale conținutului de Ig și cazeină. Conținutul de grăsime brută al primului colostru la vacile Holstein (6,7%) este, de asemenea, semnificativ mai mare decât în lapte (3,6%). Energia din grăsimi și lactoza din colostru este esențială pentru termogeneză și reglarea temperaturii corpului.

Așa cum se observă în tabelul 2.1, conținutul multor constituenți prezenți și în laptele integral, respectiv anumite vitamine și minerale, se găsesc, de asemenea în concentrații crescute în colostru bovin.

Factorii non-nutritivi care se găsesc în niveluri crescute în colostru includ, dar nu sunt limitați la factori de creștere, hormoni, citokine și factori antimicrobieni nespecfici. Inhibitorul tripsinei, un compus găsit în colostru în concentrații de aproape 100 de ori mai mare decât în lapte, servește la protejarea imunoglobulinelor și a altor proteine de degradarea proteolitică din intestinul vițelului nou-născut (Fischer ș.a., 2018).

Componentele bioactive cu activitate antimicrobiană includ lactoferina, lizozima și lactoperoxidaza (Elfstrand ș.a., 2002). Oligozaharidele pot oferi protecție împotriva agenților patogeni acționând ca inhibitori competitivi pentru locurile de legare de pe suprafețele epiteliale ale intestinului. De asemenea, s-a sugerat că anumite oligozaharide din colostru pot contribui la dezvoltarea microbiomului intestinal servind ca substrat pentru microorganisme benefice precum *Bifidobacterium spp*, deși această ipoteză necesită un studiu mai aprofundat (Fischer ș.a., 2018).

Factorii de creștere din colostrul bovin includ factorul de creștere beta-2 transformant, hormonul de creștere și insulina. Factorii de creștere colostrali insulin-like I și II pot fi cheia în reglementarea dezvoltării tractului intestinal al vițelilor nou - născuți, inclusiv prin stimularea creșterii mucoasei, sinteza ADN-ului intestinal și creșterea în dimensiuni a vililor intestinali, rezultând o capacitate de absorbție sporită (Hammon ș.a., 2013).

Un alt factor interesant și potențial benefic găsit în titruri ridicate în colostru este microARN (miARN). MiARN-urile sunt molecule de ARN scurte, necodificate, care pot regla expresia genelor la nivel posttranscripțional și ar putea fi o posibilă metodă de semnalizare postnatală de la mamă la nou-născut. Cu toate că sunt necesare studii pentru a descrie semnificația lor funcțională la viței, cercetările timpurii la alte specii sugerează că, odată absorbite de nou-născuți, miARN-urile din colostru pot fi importante în diferențierea și dezvoltarea funcțională a epitelului intestinal și ar putea juca, de asemenea, un rol important în maturarea sistemului imunitar al nou-născuților (Izumi ș.a., 2014; Chen ș.a., 2016).

Acești nutrienți și factori non-nutritivi, alături de beneficiile imunoglobulinelor, pot contribui pe termen scurt și lung, la îmbunătățirea ratei de creștere, vârsta redusă la prima fătare, creșterea producției de lapte în prima și a doua lactație și reducerea tendinței de sacrificare în timpul primei lactații (Faber ș.a., 2005). Sunt necesare însă cercetări suplimentare pentru a investiga conceptul de programare epigenetică sau imprimare a efectelor colostrului în sănătatea și performanța vițelilor atât pe termen scurt, cât și pe termen lung (Hammon ș.a., 2013).

2.3. Factori care influențează calitatea imunologică a colostrului

Mai multe studii au stabilit faptul că în colostru bovin există o variație uriașă a conținutului de IgG. Într-un studiu realizat de Gulliksen ș.a. (2008) conținutul de IgG colostrual a variat de la 4 la 235 g/l cu o medie de 45 g/l. În total, 57,8% din probe conțineau o concentrație mai mică decât 50 g IgG/l. Pritchett ș.a. (1991) au raportat o concentrație colostruală de IgG1 cu o valoare medie de 48,2 mg/ml. Mai multe studii au abordat cauzalitatea acestei variații și au fost elucidată o serie de factori de risc.

Rasa

Quiqley ș.a. (2000) au măsurat conținutul de Ig colostrală pentru cinci rase diferite și au găsit un conținut variabil al diferitelor clase de Ig. Vacile din rasele Ayrshire și Jersey au avut cele mai mari concentrații de IgG, în timp ce vacile din rasele Brown Swiss, Guernsey și Holstein au avut cea mai mică concentrație de IgG. Rasa Jersey a avut cea mai mare concentrație de IgG, IgA și IgM dintre toate rasele studiate, la rasa Holstein concentrația de IgG a fost cea mai mică, iar la rasa Guernseys IgA și IgM au avut valori reduse. O posibilă explicație a variației între rase poate fi diferența potențialului de producție, de la rasele cu randament redus obținându-se un colostru de calitate superioară în comparație cu rasele cu randament ridicat (Conneely ș.a., 2013).

Parietatea

Vacile mai în vârstă au fost expuse la antigene pentru o perioadă mai lungă de timp decât vacile mai tinere și, prin urmare, produc colostru cu niveluri mai mari de imunoglobuline. Cea mai semnificativă diferență se găsește între vaci aflate la a patra lor lactație sau mai mult și vaci la prima sau a doua lactație (Tyler ș.a., 1999; Moore ș.a., 2005; Gulliksen ș.a., 2008). Cu toate acestea, nu există dovezi pentru eliminarea colostrului de la juninci, deoarece majoritatea studiilor raportează diferențe nesemnificative între colostrul de la vacile primipare comparative cu cele pluripare (Bielmann ș.a., 2010; Kehoe ș.a., 2011)..

Durata perioadei de înțarcare

Scurtarea perioadei de înțarcare de la 60 de zile la 40 de zile nu a determinat diferențe în concentrațiile de imunoglobuline colostrale (Annen ș.a., 2004; Rastani ș.a., 2005; Shoshani ș.a., 2014). În schimb, Mayasari ș.a. (2015) au comparat vaci care au avut o perioadă de înțarcare de 60, 40 și 0 zile și au constatat că vacile care nu au avut deloc repaos mamar au avut concentrații mai mici de IgG și IgM în colostru, comparativ cu vacile cu 30 sau 60 de zile de înțarcare. Susținând constatările anterioare, nu există diferențe în concentrațiile de IgG și IgM între vacile cu repaos mamar de 30 și 60 de zile (Mayasari ș.a., 2015).

Furajarea în perioada repaosului mamar

Deși pare rezonabilă presupunerea că nutriția vacii din perioada de repaos va influența într-o oarecare măsură calitatea colostrului, deoarece procesul de colostrogeneză are loc cu câteva săptămâni înainte de fătare, relația directă dintre nutriția vacilor și calitatea colostrului nu a fost prea mult studiată.

Lacetera ș.a., 1996, au raportat că vacile suplimentate cu injecții de seleniu și vitamina E la sfârșitul perioadei de gestație au produs un volum mai mare de colostru comparativ cu vacile nesuplimentate.

Dunn ș.a., 2016, au constatat că suplimentarea cu furaje concentrate în perioada de înfărcare nu a avut niciun efect asupra concentrației colostrale de IgG, a randamentului de IgG sau a conținutului de grăsimi, proteine și lactoză, însă vacile din acest grup au înregistrat o producție mai mare de colostru la fătare și la primele 8 mulsori postpartum.

Aragona ș.a., 2016, au raportat că suplimentarea cu acid nicotinic timp de 4 săptămâni prepartum a crescut concentrația de IgG în colostru de la 73,8 la 86,8 g.

Vaccinarea în perioada repaosului mamar

Studii recente au arătat că vaccinarea vacilor gestante și a junincilor în ultimele 3 până la 6 săptămâni de gestație au ca rezultat creșterea concentrațiilor de anticorpi colostrali specifici și anticorpi serici specifici la viței pentru unii agenți patogeni comuni, ca *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, rotavirus și coronavirus (Waltner-Toews ș.a., 1985, Jones ș.a., 1988, Hodgins ș.a., 1996, McNulty ș.a.1987, Kohara ș.a., 1997)

Sezonul fătării

Gulliksen ș.a. (2008) au realizat un studiu pe vaci Roșii Norvegiene care a arătat o creștere semnificativă a conținutului de IgG colostrală în timpul și după sezonul de pășunat, care a scăzut în lunile de iarnă. Autorii au concluzionat că schimbările sezoniere pronunțate din climatul norvegian și, prin urmare, diferențele în ceea ce privește hrana și cazarea animalelor, pot justifica cel mai probabil variația sezonieră constatată din studiul lor.

Coroian ș.a., 2013, au constatat că în colostrul de bivoliță toți compușii fizico-chimici, cu excepția lactozei, au prezentat valori mai ridicate în sezonul de vară. Hrănirea specifică în sezonul estival (pe pășune) a condus la obținerea unui colostru mai concentrat în substanța uscată, acizi grași și colesterol.

Carp-Cărare M. ș.a. (2002) au observat faptul că, valorile maxime ale IgG serice la bovine sunt înregistrate în perioada august-octombrie, iar cele minime sunt primăvara (martie-mai). De asemenea, procentul de imunoglobuline a fost mai ridicat la vițeii crescuți în grup și pe așternut și mai scăzut la cei ținuți în boxe individuale și în absența așternutului.

Aceste diferențe între cercetări pot fi puse pe seama zonei geografice și a variațiilor condițiilor climatice.

Timpul de recoltare a primului colostru

Concentrația de imunoglobuline colostrale este cea mai mare imediat după fătare, dar începe să scadă treptat în timp dacă recoltarea este întârziată. Concentrația de IgG colostrală a scăzut cu 3,7% cu fiecare oră în care primul muls a fost întârziat după fătare din cauza secreției postnatale a glandei mamare deoarece s-a produs efectul de diluare

(Morin ș.a., 2010). Într-un alt studiu, întârzierea recoltării colostrului timp de 6, 10 sau 14 ore după fătare a dus la o scădere cu 17%, 27% și respectiv 33% a concentrației de IgG colostrale (Conneely ș.a., 2013).

Volumul primului colostru

Pritchett ș.a., 1991, au observat că vacile care produc mai puțin de 8,5 kg de colostru la prima mulsoare au un colostru de calitate superioară (> 50 g IgG/l) comparativ cu vacile cu o producție mai mare. O posibilă explicație ar fi efectele diluante. Studii mai recente raportează că nu există o relație predictibilă puternică între concentrația de IgG colostrală și cantitatea colostrului la prima mulsoare (Grusenmeyer și colab, 2006, Baumrucker ș.a., 2016).

Numărul de celule somatice

Potrivit lui Nia ș.a. (2010) numărul de celule somatice (SCC) scade conținutul de Ig din colostru și, prin urmare, și absorbția în organismul vițelului. Acest lucru este susținut de Gulliksen ș.a., (2008) care au raportat că vacile care au un număr de $SCC > 50.000$ celule/ml, măsurat după fătare, au fost mai predispuse să producă colostru cu un conținut de IgG < 30 g/l comparativ cu vacile cu un număr de SCC mai mic. Gulliksen ș.a. (2008) nu au găsit nici o asocierie între numărul de SCC măsurat în lactația anterioară și conținutul ulterior de IgG colostrăl, ceea ce înseamnă că laptele din lactația anterioară nu ar influența calitatea colostrului din următoarea lactație.

Starea de sănătate

Concentrația componentelor imune din lapte variază considerabil între vacile sănătoase. În probele de lapte colectate dintr-un efectiv de 189 de vaci sănătoase, s-au înregistrat mai mult de 20 de diferențe în concentrațiile de lactoferină. În mod similar, Fonteh ș.a., 2002 au înregistrat mari diferențe individuale în concentrațiile de lactoperoxidază în laptele caprelor și vacilor sănătoase studiate. O astfel de diferență semnificativă între animale indică o oportunitate de a alege laptele cu un conținut ridicat de factori imuni și a forma efective speciale pentru exploatare comercială.

2.4. Testarea calității colostrului în fermă

Măsurarea calității colostrului în fermă trebuie să fie o metodă fiabilă, precisă și ușor de executat. Este dificil de prezis, pe baza unor metode precum inspecția vizuală, dacă colostru colectat va fi de calitate înaltă (> 50 g/l IgG).

Colostrometrul, un instrument hidrometru care estimează concentrația IgG prin măsurarea greutății specifice, poate fi util pentru a diferenția colostrul de înaltă calitate de cel de calitate scăzută (greutatea specifică $> 1,050$ aproximează IgG > 50 g/l). Dezavan-

tajul este că factori precum conținutul de grăsime și temperatura colostrului afectează citirea hidrometrului (Pritchett ș.a., 1991).

Studiile recente au validat refractometrul, un instrument care măsoară procentul de solide într-o soluție, ca fiind un instrument de încredere pentru determinarea IgG din colostru și serul bovin (Quigley ș.a., 2002, Chigerwe ș.a., 2009; Biemann ș.a., 2010; Morrill ș.a., 2012). Refractometrul este mai puțin afectat de temperatură și mai durabil decât colostrometrul de sticlă. Refractometria oferă o aproximare a concentrației de imunoglobuline serice deoarece imunoglobulinele constituie o proporție mare de proteine din serul vițelor nou-născuți, iar între acestea IgG ocupă cel mai mare procent (Calloway ș.a., 2002).

Evaluarea proteinei totale serice (PST) cu ajutorul refractometrului este o metodă calitativă ce poate fi utilizată pentru a determina cu succes reușita transferului pasiv la viței (Calloway ș.a., 2002; Moore ș.a., 2009). Studiile au raportat că o valoare între 18% și 23% Brix este un interval adecvat pentru determinarea colostrului de bună calitate (IgG > 50 g /l).

CAPITOLUL 3 – BOLILE INFECȚIOASE ALE VIȚELOR NOU-NĂSCUȚI

CHAPTER 3 - INFECTIOUS DISEASES OF NEWBORN CALVES

Vițelii nou-născuți sunt predispuși la o varietate de boli frecvente. Dintre toate categoriile de animale dintr-o fermă, tineretul bovin până la înțărare are cele mai mari rate de mortalitate și morbiditate. Cea mai importantă patologie care afectează vițelii nou-născuți este reprezentată de boli cu simptome digestive și respiratorii.

Morbiditatea în primele 3 săptămâni de viață este cauzată de diaree (29%), pneumonie (25%) și boli ombilicale (29%) potrivit unui studiu realizat de Virtala ș.a. (1999) pe 410 vițeli din 18 ferme de vaci lapte din statul New York.

3.1. Diareea neonatală a vițelilor

Diareea neonatală a vițelilor este recunoscută la nivel mondial ca una dintre cele mai mari provocări atât pentru industria cărnii de vită, cât și pentru cea a produselor lactate.

Diareea neonatală este atribuită atât factorilor infecțioși, cât și celor neinfecțioși (Bartels, 2010). În dezvoltarea acestei boli sunt implicați mai mulți agenți patogeni enterici și, deși un singur agent patogen primar poate fi cauza diareei neonatale, coinfecția se observă frecvent la vițelii diareici. Prevalența incidenței agenților patogeni și a bolilor infecțioase neonatale poate varia în funcție de locația geografică a fermelor, de mărimea efectivului, de management și de presiunea infecțioasă a mediului înconjurător.

Tabel 3.1/Table 3.1

Receptivitatea vițelilor la diareea neonatală în funcție de vârstă și agentul patogen cauzal (Perianu T. ș.a., 2011, 2012)

Calf receptivity to neonatal diarrhea according to age and causative pathogen (Perianu T. ș.a., 2011, 2012)

Agent etiologic	Receptivitate (vârsta)	Aspectul fecalelor
Rotavirus	posibilă:0–28 zile; cel mai frecvent: 1-6 zile.	fecale cu sânge și mucus de culoare maro până la verde deschis.
Coronavirus	posibilă:0–28 zile; cel mai frecvent: 7-10 zile.	fecale apoase, gălbui.
<i>E. coli</i>	cel mai frecvent: 1-7 zile.	fecale apoase, alb-gălbui.
<i>Salmonella spp.</i>	cel mai frecvent: 1-7 zile.	fecale apoase, alb-gălbui.

Cei mai frecvenți agenți patogeni infecțioși implicați în diareea neonatală a vițelilor sunt virusurile (rotavirus, coronavirus, DVB-BM) și bacteriile (*E. coli*, cel mai frecvent tulpina enterotoxigenă, *Salmonella spp.*). Acești agenți infecțioși pot fi găsiți și în fecalele vițelilor sănătoși. Boala clinică se dezvoltă datorită unei relații între rezistența vițelului și presiunea infecțioasă.

Sursele de infecție sunt reprezentate de alți viței bolnavi, de viței mai mari trecuți prin boală sau de vacile care elimină cantități mari de germeni prin fecale, mastite sau infecții uterine (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011). Contaminarea vițelilor se face în cele mai multe cazuri pe cale digestivă, dar se poate realiza și pe cale ombilicală, transplacentară sau respiratorie. Odată apărută într-un efectiv, diareea neonatală capătă un caracter trenant, numărul vițelilor care se îmbolnăvesc crescând de la an la an. În unele efective poate căpăta un caracter exploziv, chiar în primul an de apariție, când peste 80% din viței se îmbolnăvesc (Velescu ș.a., 2004).

Factorii care influențează apariția unei infecții digestive, precum și severitatea exprimărilor clinice ale îmbolnăvirilor, sunt reprezentați de: vârsta animalelor, statusul imunologic al femelelor gestante, prezența anticorpilor specifici în colostru și nivelul acestora în serul sangvin al nou-născutului, temperatura ambientală, presiunea infecțioasă exercitată de microorganisme enteropatogene.

Trebuie subliniat rolul predispozant al privării de colostrum. Sensibilitatea nou-născutului este în corelație directă cu lipsa unui sistem de apărare specifică, organismul său fiind incapabil de a elabora imunoglobuline (Godden, 2009). Rezistența la infecții depinde de imunizarea mamei și de ingestia unei cantități adecvate de colostru în primele ore de viață. Receptivitatea și mortalitatea sunt mai ridicate la animalele nou-născute care au primit o cantitate insuficientă de colostru în primele zile de viață. Protecția nou-născuților este dependentă de prezența anticorpilor specifici la nivelul mucoasei intestinale (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011).

Diareea neonatală evoluează ca o endemie de grajd, cu caracter trenant sau staționar, morbiditatea și mortalitatea variind în limite foarte largi, în funcție de intensitatea cu care acționează factorii determinanți și cei favorizanți (Fecteau ș.a., 1997).

E. coli enterotoxigenă provoacă, de obicei, diaree apoasă profuză numai în primele patru zile de viață. Ceilalți agenți infecțioși comuni implicați în diareea neonatală a vițelilor provoacă leziuni ale mucoasei intestinale care determină diareea mixtă malabsorbtivă și apoasă (tabel 3.1; Mânzat, 2001; Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011).

Tabloul clinic în diareea neonatală este dominat de diareea gravă, care determină deshidratarea rapidă și brutală a animalelor. Din această cauză aspectul vițelilor este caracteristic: horipilație, piele lipsită de elasticitate, globii oculari sunt retractați (enofthalmie), perineul este murdărit cu fecale. Tot din cauza exsicozei și a hemoconcentrației consecutive, apare tahicardia și respirația superficială, tahipneică.

Temperatura se menține în limite normale sau este ușor crescută până în momentul colapsului, când scade sub normal, sfârșitul bolii fiind de regulă noaptea, mai ales la vițeii de 1-3 zile (Mânzat, 2001; Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011).

În general, leziunile morfopatologice sunt discrete și puțin caracteristice. Cel mai frecvent se constată aspectul deshidratat al cadavrului, cu tegumentul perineal murdărit de fecale diareice, congestii și hemoragii intestinale, inflamația formațiunilor limfoide din peretele intestinal și a limfonodurilor mezenterice. Conținutul intestinal este fluid, iar în stomac se găsește lapte coagulat. În formele septicemice, se pot găsi hemoragii subepicardice sau sub seroasa altor organe. Se mai pot găsi distrofii hepatice, renale sau cardiace, mai rar artrite sau meningite (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011).

Diagnosticul prezumtiv se poate stabili pe baza tabloului clinic, a leziunilor și a datelor epidemiologice. Confirmarea diagnosticului se face prin examene de laborator (Velescu, 1999).

Prognosticul diareei neonatale este dependent de forma clinică sub care evoluează boala. În formele grave, prognosticul este defavorabil, iar în formele benigne este rezervat (Velescu, 2002).

Atât în profilaxia cât și în combaterea diareei neonatale a vițelilor, accentul trebuie pus pe măsurile generale. Eliminarea agenților infecțioși din unitățile de creștere a animalelor este o operație extrem de dificilă, datorită prezenței ubicvitare a acestora în spațiile de cazare, dar mai ales datorită rezistenței lor crescute la acțiunea factorilor de mediu. Scăderea incidenței acestora se bazează pe respectarea măsurilor de profilaxie generală, care trebuie să urmărească reducerea surselor de contaminare, evitarea acțiunii factorilor favorizanți și creșterea rezistenței organismului prin asigurarea unor condiții corespunzătoare de întreținere și exploatare. Menținerea unei densități optime a animalelor în adăposturi, respectarea regulilor de igienă și asigurarea unei sanitații corespunzătoare, contribuie la scăderea presiunii infecțioase și la prevenirea contaminării nou-născuților (Mânzat, 2001; Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011)..

Profilaxia începe încă din viața intrauterină a vițelului, prin administrarea unor rații furajere echilibrate și de bună calitate vacilor gestante și prin respectarea repausului mamar. Respectarea riguroasă a regulilor de igienă a fătării, alăptării și a creșterii în general, este esențială. Maternitățile în care nu se întreține o curățenie corespunzătoare, care nu sunt dezinfectate după fiecare serie de fătări și nu funcționează după principiul populării și depopulării totale, contribuie mai mult la difuzarea infecțiilor decât la prevenirea lor. Măsurile de profilaxie vizează și izolarea vacilor cu mamite și infecții uterine (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011)..

Cea mai importantă măsură care vizează scăderea incidenței diareei neonatale, indiferent de situația epidemiologică a efectivelor, se referă la asigurarea ingestiei unei

cantități suficiente de colostru de către nou-născut, într-un timp cât mai scurt posibil după parturiție, deoarece numai prezența anticorpilor specifici din lumenul intestinului subțire împiedică colonizarea enterocitelor cu agenții infecțioși prezenți în mediul de viață al nou-născuților (Jayappa ș.a., 2008). S-a demonstrat că, în cazul infecției cu rotavirus, imunitatea locală din lumenul intestinului subțire este mult mai importantă decât imunitatea sistemică, în stimularea unei rezistențe specifice eficiente. De aceea, se recomandă ca în fermele de vaci, când numărul animalelor recent fătate este mare, colostrul excedentar să se amestece cu lapte și să se administreze zilnic, cel puțin într-un tain, tuturor vițelilor până la vârsta de 30 de zile (Nadine Schmidt ș.a., 2018).

Tratamentul vițelilor bolnavi este complex și urmărește mai multe obiective: distrugerea agentului etiologic, restabilirea homeostaziei, creșterea rezistenței generale, susținerea energetică și combaterea diareei (Campler ș.a., 2015). Terapia de rehidratare orală, administrarea continuă a laptelui în prima lună de viață și utilizarea prudentă a antibioticelor sunt obiective importante în gestionarea cu succes a diareei neonatale (Bendali ș.a., 1999).

Pentru profilaxia specifică, în diverse țări au fost elaborate și comercializate numeroase vaccinuri pentru prevenirea diareei neonatale a vițelilor (Cătană, 2002, 2007).

Vaccinurile inactivate care conțin cel puțin antigenul K99 și se administrează la juninci sau vaci gestante, nu mai târziu cu 3-4 săptămâni înainte de fătare, induc formarea de anticorpi în sângele vacilor, anticorpi care se concentrează în colostru și protejează vițelii față de colonizarea intestinului subțire cu colibacili în primele zile de viață. Această protecție însă vizează numai infecția cu tulpinile ETEC, care sunt cele mai frecvente, însă nu și singurele capabile să producă infecția colibacilară la vițel. De aceea, aceste vaccinuri nu dau rezultate în toate efectivele (Durell ș.a., 2017).

Au fost create și vaccinuri mixte, în care la antigenul colibacilar K99 se asociază și alte antigene colibacilare, precum și antigene virale Rota și Corona. Vaccinurile inactivate se administrează parenteral, în mod obișnuit numai la animalele gestante în ultima fază și asigură un titru ridicat de anticorpi specifici în colostru și lapte, pentru o perioadă îndelungată de timp, care determină o reducere marcantă a incidenței infecției la nou-născuți (Cortese, 2009; Schmidt ș.a., 2018).

Diareea este, în general, cea mai frecventă cauză de morbiditate și mortalitate la vițelii preîntărcați. Prevenirea bolilor, deși preferabil, nu este întotdeauna posibilă în sistemele de creștere intensivă a vițelilor. Gestionarea adecvată a factorilor determinanți implicați în acest complex morbid este crucială pentru a evita pierderile economice suplimentare, impactul dezastruos asupra bunăstării animalelor și neplăcerile fermierilor (Dunn ș.a., 2017).

3.2. Sindromul respirator bovin

Sindromul respirator bovin (SRB) este cea mai importantă boală din punct de vedere economic în efectivele de viței de carne și este a doua cauză principală a morbidității și mortalității la vițelii de lapte. SRB este responsabil de 22,5% din decesele dinainte și 46,5% din decesele de după înțârcare în efectivele de viței din fermele de lapte (NAHMS, 2010). SRB este o boală multifactorială a cărei apariție și evoluție depinde foarte mult de factorii de stres și de condițiile de microclimat (Cătană 2002, 2007).

Cea mai mare provocare atunci când este vorba de sindromul respirator la vițelii sugari este legată de identificarea agenților patogeni virali și/sau bacterieni care sunt implicați în declanșarea bolii. Deși aceasta este o parte importantă a strategiilor de prevenire și tratament, cauza poate fi mai degrabă secundară în corelație cu factorii de risc. Identificarea factorilor de risc asociați cu SRB în efectivele de viței este un pas deosebit de important în controlul acestei boli (Earley ș.a., 1998).

O gamă largă de agenți infecțioși a fost implicată în SRB la viței. Agenții virali sunt reprezentați de virusul sincițial respirator bovin (BRSV), virusul parainfluenza-3 (PI3), adenovirusul bovin, coronavirusul bovin și rhinovirusul bovin. Alte virusuri mai frecvente, cum ar fi virusul diareei virale bovine (DVB-BM) și herpesvirusul bovin-I (BHV-I), sunt rareori implicate în pneumonia vițelilor, cu excepția cazului în care acești viruși ridică probleme în efectivele de reproducție (Carp-Cărare, 2001; Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011, 2012).

Agenții bacterieni cel mai frecvent incriminați în SRB la viței sunt reprezentați de *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* și *Histophilus somni* (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011, 2012). Și alți agenți bacterieni pot fi izolați din plămânii vițelilor afectați de pneumonii, de exemplu, *Actinomyces pyogenes*, care nu este considerat o componentă primară a SRB, ci mai degrabă un invadator secundar al plămânului deja afectat. *Salmonella spp.* sau *Escherichia coli* pot fi, de asemenea, izolate din plămânul pneumonic, dar, din nou, acestea sunt bacterii care obțin acces hematogen la plămâni ca o complicație a sepsisului și nu sunt considerate parte a complexului de boli respiratorii (Hulbert ș.a., 2016). *Pasteurella multocida* este cel mai frecvent asociată cu leziunile de bronhopneumonie fibrinopurulentă la vițelii de lapte (Hodgins ș.a., 1996). Acest lucru subliniază natura oportunistă a acestui microorganism de a se dezvolta în exces în plămânii deteriorați anterior de alte virusuri sau alte bacterii, cum ar fi *Pasteurella haemolytica*, asociere pe care unii autori o consideră ca fiind o relație sinergică. *Mannheimia haemolytica* a fost în mod tradițional cea mai des izolată bacterie din cazurile de pleuropneumonie fibrinoasă acută observate în cazul febrei de transport la vițelii de carne. *Mycoplasma spp.* și *Histophilus somni* se izolează frecvent din focarele de pneumonie împreună cu alte

microroganisme, rareori vor fi izolate ca bacterii singulare (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011).

Infecțiile respiratorii virale sunt frecvent urmate de infecții bacteriene, deoarece în urma infecției virale rezultă întreruperea integrității barierei epiteliale, scăderea activității mucociliare și creșterea vâscozității secrețiilor. Aceste modificări favorizează proliferarea bacteriilor comensale oportuniste în tractul respirator cu afectarea ulterioară a plămânilor (Velescu, 2002).

Sursele primare de infecție sunt reprezentate de vițeii bolnavi care elimină germeii prin secreții respiratorii, excreții, puroi (omfaloflebite), vacile adulte cu mamite bacteriene și cu infecții uterine și animale adulte purtătoare (Velescu, 2002).

Receptivitatea este influențată de statusul imun al vițelilor, de condițiile de igienă și de stabulație. Vițeii cu un status imun deficitar sunt mai vulnerabili la infecțiile respiratorii. Răspunsul imunitar specific poate fi îmbunătățit prin transferul pasiv de anticorpi derivați colostrăl sau prin vaccinarea directă a vițelului (Perianu ș.a., 2011, 2012).

Numeroase studii au examinat importanța eșecului transferului pasiv în morbiditatea și mortalitatea SRB. Davidson ș.a.(1981) au descoperit că vițeii cu niveluri scăzute de imunoglobulină au fost tratați pentru pneumonie mai devreme și mai mult decât vițeii cu niveluri ridicate de imunoglobulină și că, în unele grupuri, nivelurile scăzute de imunoglobulină au fost asociate cu o creștere a morbidității în cazurile de boli respiratorii. Alte studii nu au reușit să arate o asociere între nivelurile de imunoglobulină sau eșecul transferului pasiv și apariția bolilor respiratorii la viței. O explicație în această privință este că , de obicei, SRB apare la vițeii cu vârsta peste 2 luni, iar nivelul imunoglobulinelor specifice pentru mulți agenți patogeni ai SRB scad până la vârsta de 2 luni (Ellis ș.a., 1996).

Temperatura ambiantă este un factor important care afectează starea de sănătate a vițelilor. Umiditatea crescută și precipitațiile înrăutățesc capacitatea gazdei de a menține neutralitatea termică. De asemenea, vițeii tineri tind să transpire cantitativ mai mult decât adulții, iar vremea caldă îi poate predispune la deshidratare (Hulbert ș.a., 2016).

Incidența bolii poate fi afectată de durata de supraviețuire a agentului patogen ca aerosol și de concentrația agentului patogen în spațiul aerian. Umiditatea este un factor limitativ important care afectează supraviețuirea agentului patogen. Debitul adecvat de aer proaspăt în mediul ambiant este important pentru limitarea umidității și reducerea concentrației de gaze toxice. Fluxul adecvat de aer proaspăt și mișcarea direcțională adecvată a aerului sunt obiective importante ale ventilației (Martin ș.a., 1975b).

Supraaglomerarea vițelilor și densitățile excesive de stabulație au ca rezultat o transmisie crescută a agenților patogeni, mai ales dacă există amestecuri de grupe de vârstă. Supraaglomerarea este, de asemenea, un stres suplimentar (Martin ș.a., 1975c).

Semnele clinice ale sindromului respirator bovin depind de mulți factori, printre care vârsta animalului, microorganismul (microorganisme) cauzal (e) și stadiul bolii. Tabloul clinic general este reprezentat de: febră - conexiunea dintre SRB și febră este extrem de puternică, SRB este una dintre cele mai frecvente cauze ale febrei, iar febra este întotdeauna unul dintre primele semne ale complexului SRB -, apatie, inapetență, epiforă, dispnee, tuse, jetaj, puls accelerat (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Perianu ș.a., 2011, 2012).

În debutul bolii, plămânii și căile respiratorii sunt inițial iritate, astfel încât animalul va încerca să își curățe căile respiratorii cu o tuse ușoară, superficială (Martin ș.a., 1975a). Cel mai important factor care determină succesul terapiei este debutul precoce al tratamentului, care este de preferat să înceapă în această etapă. Tusea puternică, proeminentă, febra ridicată și starea generală alterată indică cazuri mai avansate, moment în care tratamentul devine dificil. SRB poate evolua ca o pneumonie acută, pneumonie severă care poate duce la deces sau ca boală tranzitorie care se poate rezolva după tratament sau poate progresa spre pneumonie cronică (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003; Mânzat, 2005; Perianu ș.a., 2011, 2012).

Diagnosticul se suspicionează pe baza tabloului clinic și se confirmă prin examene de laborator. Diagnosticul diferențial este dificil. Importanța distincției între agenții etiologici este discutabilă, deoarece prezentarea clinică și managementul bolii de obicei nu diferă semnificativ indiferent de agentul patogen implicat (Velescu, 1999). S-au realizat numeroase studii în care s-au depus eforturi pentru identificarea bacteriei primare ca agent patogen bazat pe analize de necropsie și examen histopatologic al leziunilor (Martin ș.a., 1989; Murray ș.a., 2013). Cu toate acestea, având în vedere că intervalului tipic de evoluție al bolii de la debut și până la moarte este de la câteva zile până la câteva săptămâni, nu se poate preciza sigur dacă leziunile reprezentative ale necropsiei sunt ale agenților inițiatori sau ale microroganismelor oportuniste care s-au dezvoltat ulterior. Unii cercetători au sugerat că un diagnostic prezumtiv al anumitor organisme poate fi posibil antemortem. De exemplu, animalele infectate cu *Mycoplasma bovis* sunt descrise ca „bolnavi cronici care nu reușesc să prospere, la care se observă lipsa creșterii în greutate și eșecul de a răspunde la tratament” (Martin ș.a., 1975b).

Eficacitatea și viabilitatea economică a vaccinării împotriva bolilor respiratorii la viței rămâne incertă (Ellis, 2017). Deși este disponibilă o literatură relevantă substanțială în acest sens, bazată pe constatări științifice solide, evaluarea eficacității vaccinurilor și interpretarea rezultatelor studiilor sunt complicate datorită caracterului multifactorial al SRB și al factorilor de stres care contribuie foarte mult la dezvoltarea bolii (Confer ș.a., 1998). În plus, SRB poate evolua diferit în funcție de variabilitatea sistemelor de creștere (Velescu, 2002; Perianu ș.a., 2003).

Vaccinuri vii modificate, vaccinuri inactivate sau subunități vaccinale sunt disponibile pentru majoritatea agenților patogeni ai SRB. În cea mai mare parte, cercetările relevante s-au concentrat asupra capacității acestor vaccinuri de a declanșa un răspuns imun specific sau de a reduce intensitatea manifestărilor clinice ale bolii (Ellis ș.a., 1996, 2007). Deși sunt disponibile pe piață numeroase vaccinuri, vaccinarea cu produse pentru agenții patogeni bacterieni este mult mai puțin folosită decât vaccinarea pentru agenții patogeni virali, deoarece eficacitatea este comparativ mai mică (Ellis, 2017). Eficacitatea redusă a vaccinării contra agenților patogeni bacterieni ar putea fi datorată momentului în care se realizează vaccinarea (vaccinul trebuie administrat înainte de expunerea la agenți patogeni), lipsa rapelului și lipsa de atenție asupra factorilor de risc primari (Cortese, 2009).

Anticorpilor colostrali reprezintă un factor crucial în prevenirea și protecția bolilor neonatale la viței, însă studiile recente au arătat că, după vaccinare, în prezența imunității derivate matern, vițeii sugari nu produc anticorpi specifici împotriva unor agenți patogeni implicați în SRB, cum ar fi virusul sincițial bovin (Tizard, 2013). În această situație, anticorpilor materni sunt adesea în contradicție cu imunopofilaxia și inhibă vaccinarea (Cortese, 2009). O investigație aprofundată a interacțiunii dintre anticorpilor materni și vaccinuri a demonstrat că prezența anticorpului matern a scăzut eficacitatea vaccinului și, prin urmare, protecția (Ellis, 2017). Deoarece anticorpilor maternali se descompun în rate variabile la nivel individual, standardizarea programelor de vaccinare a vițeilor la o anumită vârstă devine dificilă. Pentru a depăși această problemă, cercetările din ultimii ani s-au concentrat pe elaborarea unor scheme de vaccinare care să fie favorabile administrării colostrului. Strategiile actuale de vaccinare variază în funcție de calea de administrare (parenterală sau intranazală) și de tipul vaccinului (viu modificat sau inactivat). Pentru a oferi cea mai bună protecție pentru vițeii sugari și pentru a reduce impactul economic al SRB pentru producătorii din întreaga lume, este imperativ ca programele de vaccinare neonatală să atingă un nivel ridicat de eficacitate în prezența anticorpilor materni (Ellis ș.a. 2007, 2017; Xue, 2010).

CAPITOLUL 4 - ACTUALIZĂRI PRIVIND IMPORTANȚA STATUSULUI IMUN ÎN BOLILE NEONATALE LA VIȚEI CHAPTER 4 - UPDATES ON THE IMPORTANCE OF IMMUNE STATUS IN NEONATAL CALF DISEASES

În fiecare zi învățăm mai multe despre sistemul imunitar al bovinelor, dar în încercarea de a crește performanța și de a scădea costurile de producție, este ușor să uităm că, pentru a avea un efectiv sănătos și performant, trebuie să începem prin acordarea unei atenții deosebite vițelului nou-născut.

Eșecul transferului pasiv constituie o problemă legată atât de bunăstrarea animalelor, cât și de sănătatea publică, deoarece este responsabil pentru prevalența ridicată a cazurilor de boală și creșterea utilizării antibioticelor la viței (Earley și Fallon, 1998). De asemenea, problema are impact și în sfera economică, deoarece eșecul transferului pasiv crește perioada de întârziere, reduce viteza de creștere și scade rata de producție la prima și a doua lactație la vacile de lapte. Premisa de bază în această situație este reprezentată de prevenția și depistarea precoce a vițelilor cu risc de eșec al transferului pasiv (Weaver ș.a., 2000).

Viței care au un nivel seric de imunoglobuline adecvat sunt capabili, de cele mai multe ori, să combată infecțiile patogene mai repede decât vițelii cu un nivel scăzut de imunoglobuline serice, care trebuie să se mobilizeze pentru a oferi un răspuns imun pentru apărare. Cu ajutorul unui transfer pasiv de succes al anticorpilor colostrali, nu neapărat specific agentului patogen, un vițel este mai capabil să aibă o rată normală de creștere în primele 6 luni de viață (Quigley și Drewry, 2002).

Peste 50% din cazurile de diaree neonatală apar în prima săptămână de viață și doar 15% apar după a doua săptămână (Bendali ș.a., 1999). Bacteremia la vițelii nou-născuți crește severitatea diareei și riscul de moarte. Astfel, consumul timpuriu de colostru previne septicemia prin reducerea colonizării și a absorbției bacteriilor enterice patogene. De asemenea, imunoglobulinele care rămân după consumul colostrului în lumenul intestinal asigură o imunitate locală față de infecțiile virale. O altă cauză principală a morții vițelilor sugari este reprezentată de tulburările respiratorii, în special pneumonia, iar studiile au arătat că imunitatea colostrală protejează în mod normal vițelul de apariția pneumoniei la începutul vieții (Donovan ș.a., 1998, Uetake, 2013).

Colostrul care conține anticorpi materni oferă vițelilor nou-născuți imunitate pasivă și protecție împotriva unei game largi de boli infecțioase până când propriul său sistem imunitar produce cantități protectoare de anticorpi endogeni. Vaccinarea vacilor în ultima perioadă de gestație poate crește titrul de anticorpi specifici în colostrul lor, ceea ce duce la creșterea titrurilor de anticorpi serici la viței.

Concentrația anticorpilor materni scade în primele două săptămâni după naștere, în timp ce producția de anticorpi endogeni începe să crească. Pe măsură ce imunitatea pasivă începe să scadă, este de preferat implementarea unui protocol de imunizare activă rapidă a vițelului, astfel încât să nu existe nicio lacună în protecția specifică după scăderea anticorpilor materni. Sinteza endogenă de IgG începe, de obicei, în prima zi după naștere și concentrația sa crește constant, în timp ce IgG maternală scade exponențial. Trecerea de la imunitatea maternă dobândită pasiv la imunitatea activă endogenă are loc de la 2 până la 6 săptămâni de viață și reprezintă o schimbare drastică în viața vițelului (Hassig ș.a., 2007).

Studiile au demonstrat că anticorpii colostrali dobândiți pasiv pot totuși inhiba răspunsul imun activ al vițelului (Larson ș.a., 1998; Hodgins și Shewen, 2000; Larsen ș.a., 2001). Vaccinarea vițelilor în prima lună de viață, când anticorpii materni încă sunt prezenți, iar sistemul imunitar al gazdei este imatur, este problematică. Deși sunt disponibile vaccinurile pentru agenții patogeni respiratori virali și bacterieni, imunitatea pasivă reziduală la vițeele tineri poate limita răspunsul detectabil al anticorpilor la vaccinare la o vârstă fragedă. Totuși, utilizarea vaccinurilor vii modificate în cazul rinotraheitei infecțioase bovine și a diareei virale bovine stimulează un răspuns imun mediat celular semnificativ la vițeele cu imunitate pasivă reziduală la aceste boli.

Există o gamă largă de măsuri preventive care sunt fundamentale pentru sănătatea optimă a vițelilor în perioada de la naștere până la înțărare. Un accent pe prevenire este esențial, limitând necesitatea unei intervenții ulterioare, în special în ceea ce privește gestionarea bolilor sistemului gastro-intestinal și respirator.

PARTEA II
CERCETĂRI PROPRII

CAPITOLUL 5 – SCOPUL, OBIECTIVELE ȘI CADRUL ORGANIZATORIC AL CERCETĂRILOR

CHAPTER 5 - PhD THESIS AIM, OBJECTIVES AND ORGANIZATIONAL FRAMEWORK OF THE RESEARCHES

Statisticile arată că mortalitatea vițelilor nou-născuți este de peste 5% în efectivele de viței de lapte, printre cauzele principale numărându-se statusul imun deficitar și bolile infecțioase.

Nivelul ridicat de mortalitate neonatală și dovezile privind persistența eșecului transferului imunității pasive la viței indică faptul că prea mulți viței consumă prea puțin IgG din colostru sau nu sunt în măsură să o absoarbă în mod eficient.

Modul cum este administrat colostrul, calitatea și cantitatea acestuia, cât și momentul în care acesta se administrează, sunt cei mai importanți factori de care depinde obținerea unei imunități solide a nou-născutului și implicit o protecție eficientă împotriva bolilor neonatale. Managementul perioadei colostrale s-a tot schimbat în decursul anilor în fermele de vaci de lapte din țară și din străinătate. S-au îmbunătățit metodele de testarea a calității colostrului, de administrare și sterilizare a acestuia, lucruri care au dus la scăderea riscului de transmitere directă a anumitor boli.

Totuși, bolile infecțioase din perioada neonatală încă joacă un rol important în menținerea sănătății vițelilor, iar prevenția acestora constituie o adevărată provocare. Un nivel scăzut al imunoglobulinelor din colostru se corelează cu imunitatea scăzută și implicit, predispoziția vițelului de a contacta rapid o boală. Prin aplicarea unor bune practici, aceste boli pot fi controlate aproape complet, ceea ce duce și la reducerea pierderilor asociate. Prin implementarea unor bune proceduri de gestionare și un protocol corect de profilaxie putem reduce semnificativ ratele de mortalitate a vițelilor din perioada neonatală.

Cercetările bibliografice cu privire la tema propusă au urmărit o documentare temeinică pentru a putea identifica toate aspectele referitoare la importanța statusului imun în patologia neonatală a vițelilor, atât pe plan național cât și internațional. Studiile de referință fac parte din baze de date naționale și internaționale care pot oferi informații actuale de specialitate și date de o înaltă acuratețe.

Cercetările întreprinse în cadrul tezei de doctorat au cuprins mai multe instituții și cadre organizatorice:

-  Laboratorul de Imunologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași;
-  Clinica de Boli Infecțioase din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași;
-  SynevoVet Iași - laboratorul medical veterinar care oferă cea mai mare gama de analize veterinare din Europa de Est.

BiogenVet Bacău - laborator medical veterinar pentru sănătatea animalelor de rentă;

Ferma zootehnică PANIFCOM din comuna Vlădeni, județul Iași.

Ferma zootehnică Panifcom este localizată în satul Broșteni, comuna Vlădeni din județul Iași. Este una dintre cele mai mari ferme din țară și este recunoscută pentru performanța în domeniul zootehnic în ceea ce privește producția de lapte și ameliorarea genetica a taurinelor. În anul 2015, a fost numită „Cea mai productivă ferma din România”, datorită unei lactații record pentru anul de control 2014-2015 de 16.817,19 litri.

Efectivul total actual al fermei este 1670 de animale din rasa Holstein, efectivul matcă fiind de 860 de vaci, cu o medie zilnică de 42 de litri de lapte. Cea mai productivă vacă din fermă oferă o medie de 70 de litri de lapte pe zi.

În fermă se păstrează doar produșii de sex feminin. Tăurașii se vând, cu excepția exemplarelor de mare valoare genetică. În anii 2018-2019, Ferma Panifcom a livrat 3 tăurași selecționați către Centrul Bos Genetic din Ungaria, un centru de selecție a taurilor de elită din Europa Centrala și de Est. Panifmont este primul tăuraș din România, care a fost acceptat în Centru, în anul 2018, pentru a fi donator de material seminal de mare valoare.

Prezenta teză de doctorat se dorește a fi un studiu amplu privind influența statusului imun asupra rezistenței dobândite a vițelilor nou-născuți față de bolile neonatale. În acest sens, obiectivele tezei de doctorat au fost următoarele:

- ❖ investigații epidemiologice, clinice și anatomopatologice privind prezența și prevalența infecțiilor la viței;
- ❖ diagnosticul de laborator în bolile infecțioase la viței;
- ❖ cercetări privind influența consumului de colostru asupra proteinelor serice totale la vițelii nou-născuți;
- ❖ cercetări privind influența consumului de colostru asupra lactoferinei serice la vițelii nou-născuți;
- ❖ cercetări privind influența consumului de colostru asupra haptoglobinei serice la vițelii nou-născuți;
- ❖ investigații privind răspunsul imun al vițelilor în urma aplicării unei scheme de imunizare activă;
- ❖ cercetări privind managementul colostrului și evaluarea transferului pasiv imun în ferme de vaci de lapte.

Rezultatele obținute în urma cercetărilor proprii au fost validate prin verificarea și compararea datelor obținute cu cele existente în literatura de specialitate și prin publicarea a 3 lucrări științifice în extenso în cadrul Congresului Științific Internațional: Life Sciences today for tomorrow, respectiv volumul Revistei de lucrări științifice a Facultății de Medicină Veterinară Iași.

CAPITOLUL 6 - INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE, CLINICE ȘI ANATOMOPATOLOGICE PRIVIND PREZENȚA ȘI PREVALENȚA INFECȚIILOR LA VIȚEI

CHAPTER 6 - EPIDEMIOLOGICAL, CLINICAL AND ANATOMOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING THE PRESENCE AND PREVALENCE OF INFECTIOUS DISEASES IN CALVES

Cercetările întreprinse au avut ca scop identificarea patologiilor de tip infecțios care afectează viței nou-născuți și stabilirea indicilor de morbiditate și mortalitate în cadrul efectivului de viței luat în studiu. Ancheta epidemiologică a fost realizată pe parcursul a 3 ani de studiu, respectiv în perioada 2017-2019. Starea de sănătate a vițelor a fost monitorizată zilnic. În urma anchetei epidemiologice, am notat în registru toți viței cu vârsta cuprinsă între 0 și 3 luni care au prezentat modificări clinice ale stării generale de sănătate.

6.1. Evaluarea condițiilor de creștere a vițelor

Vacile gestante sunt înțârcate la 210-215 zile de gestație. Pe toată perioada înțârcării primesc o rație furajeră echilibrată, adaptată cerințelor lor fiziologice. La 250 de zile de gestație vacile sunt mutate în zona de maternitate.



Fig. 6.1 Boxă de fătare (original)

Fig. 6.1 Calving box (original)

Când se declanșează travaliul, vaca este mutată într-o boxă curată și dezinfectată (fig. 6.1) și este supravegheată în permanență de către personalul medical veterinar. Imediat după fătare, vițelul este luat de lângă mama lui și este cazat într-o cușcă individuală (fig.6.2), cu așternut proaspăt de paie.

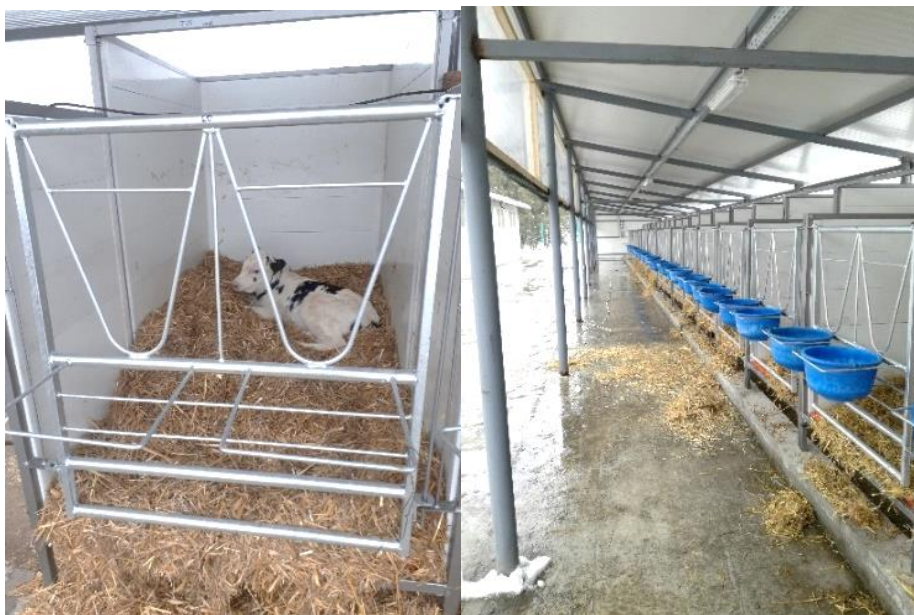


Fig. 6.2 Cuști individuale pentru vițelii nou-născuți (original)

Fig. 6.2 Individual cages for newborn calves (original)



Fig. 6.3 Administrarea laptelui la vițeii cu MilkTaxi (original)

Fig. 6.3 Administration of Milk to Calves with MilkTaxi (original)

În mod normal, vițeii sunt menținuți în aceste cuști până la vârsta de înțărare, respectiv de 2,5-3 luni, dar această perioadă poate varia în funcție de numărul de fătări din luna respectivă, care influențează direct gradul de aglomerare al cuștilor.

Vițelului nou-născut i se administrează colostru cu ajutorul unei sonde esofagiene în prima oră de viață. Până la vârsta de 1 lună, vițeii primesc 3 mese de lapte pe zi.

Laptele folosit este recoltat doar de la vacile clinic sănătoase și este pasteurizat cu ajutorul unui MilkTaxi prin încălzire la 60°C și apoi răcire la 42°C (fig.6.3). Acesta se administrează la găleată, de către personalul care are în îngrijire vițeii, sub atenta supraveghere a personalului sanitar-veterinar.

Începând cu vârsta de 38-40 de zile, vițeii primesc 3 mese de lapte praf pe zi, până la vârsta de înțărare (2,5-3 luni). La acești viței care urmează a fi înțărcați, se urmăresc în special dezvoltarea corporală și cantitatea de furaj consumată - doar acei viței care consumă suficient furaj vor fi înțărcați (Fulton, 2002).

După înțărare, vițeii sunt mutați în boxe comune, grupați în funcție de vârstă, talie și mărimea boxelor (fig.6.4).

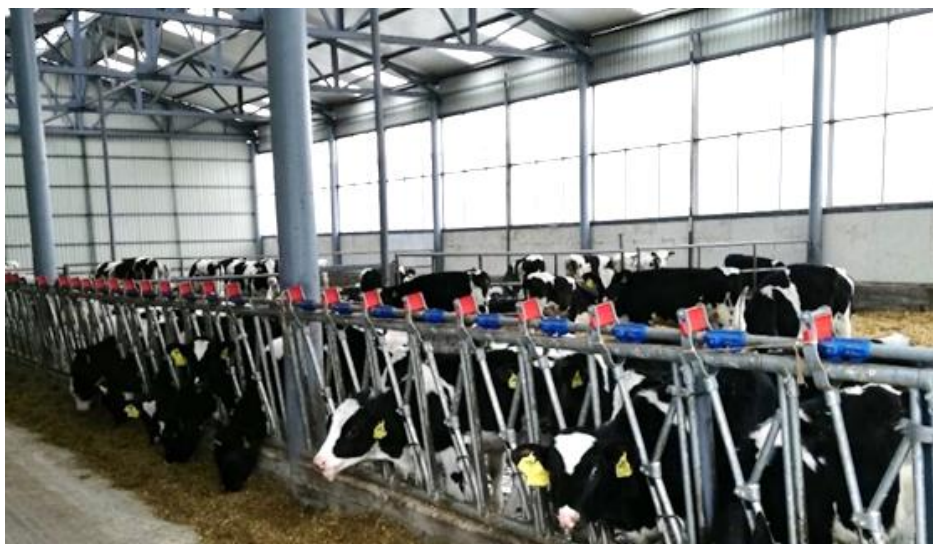


Fig. 6.4 Boxe comune de cazare a vițelilor (original)
Fig. 6.4 Common cages for housing calves (original)

6.2. Ancheta epidemiologică

Morbiditatea în primele 3 luni de viață este cauzată de tulburări digestive, boli respiratorii și infecții ombilicale, potrivit unui studiu realizat pe 410 viței din 18 ferme de vaci lapte din statul New York (Virtala ș.a., 1999). În efectivul de viței luat în studiu, morbiditatea la categoria de vârstă 0-3 luni a înregistrat o medie de 6,19%, cea mai mare

valoare înregistrându-se în anul 2017, cu media de 9,88%, iar cea mai mică în anul 2019, cu o medie de 4,71% (tabel 6.1).

Tabel 6.1/Table 6.1

Numărul de viței cu afecțiuni digestive și respiratorii
Number of calves with digestive and respiratory diseases

Efectiv viței 0-3 luni		2017	2018	2019	Total
		1863	2234	2419	6516
Viței bolnavi	nr.	184	106	114	404
	Mb %	9,88	4,74	4,71	6,19
Afecțiuni respiratorii	nr.	65	41	52	158
	Mb %	35,33	38,68	45,61	39,11
Afecțiuni digestive	nr.	119	65	62	246
	Mb %	64,67	61,32	54,39	60,89

În perioada anilor de studiu, morbiditatea afecțiunilor digestive predomină, înregistrând o medie totală de 60,89%, fiind urmată de afecțiunile respiratorii care înregistrează o medie totală de 39,11% (tabel 6.1). Cea mai mare medie a cazurilor de afecțiuni digestive a fost înregistrată în anul 2017 - 64,67%, iar cea mai mică medie în anul 2019 - 54,39 % (tabel 6.1, fig. 6.5). În ceea ce privește afecțiunile respiratorii, cea mai mare medie a fost înregistrată în anul 2019 - 45,61, iar cea mai mică rată în anul 2017 - 35,33% (tabel 6.1, fig. 6.5).

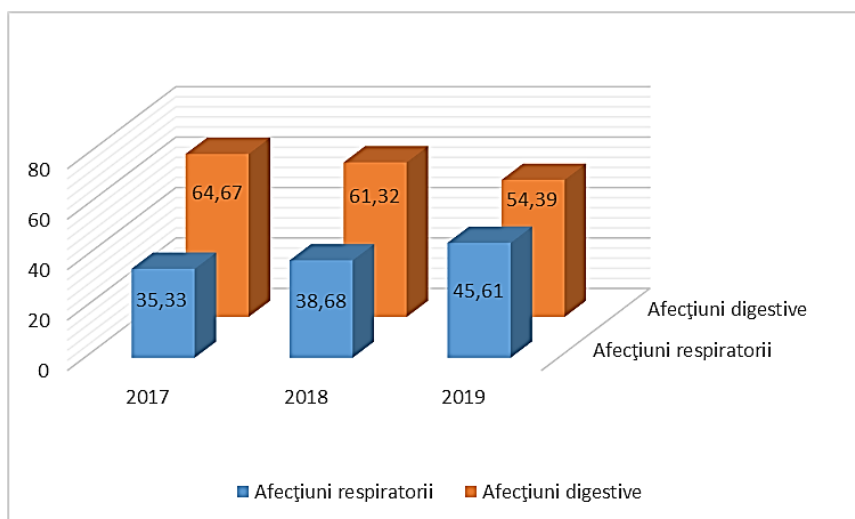


Fig. 6.5 Numărul de viței cu afecțiuni digestive și respiratorii
Fig. 6.5 Number of calves with digestive and respiratory diseases

Datele bibliografice privind mortalitatea în rândul vițeilor nou-născuți arată că variația între fermele de vaci de lapte a acestui indice este deosebit de mare, variind de la câteva procente la peste 20% (Martin ș.a., 1975a, b; Bendali ș.a., 1999; Razzaque ș.a., 2009).

În tabelul 6.2 se poate observa că în efectivul de viței luat în studiu în perioada 2017-2019, morbiditatea a înregistrat o rată de 6,20 %, iar rata letalității a fost de 15,10%, cu o rată de morbiditate de 0,94 %. Reprezentarea grafică este redată în fig. 6.5. În anul 2019, s-a înregistrat cea mai mare rată a letalității – 19,30%, iar în anul 2017 cea mai mică – 11,41% (tabel 6.2, fig. 6.6). În ceea ce privește mortalitatea, cea mai mare rată s-a înregistrat în anul 2017 – 1,13%, iar cea mai mică în anul 2018 – 0,81%.

Tabel 6.2/Table 6.2

Evoluția indicilor de morbiditate, mortalitate și letalitate
Evolution of morbidity, mortality and lethality indices

Anul	Viței 0-3 luni	Viței bolnavi nr.	Viței morți nr.	Mb %	L %	Mt %
2017	1863	184	21	9,88	11,41	1,13
2018	2234	106	18	4,74	16,98	0,81
2019	2419	114	22	4,71	19,30	0,91
Total	6516	404	61	6,20	15,10	0,94

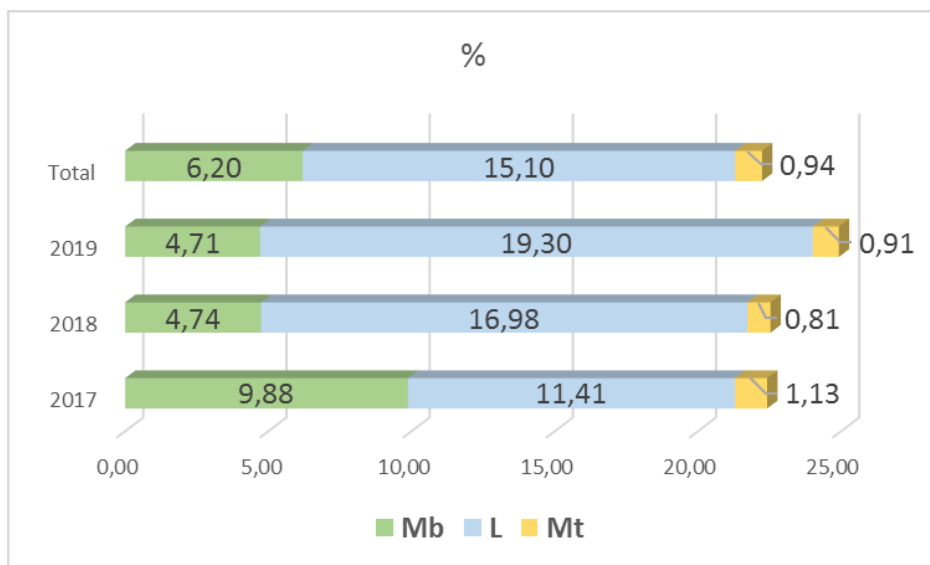


Fig. 6.6 Evoluția indicilor de morbiditate, mortalitate și letalitate
Fig. 6.6 Evolution of morbidity, mortality and lethality indices

Se poate observa că rata morbidității a scăzut semnificativ din anul 2017, de la un procent de 9,88% la 4,74% în 2018, respectiv 4,71% în 2019. Cauzele principale care au determinat apariția patologiilor de tip infecțios la categoria de vârstă 0-3 luni au fost supraaglomerația, factorii bioclimatici, precum temperatura scăzută, mai ales pe durata iernii, umiditatea crescută în padoc, deficiențe ale ventilației și imposibilitatea asigurării unei igiene sanitar-veterinare corespunzătoare. În anul 2018, aceste aspecte s-au îmbunătățit considerabil prin amenajarea unui grajd nou care oferă un confort sporit vițelor, ceea ce a determinat o scădere notabilă a numărului de afecțiuni la nivelul efectivului.

Rata letalității vițelor tinde să crească odată cu creșterea dimensiunii efectivului (Gulliksen ș.a., 2009). După cum se observă în tabelul 6.2, numărul total al vițelor în anul 2019 a crescut față de anii 2017 și 2018, iar rata letalității vițelor a crescut de la 11,41% în 2017 la 16,98 în 2018, respectiv 19,30% în 2019.

Tabel 6.3/Table 6.3

Vițee cu afecțiuni digestive și respiratorii pe categorii de vârstă
Calves with digestive and respiratory diseases by age categories

Nr. total de vițe -> bolnavi		2017		2018		2019		Total / %	
		184		106		114		404	
		nr.	%	nr.	%	nr.	%	nr.	%
Afecțiuni respiratorii	0-1 lună	8	12,31	7	17,07	7	13,46	22	13,92
	1-2 luni	23	35,38	22	53,66	18	34,62	63	39,87
	2-3 luni	34	52,31	12	29,27	27	51,92	73	46,20
	Total	65	41,10	41	26	52	33,00	158	39,11
Afecțiuni digestive	0-1 lună	59	49,58	41	63,08	36	58,07	136	55,28
	1-2 luni	44	36,97	20	30,77	22	35,48	86	34,96
	2-3 luni	16	13,45	4	6,15	4	6,45	24	9,76
	Total	119	48,4	65	26,4	62	25,2	246	60,89

În funcție de categoriile de vârstă care au prezentat interes în această anchetă epidemiologică desfășurată pe durata celor 3 ani, s-a observat că vițeele cu vârsta de peste 2 luni au fost cei mai afectați de infecțiile respiratorii – 46,20%, iar vițeele cu vârsta de 0-1 lună au prezentat predominant afecțiuni digestive – 55,28 % (tabel 6.3).

În anii 2017 și 2019, prevalența infecțiilor respiratorii a avut o rată mai mare la vițeele cu vârstă de 2-3 luni – 52,31 %, respectiv 51,92%, în timp ce în anul 2018 cei mai afectați au fost vițeele de 1-2 luni – 53,66% (fig. 6.7).

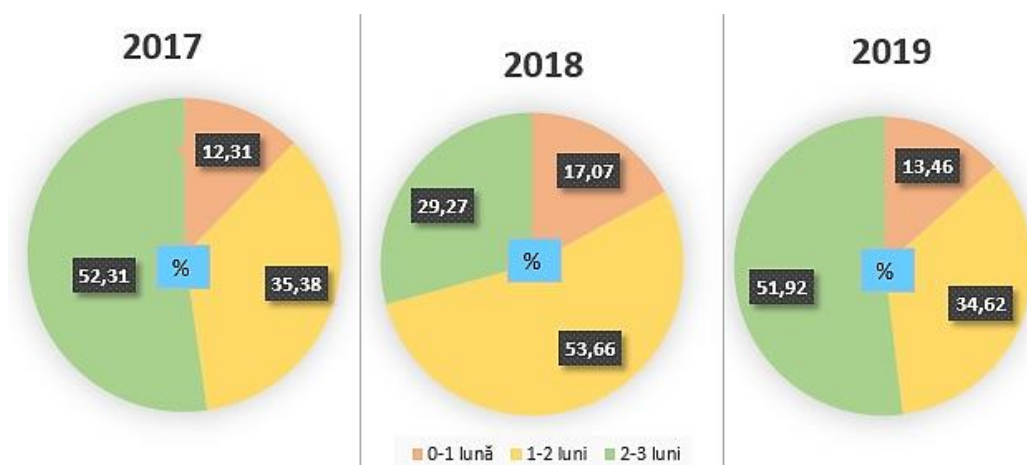


Fig. 6.7 Vițeii cu afecțiuni respiratorii pe categorii de vârstă
Fig. 6.7 Calves with respiratory diseases by age categories

Afecțiunile digestive s-au manifestat preponderent la categoria de vârstă 0-1 lună, cu medii de 49,58% în 2017, 63,08% în 2018, respectiv 58,07% în 2019 (fig. 6.8).



Fig. 6.8 Vițeii cu afecțiuni digestive pe categorii de vârstă
Fig. 6.8 Calves with digestive diseases by age categories

S-a constatat, de asemenea, că modificările stării generale de sănătate au un caracter sezonier. Afecțiunile respiratorii sunt întâlnite în sezoanele umede ale anului, în special primăvara – 65,12% și iarna – 61,48%. Acestea sunt favorizate de clima rece și de umiditatea care rezultă din imposibilitatea asigurării unei ventilații corespunzătoare a cuștilor și a grajdurilor (fig 6.9).

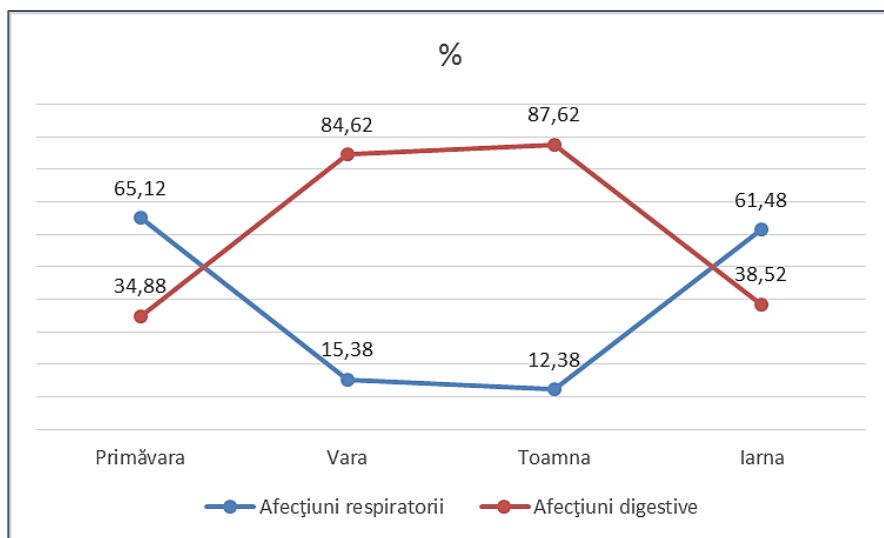


Fig. 6.9 Distribuția afecțiunilor pe sezoane climatice
Fig. 6.9 Distribution of diseases by climatic seasons

Afecțiunile digestive apar mai preponderent în lunile în care se înregistrează un număr mare de fătări (mai-iulie, septembrie-octombrie), fapt care duce la supra-aglomerarea padocurilor și favorizarea condițiilor de microclimat pentru răspândirea agenților etiologici cu rol în tulburările digestive (fig. 6.10). Boxele individuale devin insuficiente, iar fluxul de mutare al vișeurilor este grăbit. Se creează un stres care determină dezechilibre ce duc la alterarea stării de sănătate.

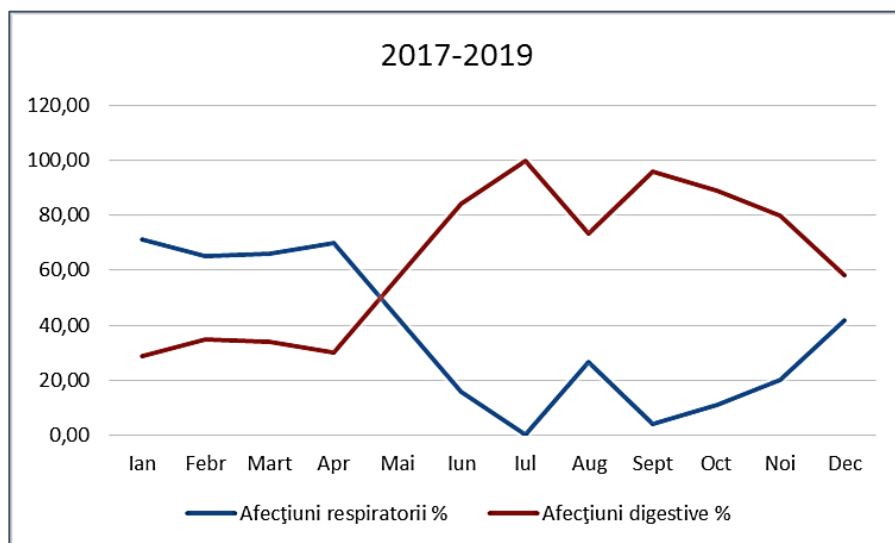


Fig. 6.10 Distribuția afecțiunilor pe luni
Fig. 6.10 Distribution of diseases by months

6.3. Aspecte anatomo-clinice

Procentul de vițeii morți cu afecțiuni digestive a fost aproape dublu - 52,4% comparativ cu procentul de vițeii morți cu afecțiuni respiratorii - 27,9% (fig.6.11).

Principalul simptom apărut în cadrul tulburărilor digestive a fost reprezentat de diaree (fig. 6.12). În majoritatea cazurilor aceasta a fost însoțită de febră. De obicei, cazurile afebrile s-au remis la scurt timp după aplicarea tratamentului simptomatic. La vițeii bolnavi, la care simptomele clinice nu au cedat tratamentului simptomatic, s-a observat deshidratare moderată, colică, tenesme și timpanism (Paul I., 2005).

Diareea a apărut în principal la vițeii cu vârsta între 3-21 zile. În majoritatea cazurilor aceasta prezenta un aspect apos, uneori spumos, de culoare alb - gălbuie sau galbenă (fig. 6.12 A), rar cu strii sangvinolente. Cazurile de vițeii morți cu semne digestive s-au datorat în principal diareei care nu s-a remis în urma tratamentului și a dus la un grad de deshidratare ridicat, inapetență și, în final, stării comatoase apărute în urma acidozei metabolice. De asemenea, moartea a survenit și în urma asfixierii determinată de presiunea masei gastrice în cazurile de timpanism supraacut (fig.6.12 B, 6.13).

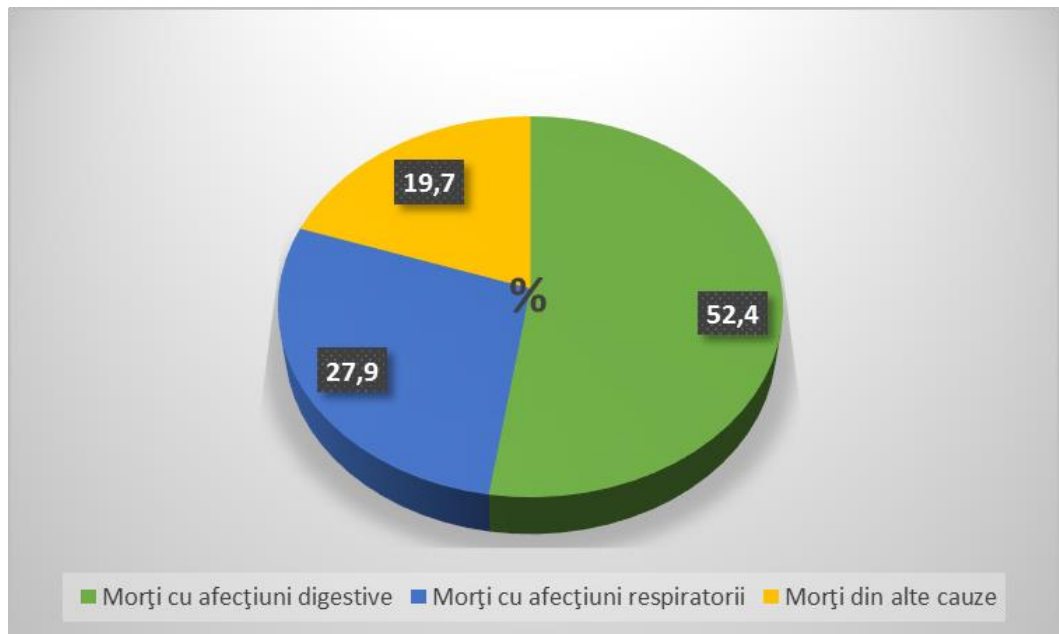


Fig. 6.11 Cauzele morții vițelilor
Fig. 6.11 Calf's death causes



Fig. 6.12 Vițel cu diaree - A; vițel cu timpanism ruminal acut - B (original)
 Fig. 6.12 Calf with diarrhea - A; calf with acute ruminal tympany - B (original)



Fig. 6.13 Vițel cu timpanism ruminal și semne de colică (original)
 Fig. 6.13 Calf ruminal tympani with signs of colic (original)

Semne clinice și leziuni anatomopatologice în afecțiunile digestive
Clinical signs and anatomopathological lesions in digestive disorders

Tabloul clinic și anatomopatologic în afecțiunile digestive	
Tabloul clinic	Tabloul morfopatologic
- diaree (fig 6.12); - febră; - apatie; - inapetență; - mucoase aparente palide; - deshidratare; -tren posterior murdar de fecale diareice apoase alb-gălbui, uneori hemoragice, urât mirositoare; - colică, tenesme, meteorism, bruxisme (fig. 6.13); - cahexie.	- tren posterior și mucoasa perineală murdară de fecale diareice (fig 6.11); - deshidratare, cahexie; - conținut intestinal fluid și conținut stomacal cu lapte nedigerat; - enterită cataral - hemoragică; - peteșii și necroze în mucoasa gastrică și intestinală, în special în ileon și jejun; - timpanism, anse intestinale destinse de gaze. - congestie intestinală și congestie hepatică (fig. 6.14)



Fig. 6.14 Congestie intestinală - A; ficat mărit în volum, congestie hepatică - B (original)
Fig. 6.14 Intestinal congestion - A; enlarged liver in volume, liver congestion - B (original)

În urma examenului necropsic, la vițeii care, înainte de moarte, au prezentat un tablou clinic predominant digestiv s-au observat leziuni de enterită cataral - hemoragică, însoțită de denudări ale mucoasei gastrice, peteșii și hemoragii la nivelul submucoasei, conținut intestinal spumos, lichid cu miros fetid. Ansele intestinale au fost destinse de gaze și uneori însoțite de invaginație. La unii viței, s-au întâlnit și leziuni de hepato și splenomegalie.

Tabel 6.5/Table 6.5

Semne clinice și leziuni anatomopatologice în afecțiunile respiratorii
Clinical signs and anatomopathological lesions in respiratory diseases

Tabloul clinic și anatomopatologic în afecțiunile respiratorii	
Tabloul clinic	Tabloul morfopatologic
- dipnee; - tuse (fig. 6.15 B); - jetaj (fig. 6.15 A); - epiforă (fig. 6.15 A); - febră; - apatie (fig. 6.15 A); - inapetență; - puls accelerat.	- mucoasă nazală palidă; - mucoasa traheală cu spumozități sau depozite muco-purulente; - congestie și edem pulmonar; - dilatație cardiacă (fig. 6.16 B); - bronhopneumonie serohemoragică (fig. 6.16 A); - ficat și splină mărite în volum.



Fig. 6.15 Epiforă, apatie, jetaj – A; tuse - B (original)
Fig. 6.15 Epiphora, apathy, watery nasal secretion - A; cough - B (original)

Pe perioada celor 3 ani luați în studiu, afecțiunile respiratorii au avut o rată de morbiditate de 39,11% (tabel 6.1) și au fost pe locul 2 la cauzele morții vițelilor cu vârsta de 0-3 luni, cu un procent total de 27,9% viței morți (fig. 6.11).

Modificările clinice respiratorii la vițelii afectați au fost reprezentate în principal de stări febrile, epiforă, jetaj, tuse, frecvent tahipnee și puls accelerat (tabel 6.5).



Fig. 6.16 Congestie pulmonară – A; dilatație cardiacă - B (original)

Fig. 6.16 Pulmonary congestion – A; cardiac dilation - B (original)

La examenul necropsic, leziunile principale au fost reprezentate de congestie și edem pulmonar, bronhopneumonie serohemoragică și dilatație cardiacă (fig. 6.16). În bronhopneumonia ab ingestis, pe secțiune, în pulmon se exprima lapte.

6.4. Concluzii parțiale

În urma investigațiilor epidemiologice, clinice și anatomopatologice privind prezența și prevalența infecțiilor la viței, s-au constatat următoarele aspecte:

1. În efectivul de viței luat în studiu, morbiditatea la categoria de vârstă 0-3 luni a înregistrat o medie de 6,20%. Rata letalității a fost de 15,10%, cu o rată de mortalitate de 0,94% în efectivul de viței cu vârstă de 0-3 luni.
2. Afecțiunile digestive au fost cele mai frecvente, înregistrând o medie totală de 60,89%, fiind urmate de afecțiunile respiratorii cu o medie totală de 39,11%. Vițelii

de peste 2 luni au fost cei mai afectați de infecțiile respiratorii – 46,20%, iar vițelii cu vârsta de 0-1 lună au prezentat predominant afecțiuni digestive – 55,28 %.

3. Diareea a apărut în principal la vițelii cu vârsta între 3-21 zile și prezenta un aspect apos, uneori spumos, de culoare alb - gălbuie sau galbenă, rar cu strii sangvinolente. Modificările clinice respiratorii la vițelii afectați au fost reprezentate în principal de stări febrile, epiforă, jetaj, tuse, frecvent tahipnee și puls accelerat.
4. Procentul de vițel morți cu afecțiuni digestive a fost aproape dublu - 52,4% comparativ cu procentul de vițel morți cu afecțiuni respiratorii - 27,9%.
5. Rezultatele obținute au fost comparative cu cele din literatura de specialitate consultată (Perianu T., 2011, 2012).

CAPITOLUL 7 - DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN BOLILE INFECȚIOASE LA VIȚEI

CHAPTER 7 - LABORATORY DIAGNOSTIC IN INFECTIOUS DISEASES IN CALVES

În vederea stabilirii unui diagnostic cert s-au recoltat probe atât de la animale cu semne clinice de boală, cât și de la animale clinic sănătoase.

7.1. Materiale și metode

Analizele imunocromatografice de detectare rapidă s-au efectuat în teren, utilizând două tipuri de teste comerciale rapide. Testele conțin un dispozitiv imunocromatografic cu flux vertical, în care antigenul de interes este captat pe membrană de un anticorp monoclonal specific, în timp ce un al doilea anticorp marcat de particule coloidale aurii va permite ca această captare să fie vizibilă. Sensibilitatea și specificitatea testelor sunt realizate prin utilizarea anticorpilor monoclonali. Urmând standarde înalte de calitate, testele sunt validate în comparație cu Multiscreen™ Ag ELISA Digestive-BIO K348 și Monoscreen™ AgELISA *Clostridium perfringens*-BIO K 269 pe o cantitate mare de probe.



Fig. 7.1 Kit de diagnostic rapid Rainbow Calf Scour: diluare probă - A; probe negative - B (original)
Fig. 7.1 Rainbow Calf Scour quick diagnostic kit: sample dilution - A; negative sample - B (original)

Huve Check Calf Scours se pretează pentru a identifica rotavirusul, coronavirusul, *Cryptosporidium* spp. și *Escherichia coli*, iar Rainbow Calf Scour (fig. 7.1 B), pe lângă cei 4 agenți patogeni, se pretează și pentru detecția infecției cu *Clostridium perfringens*. Probele de fecale au fost recoltate direct din rectul vițelilor cu ajutorul spatulei

din kit și, înainte de a fi puse în contact cu benzile de testare, au fost diluate și omogenizate într-un tub de analiză (fig. 7.1 A). Tuburile cu probele de fecale diluate și omogenizate, au fost lăsate în repaos timp de 10 minute pentru a permite lichidului să difuzeze de-a lungul benzilor și apoi au fost citite. Rezultatele obținute au fost comparative cu cele din literatura de specialitate consultată (Abuelo și Alves-Nores, 2016).

Metodele de diagnostic reprezentate de examene bacteriologice, copro-parazitologice, serologice, imunoenzimatic și de biologie moleculară au fost realizate în cadrul laboratoarelor Synevovet Iași și BiogenVet Bacău.

Reacția imunoenzimatică este o metodă de diagnostic utilizată pentru a detecta prezența unor anticorpi sau antigene dintr-o probă. Este o reacție cantitativă foarte sensibilă, cu aplicații diverse. Principiul reacției este reprezentat de interacțiunea dintre antigene și anticorpi marcați cu o enzimă, în prezența substratului enzimatic specific (Horhoge C., 2015). În funcție de elementul care se dorește a fi identificat, probele recoltate au fost analizate cu două tipuri de teste imunoenzimatic și anume:

-  ELISA indirectă, care s-a folosit pentru determinarea concentrațiilor de anticorpi anti-*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* și anti-*Neospora caninum* din ser.
-  ELISA de competiție, care permite identificarea anticorpilor anti-Herpes virus bovin tip 1 (BHV-1). Acest tip de test imunoenzimatic permite diferențierea animalelor vaccinate de cele nevaccinate și s-a folosit pentru detecția Ac IBR (gE) din serul sangvin.

Tehnica PCR este o metodă de amplificare enzimatică in vitro a unei anumite secvențe de ADN. Din punct de vedere chimic, reacția PCR este constituită din cicluri succesive de replicare in vitro. PCR a revoluționat complet detectarea ARN și ADN. PCR tradițional a avansat de la detectarea amplificării la punctul final al reacției, până la detectarea în timp real a acesteia (RT-PCR). Tehnica este utilizată pentru detecția agenților patogeni bacterieni și virali, iar un rezultat pozitiv indică prezența AND-ului sau ARN-ului agentului patogen.

7.2. Rezultate și discuții

În urma testelor efectuate la vițeei cu tulburări digestive s-au obținut următoarele rezultate:

-  Testele rapide imunocromatografice Rainbow Calf Scour și Huve Check° Calf Scours (fig. 7.1) s-au efectuat din 154 de probe de fecale de la vițeei cu vârsta de 0-1 lună. S-au obținut rezultate pozitive pentru: *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* K99 (F5) și rezultate negative pentru rotavirus și coronavirus.

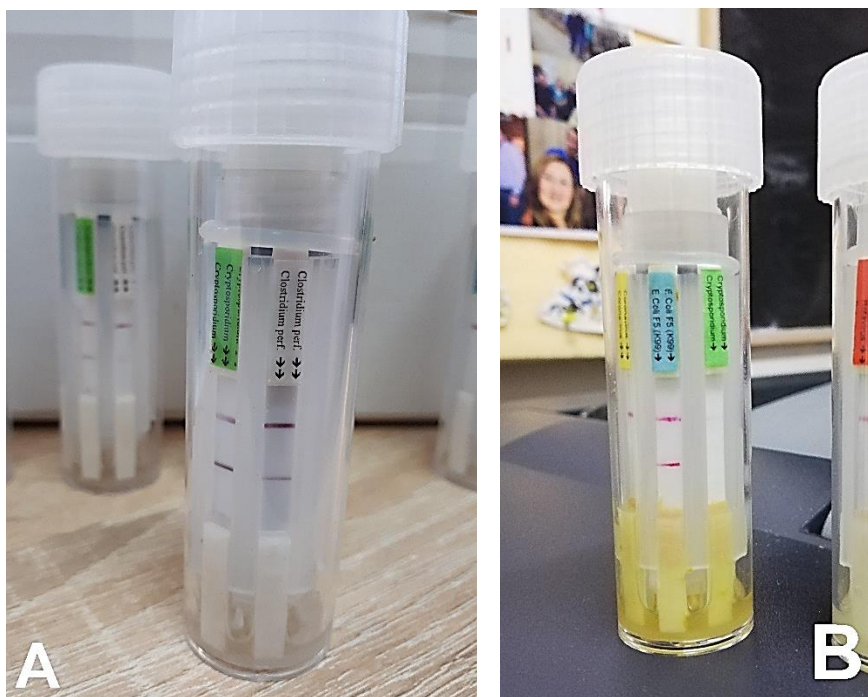


Fig. 7.2 Kit de diagnostic rapid Huve Check Calf Scours - probă pozitivă pentru *Cryptosporidium parvum* și *Clostridium perfringens* - A; Kit de diagnostic rapid Rainbow Calf Scour - probă pozitivă pentru *E. coli* (original)

Fig. 7.2 Huve Check Calf Scours rapid diagnostic kit - positive test for *Cryptosporidium parvum* and *Clostridium perfringens* - A; Rainbow Calf Scour rapid diagnostic kit - positive test for *E. coli* (original)

- ✚ Examen serologic - detecție anticorpi *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, metoda ELISA, din 50 de probe de sânge de la viței cu vârsta de 0-1 luni. Rezultatele au fost negative.
- ✚ Genom viral DVB-BM metoda RT-PCR din 60 de probe de sânge de la viței cu vârsta de 0-6 luni și 60 de probe de sânge de la tineret taurin <1 an. Rezultatele au fost negative.

În urma testelor efectuate vițelilor cu tulburări respiratorii s-au constatat următoarele rezultate:

- ✚ Examen bacteriologic s-a efectuat din 40 de probe de lavaj bronho-alveolar de la viței cu vârsta de 2-3 luni. S-au obținut rezultate pozitive pentru: *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Coronavirus bovin*, *Histophilus somni*. Rezultatele au fost negative pentru: *Mannheimia haemolytica*, *Influența D*, *Moraxella spp.* (fig. 7.3)
- ✚ Examen serologic pentru detecție anticorpi IBR (gE), metoda ELISA, din 60 de probe de sânge de la viței cu vârsta de 0-6 luni și 60 de probe de sânge de la tineret taurin <1 an. Rezultatele au fost negative.

SYNEVOVET SRL Laborator SYNEVOVET B-dul Pache Protopopescu Nr. 81/El. 2, Cam. 1, 021408 Bucuresti Telefon: 0753 086 965 Tel./fax: 021 316 21 60 Site: www.synevet.ro				Inregistrat la: Buc - SIVET Triere Telefon: 0753 086 965 Fax: 021 316 21 60 Adresa: Str. Industriilor, Nr. 25, Chiajna, Ilfov	
--	--	---	--	---	--

Buletin de rezultate			
Nume pacient: Pool 1(nr.1-4)			
Specie	Bovina	Contract: F - INTERVET- ROMANIA	Cod de bare: 9900441945
Rasa			Data inregistrarii: 16/09/2019
Varsta:	3 luni		Numar cerere: 99000755152
Sex:	F		Recoltat: External
Proprietar:	Intervet -		Punct de recoltare:
Adresa:			Adresa:
Data recoltarii:	15/09/2019 15:17		Data rezultat: 30/09/2019
Valori in afara limitelor admise pentru varsta si sexul respectiv ☐			

Denumire	Rezultat	UM	Interval de referinta
Profil Respirator Bovine - PCR			
Pneumovirus respirator bovin (BRSV) - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Negativ		
Parainfluenta bovina (PI3) - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Negativ		
Mannheimia haemolytica - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Negativ		
Pasteurella multocida - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Pozitiv		
Mycoplasma bovis - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Pozitiv		
Histophilus somni - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Pozitiv		
Coronavirus bovin - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Pozitiv		
Influenta D - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Negativ		
Rinotraheita infectioasa bovina (IBR) - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Negativ		
Diareea virală bovină (BVD) - PCR			
Alte produse biologice / PCR	Negativ		

Fig. 7.3 Buletin analiză – Profil respirator bovin, metoda PCR (original)
 Fig. 7.3 Analysis bulletin - Bovine respiratory profile, PCR method (original)

- ✚ Examen secreție nazală pentru detecție anticorpi IBR (gE), metoda PCR din 60 de probe de tamponare nazale de la viței cu vârsta de 0-6 luni și 60 de tamponare nazale de la tineret taurin <1 an. Rezultatele au fost negative.
- ✚ Examen secreție nazală pentru detecție *Pneumovirus respirator bovin (BRSV)*, *Virusul Parainfluenței tip 3*, metoda PCR, din 20 de probe de tamponare nazale de la viței cu vârsta de 0-3 luni. Rezultatele au fost negative.

În urma unor alte analize suplimentare efectuate s-au constatat următoarele rezultate:

- ✚ Genom viral Blue Tongue, metoda RT-PCR din 50 de probe de sânge de la viței cu vârsta <1 an. Rezultatul a fost negativ.
- ✚ Detecție anticorpi *Neospora caninum*, metoda ELISA din 50 de probe de sânge de la viței cu vârsta de 0-3 luni. Rezultatele au fost pozitive pentru 20 de probe.
- ✚ Examen coproparazitologic – 36 de probe de fecale de la vițeii cu vârsta 14-30 de zile. Elemente parazitare intestinale absente în 24 de probe, în restul de 12 probe fiind prezente oochisturi de *Cryptosporidium spp.* pe frotiurile examinate.
- ✚ Examen bacteriologic din 30 de probe de lapte de la vaci cu mamite acute și cronice. Germeni izolați : *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*.

În urma testelor efectuate, *Cryptosporidium parvum* a fost cel mai frecvent agent patogen detectat de la vițeii cu sindrom diareic neonatal în 17,53% din cazuri ca agent patogen unic (tabel 7.1, fig. 7.4).

Tabel 7.1/Table 7.1

Prevalența agenților patogeni în fecalele vițelor
Prevalence of pathogens in calf feces

Agent patogen detectat	Nr. probe	%
<i>E.coli</i>	8	5,19
<i>E.coli</i> + <i>Cryptosporidium parvum</i>	12	7,79
<i>Cryptosporidium parvum</i>	27	17,53
<i>Cryptosporidium parvum</i> + <i>Clostridium perfringens</i>	33	21,43
<i>Clostridium perfringens</i>	18	11,69
Probe pozitive	98	66,64
Probe negative	56	36,36
Total probe recoltate	154	100

Infecția cu *Clostridium perfringens* a fost identificată în 11,69% din cazuri ca unic agent patogen și în 21,43% în asociație cu *Cryptosporidium parvum* (tabel 7.1, fig. 7.3).

Infecția cu *E.coli* factorul F5 a fost identificată doar în 5,19% din cazuri ca agent unic patogen și în 7,79% din cazuri în asociație cu *Cryptosporidium parvum* (tabel 7.1, fig. 7.4).

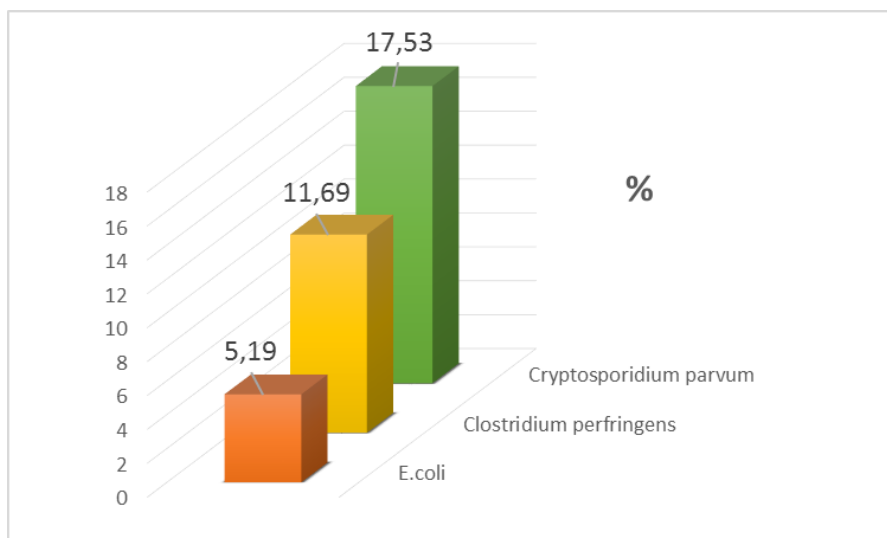


Fig. 7.4 Prevalența agenților infecțioși identificați în fecalele vițelilor
Fig. 7.4 Prevalence of infectious agents identified in the faeces of calves

Rezultatele privind infecțiile cu rotavirus și coronavirus au fost negative, iar 36,36% din probele recoltate au fost negative pentru toți cei 5 enteropatogeni cercetați.

Tabel 7.2/Table 7.2

Prevalența agenților patogeni în fecalele vițelilor în prima lună de viață
Prevalence of pathogens in the faeces of calves in the first month of life

	Vârsta (săptămâni)								Total
	1		2		3		4		
	nr	%	nr	%	nr	%	nr	%	nr
<i>E.coli</i>	18	45	2	3,85	0	0	0	0	20
<i>Clostridium perfringens</i>	6	15	16	30,77	19	51,35	10	71,43	51
<i>Cryptosporidium parvum</i>	16	40	34	65,38	18	48,65	4	28,57	72
Total	40	27,97	52	36,36	37	25,87	14	9,79	143

Cea mai mare rată a infecțiilor cu cei 4 agenți patogeni detectați în fecale s-a înregistrat în a 2-a săptămână de viață, cu un procent de 36,36%, iar cea mai mică rată s-a înregistrat în săptămâna 4, cu un procent de 9,79% (fig. 7.5).

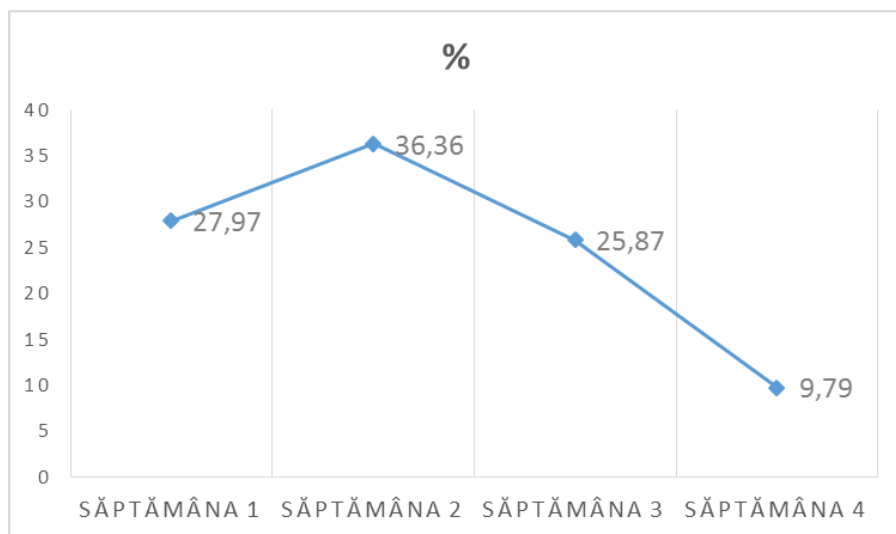


Fig. 7.5 Prevalența infecțiilor digestive la viței în prima lună de viață
Fig. 7.5 Prevalence of pathogens in the faeces of calves in the first month of life

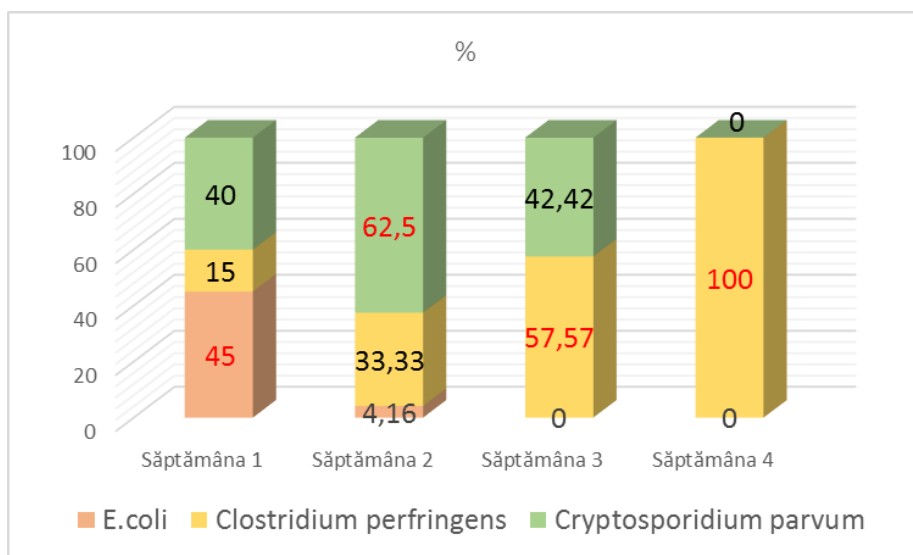


Fig. 7.6 Prevalența agenților patogeni în fecalele vițelor în prima lună de viață
Fig. 7.6 Prevalence of pathogens in the faeces of calves in the first month of life

Infecția cu *Cryptosporidium parvum* a fost cel mai des întâlnită la vârsta de 2 săptămâni (62,50%), iar *Clostridium perfringens* a fost cel mai des identificat la viței în vârstă de până la 3 săptămâni în procent de 57,57% (fig. 7.6). Infecția cu *E. coli*, factorul enteropatogen F5, a fost identificată în proporție de 45% la categoria de vârstă sub o săptămână și în proporție de 4,16% la viței de 1-2 săptămâni (fig. 7.6).

Rezultatele celor 40 de probe de lavaj bronhoalveolar au evidențiat 24 de probe pozitive și 16 probe negative (tabel 7.3).

Tabel 7.3/Table 7.3

Prevalența agenților infecțioși identificați în lavajul bronhoalveolar la vițeii cu vârsta de 2-3 luni
Prevalence of infectious agents identified in bronchoalveolar lavage in calves aged 2-3 months

Agent patogen detectat	Nr. probe	%
<i>Pasteurella multocida</i>	4	10
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Mycoplasma bovis</i> (P+M)	5	12,5
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Mycoplasma bovis</i> + <i>Histophilus somni</i> +Coronavirus bovin (P+M+H+C; fig. 7.2)	3	7,5
<i>Mycoplasma bovis</i>	4	10
<i>Mycoplasma bovis</i> +Coronavirus bovin (M+C)	4	10
Coronavirus bovin	2	5
Coronavirus bovin+ <i>Pasteurella multocida</i> (C+P)	1	2,5
<i>Histophilus somni</i>	1	2,5
Probe pozitive	24	60
Probe negative	16	40
Total probe recoltate	40	100

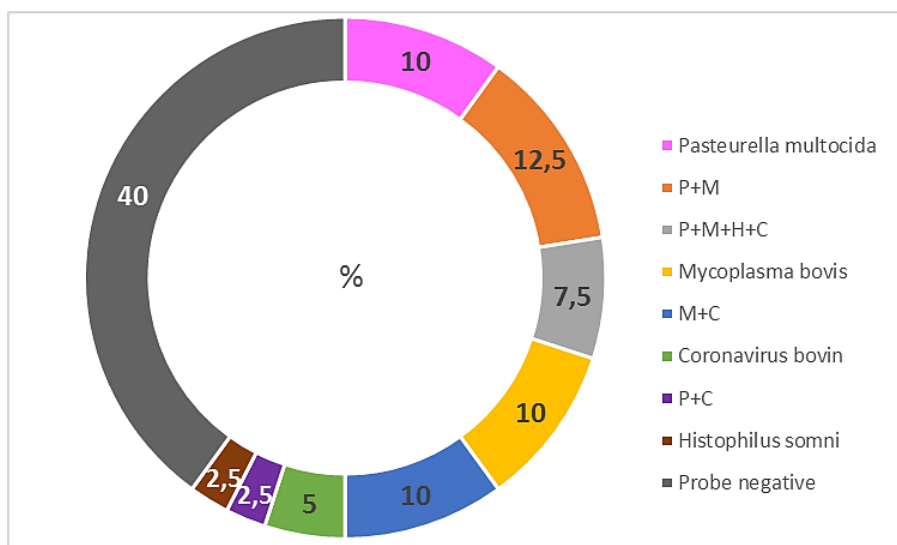


Fig. 7.7 Prevalența agenților infecțioși identificați în lavajul bronhoalveolar la vițeii cu vârsta de 0-3 luni
Fig. 7.7 Prevalence of infectious agents identified in bronchoalveolar lavage in calves aged 0-3 months

În urma testelor efectuate, *Mycoplasma bovis* a fost cel mai frecvent agent patogen detectat la vițeii cu vârsta de 2-3 luni, în 10% din cazuri ca agent patogen unic, în 12,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida* și în 7,5% din cazuri în asociație cu *Mycoplasma bovis*, *Histophilus somni* și *Coronavirusul bovin* (fig. 7.5).

Infecția cu *Pasteurella multocida* la vițeii cu vârsta de 2-3 luni a fost identificată în 10% din cazuri ca agent patogen unic. *Coronavirusul bovin* a fost identificat doar în 5% din cazuri ca agent patogen unic, în 10% în asociație cu *Mycoplasma bovis* și în 2,5% în asociație cu *Pasteurella multocida*.

7.1. Concluzii parțiale

În urma investigațiilor bacteriologice, imunocromatografice, serologice și de biologie moleculară pe probele recoltate, s-au obținut următoarele rezultate:

1. Semnele clinice, morbiditatea, mortalitatea și letalitatea au fost evidențiate prin rezultatele examenelor de laborator care au confirmat prezența unor boli infecțioase care fac parte din patologia vițelilor 0 -3 luni.
2. Infecția cu *Clostridium perfringens* a fost identificată în 11,69% din cazuri, iar infecția cu *E.coli* factorul F5 a fost identificată doar în 5,19% din cazuri.
3. *Clostridium perfringens* a fost cel mai des identificat la vițeii în vârstă de până la 3 săptămâni în procent de 57,57%, iar *E. coli*, factorul enteropatogen F5, a fost identificat în proporție de 45% la categoria de vârstă sub o săptămână.
4. *Mycoplasma bovis* a fost cel mai frecvent agent patogen detectat la vițeii cu vârsta de 2-3 luni, în 10% din cazuri ca agent patogen unic, în 12,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida* și în 7,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* și *Coronavirusul bovin*.
5. Infecția cu *Pasteurella multocida* la vițeii cu vârsta de 2-3 luni a fost identificată în 10% din cazuri, iar *Coronavirusul bovin* a fost identificat doar în 5% din cazuri.

CAPITOLUL 8 - INFLUENȚA CONSUMULUI DE COLOSTRU ASUPRA PROTEINELOR SERICE TOTALE LA VIȚEII NOU- NĂSCUȚI

CHAPTER 8 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM CONSUMPTION ON TOTAL SERUM PROTEINS IN NEWBORN CALVES

Perioada neonatală se caracterizează printr-o creștere intensă și o adaptare a întregului sistem imun al vițelului nou-născut la condițiile de viață extrauterină. În tot acest timp, necesarul de proteine al organismului este deosebit de ridicat. Proteina este cea mai importantă componentă plastică a metabolismului, o sursă indispensabilă de azot biogen necesar în creștere, regenerare și imunitate. Formarea homeostaziei proteinelor necesită o mobilizare metabolică ridicată la un nou-născut și este însoțită de o creștere acută a sistemelor de sinteză a proteinelor (Ling ș.a., 2018; Ignatescu ș.a., 2018).

Există o relație direct proporțională între cantitatea serică a proteinelor totale și IgG serice. Valoarea serică a proteinelor totale este un indicator al reușitei transferului pasiv al imunității la vițel. Numeroase studii de cercetare au folosit concentrațiile de proteine serice totale și IgG din ser sau plasmă pentru a evalua transferul imunității pasive la vițelii nou-născuți (Elsohaby ș.a, 2019, Kalaeva ș.a., 2019).

Proteinemia la vițel este dependentă de vârstă, fiind mai mică la fătare (4,5 - 4,8 g/dl), iar în cursul perioadei de alăptare crește având valori între 5,3-6,7 g/dl. Valoarea de referință pentru proteinele totale la vițelii sugari, după Pârnu (1999), este de 6,0 g/dl.

8.1. Materiale și metode

Pentru acest studiu, s-a format un lot de 42 de vițelii din rasa Holstein, care au primit o doză de 4 litri de colostru de la mamele lor, imediat după recoltare.

S-au recoltat 168 de probe de sânge de la vițelii cu vârsta în intervalul 0-7 zile de viață (la parturiție, la 24 de ore, la 48 de ore și la 7 zile), iar electroforeza proteinelor serice s-a realizat în cadrul laboratorului Synevovet Iași.

Electroforeza proteinelor serice este o metodă simplă, fiabilă și specifică pentru separarea diferitelor fracții proteice. Pentru analiza lor, se utilizează suporturi solide și pH alcalin, iar toate componentele proteice sunt încărcate negativ și migrează spre polul pozitiv. Pe electroforegramă, după colorare, proteinele apar sub formă de benzi cărora li se măsoară densitatea optică, fiecare bandă având un maxim de absorbție. Prin electroforeză se obțin cinci fracțiuni proteice: albumina serică, α -globulinele 1 și 2, β -globulinele și γ -globuline, separate în benzi distincte. Unele sisteme de electroforeză pot diferenția zona β în 2 benzi distincte β 1 și β 2 rezultând astfel 6 fracțiuni proteice.

Albumina, $\alpha 1$ și β apar sub forma unor benzi omogene, bine definite. Fracțiunile $\alpha 2$, și γ apar ca benzi difuze, iar fracțiunea γ prezintă în partea sa centrală o zona mai intens colorată (fig. 8.1).

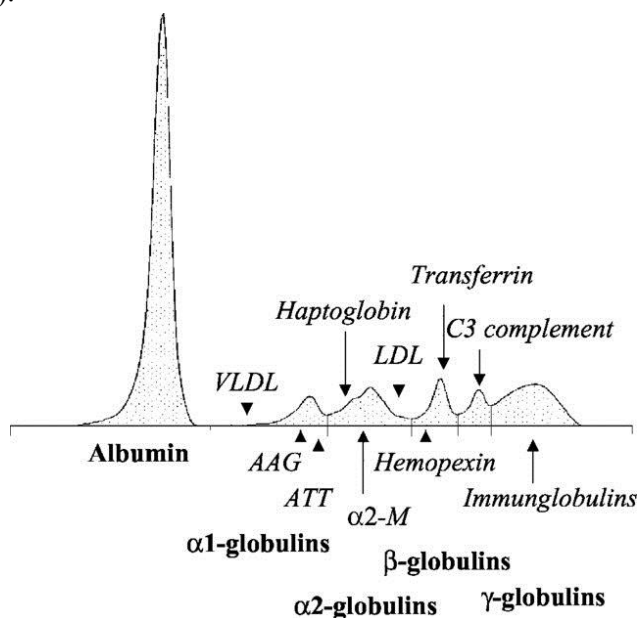


Fig. 8.1 Proteine serice umane - electropherogramă capilară (Cecile Gay-Bellile ș.a., 2003)

Fig. 8.1 Human serum proteins - capillary electropherogram (Cecile Gay-Bellile ș.a., 2003)

Electroforeza proteinelor serice este utilizată pentru a evalua, diagnostica și monitoriza o varietate de boli și oferă informații de diagnostic importante (Alberghina și colab. 2010). Mai mulți factori fiziologici pot afecta nivelul proteinelor serice, inclusiv vârsta animalelor evaluate (Weaver și colab. 2000). Mai multe studii au confirmat că modificările nutriției la animalele tinere, creșterea și dezvoltarea corpului sunt însoțite de modificări dinamice ai multor indici ai profilelor hematologice, proteice, minerale, enzimatic, energetice și ale altor profile, inclusiv profilul proteinelor serice (Mohri și colab. 2007). Prin urmare, valorile de referință în raport cu vârsta animalelor ar trebui să fie ideale pentru interpretarea valorilor proteinelor serice, dar astfel de date la viței sunt rareori disponibile.

Mediile aritmetice, erorile și deviațiile standard (SE, SD) pentru fiecare variabilă din eșantion au fost calculate folosind proceduri statistice descriptive din programul IBM SPSS și Microsoft Office. Testele statistice folosite au fost Anova Simplu și Testul T-independent.

8.2. Rezultate și discuții

Rezultatele analizelor după prelucrarea statistică sunt redată în tabelul 8.1.

Tabel 8.1/Table 8.1
 Modificările concentrațiilor proteinelor serice totale, a fracțiilor proteice și ale raportului albumină/globulină (A/G) la viței în primele 7 zile de viață

Changes in total serum protein concentrations, protein fractions and albumin/globulin ratio (A/G) in calves in the first 7 days of life

	Parametri statistici	Interval recoltare			
		Parturiție	24 h	48 h	7 zile
Proteine serice totale (g/l)	$\bar{X}$	42,73	84,43	81,45	76,4
	SE	0,49	2,41	1,86	1,36
	SD	1,56	7,61	5,88	4,31
	Valoare p	0/24 h: p<0,001; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,001; 24/48 h: p<0,01; 24 h/ 7 zile: p<0,002; 48 h/ 7 zile: p<0,008.			
Albumine serice (g/l)	$\bar{X}$	24,27	22,27	23,33	23,38
	SE	0,50	0,21	0,37	0,25
	SD	1,58	0,68	1,17	0,8
	Valoare p	0/24 h: p<0,01; 0/48 h: p<0,13; 0/7 zile: p<0,07; 24/48 h: p<0,05; 24 h/ 7 zile: p<0,009; 48 h/ 7 zile: p<0,9.			

	Parametri statistici	Interval recoltare			
		Parturiție	24 h	48 h	7 zile
$\alpha 1$ -globuline (g/l)	$\bar{x}$	11,18	13,14	12,65	9,81
	SE	0,18	0,14	0,14	0,10
	SD	0,58	0,43	0,44	0,32
	Valoare p	0/24 h: p<0,001; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,003; 24/48 h: p<0,005; 24 h/ 7 zile: p<0,001; 48 h/ 7 zile: p<0,001.			
$\alpha 2$ -globuline (g/l)	$\bar{x}$	1,54	2,59	3,14	4,93
	SE	0,07	0,10	0,18	0,10
	SD	0,24	0,33	0,56	0,33
	Valoare p	0/24 h: p<0,003; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,001; 24/48 h: p<0,03; 24 h/ 7 zile: p<0,001; 48 h/ 7 zile: p<0,001.			
$\beta 1$ -globuline (g/l)	$\bar{x}$	4,32	7,06	8,63	12,02
	SE	0,19	0,62	0,47	0,59
	SD	0,60	1,95	1,49	1,88
	Valoare p	0/24 h: p<0,001; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,001; 24/48 h: p<0,1; 24 h/ 7 zile: p<0,002; 48 h/ 7 zile: p<0,003.			

	Parametri statistici	Interval recoltare			
		Parturiție	24 h	48 h	7 zile
β2-globuline (g/l)	$\bar{x}$	0,50	8,37	8,00	6,62
	SE	0,02	0,75	0,24	0,24
	SD	0,07	2,37	0,76	0,75
	Valoare p	0/24 h: p<0,001; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,001; 24/48 h: p<0,8; 24 h/7 zile: p<0,1; 48 h/ 7 zile: p<0,004.			
γ-globuline (g/l)	$\bar{x}$	0,24	35,1	32,81	21,86
	SE	0,02	1,28	0,94	0,59
	SD	0,07	4,03	2,98	1,86
	Valoare p	0/24 h: p<0,001; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,001; 24/48 h: p<0,4; 24 h/7 zile: p<0,009; 48 h/ 7 zile: p<0,001.			
A/G	$\bar{x}$	1,33	0,31	0,34	0,41
	SE	0,04	0,01	0,02	0,01
	SD	0,11	0,04	0,06	0,04
	Valoare p	0/24 h: p<0,001; 0/48 h: p<0,001; 0/7 zile: p<0,001; 24/48 h: p<0,05; 24 h/ 7 zile: p<0,004; 48 h/ 7 zile: p<0,01.			

Concentrațiile de proteine serice totale în raport cu vârsta vițelilor au prezentat modificări puternic semnificative în prima săptămână de viață (0/7 zile: $p < 0,001$, tabelul 8.1). Cea mai mică medie a concentrațiilor a fost observată la naștere - 42,73 g/l, care a fost urmată de o creștere semnificativ marcantă la o zi după aportul de colostru - 84,43 g/l (0/24 h: $p < 0,001$). Ulterior, valorile au scăzut treptat până la sfârșitul perioadei evaluate (24 h/7 zile: $p < 0,002$, tabel 8.1, fig. 8.1;).

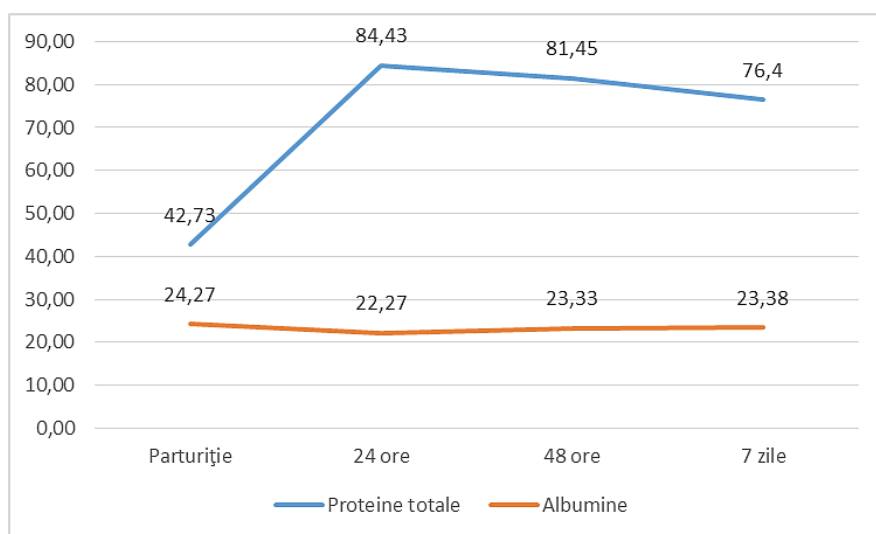


Fig. 8.2 Modificările concentrațiilor proteinelor serice totale și albuminei la viței în primele 7 zile de viață (g/l)

Fig. 8.2 Changes in total serum protein and albumin concentrations in calves during the first 7 days of life (g/l)

Dintre proteinele serice totale, albumina a fost cea mai proeminentă fracție proteică constituind, la naștere, 56,7% din totalul proteinelor serice (fig. 8.2). Concentrațiile albuminei au scăzut semnificativ la o zi după aportul de colostru (0/24 h: $p < 0,001$), însă din a 2-a zi de viață se observă creșterea treptată a valorilor (24 h/7 zile: $p < 0,009$, tabel 8.2, fig. 8.2, 8.3).

Diverse studii au arătat la viței o creștere progresivă a concentrațiilor de albumină de la naștere până la vârsta de 80 de zile (Knowles ș.a., 2000; Ježek ș.a., 2006; Piccione ș.a., 2009). Conform lui Davis ș.a. (1998), creșterea albuminei odată cu vârsta este un fenomen fiziologic, concentrațiile mai mari de albumină la animalele tinere și în creștere ajutând la menținerea echilibrului metabolic.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu au arătat la viței o scădere a concentrațiilor de albumină în primele două zile de la fătare. Aceasta a fost urmată de creșterea treptată a valorilor până la sfârșitul primei săptămâni de viață. Cele mai mari valori relative au fost observate în ziua 0, imediat după fătare. Aceasta a fost urmată de

scăderea cu peste 50% a concentrației după aportul de colostru și o creștere a valorilor de la ziua 2 după fătare.

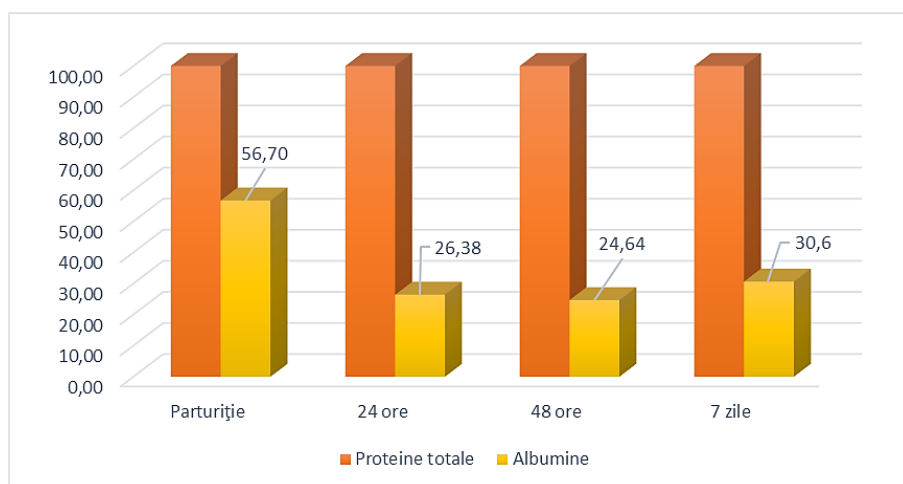


Fig. 8.3 Mediile concentrațiilor relative ale albuminei serice la viței în primele 7 zile de viață (%)
Fig. 8.3 Averages of relative serum albumin concentrations in calves during the first 7 days of life (%)

Potrivit lui Thomas (2000), acest fenomen este cauzat de modificarea concentrațiilor globulinei în timpul dezvoltării (concentrații relative mai mari de albumină și procente mai mici de γ -globuline la viței foarte tineri). Timpul de înjumătățire mediu al albuminei este de 14-16 zile la rumegătoare, după această perioadă ficatul fiind responsabil pentru sinteza ei (Lassen ș.a., 2004).

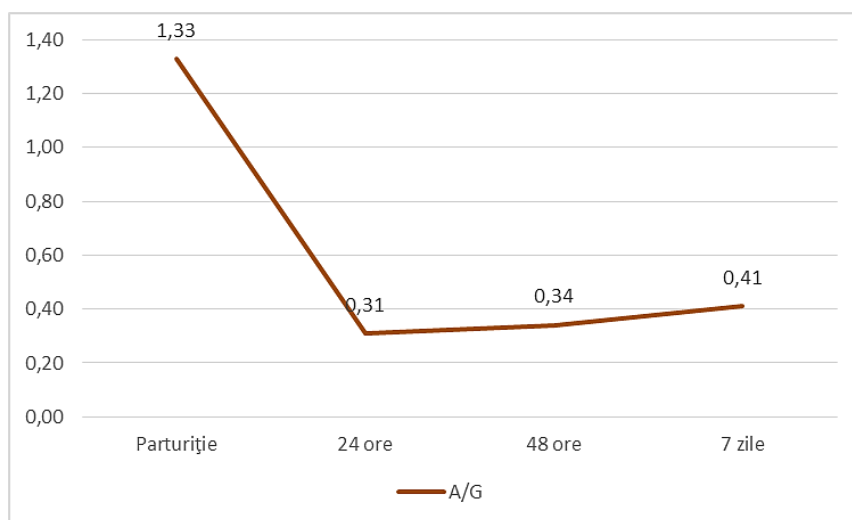


Fig. 8.4 Modificările raportului albumină / globulină (A/G) la viței în primele 7 zile de viață
Fig. 8.4 Changes in albumin / globulin (A/G) ratio in calves in the first 7 days of life

Rezultatele prezentate sugerează o schimbare marcantă a concentrațiilor de albumină și globuline la viței în prima săptămână de viață, care se reflectă în variațiile înregistrate în raporturile A/G. Valorile medii din ziua 0 raportate la ziua 7 de viață au arătat modificări semnificative în timpul observației ($p < 0,001$, tabel 8.1). Cea mai mare valoare medie a fost înregistrată înaintea aportului de colostru (1,33) și cea mai scăzută valoare semnificativă în prima zi după naștere (0,31). Din a 2-a zi de viață s-a constatat creșterea valorilor raportului A/G (fig. 8.4). Alberghina ș.a. (2010) susțin că raportul A/G trebuie interpretat cu precauție, acordând atenție părții modificate din raport, deoarece astfel se permite clasificarea sistematică și identificarea disproteinemiilor.

Dintre alfa globuline, pentru fracția $\alpha 1$ s-au observat variații semnificative legate de vârstă. Totodată, fracția $\alpha 1$ a fost prezentă în serul precolostral în raportul cel mai mare – 11,18 g/l (tabel 8.1, fig. 8.5) față de toate fracțiile proteice determinate.

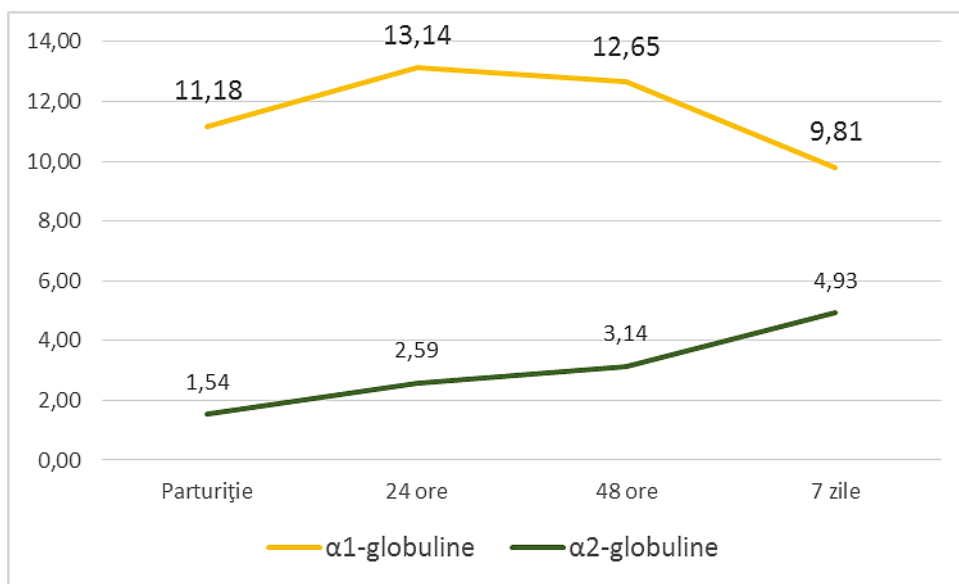


Fig. 8.5 Modificările concentrațiilor serice ale alfa-globulinelor la viței în primele 7 zile de viață (g/l)
Fig. 8.5 Changes in serum alpha-globulin concentrations in calves during the first 7 days of life (g/l)

După consumul de colostru, aceasta crește semnificativ (0/24 h: $p < 0,001$), pentru ca mai apoi, începând cu a 2-a zi de viață să scadă treptat (24 h/7 zile: $p < 0,001$), înregistrând o valoare de 9,81 g/l la 7 zile de viață. Constatări similare au fost raportate de Piccione ș.a. (2009). Szewczuk ș.a. (2011) au găsit cele mai mari valori ale concentrației de $\alpha 1$ -globuline la viței în ziua a 5-a de viață comparativ cu valorile măsurate în ziua 30 de viață. Multe dintre proteinele din fazele acute de boală migrează în regiunea $\alpha 1$ -globulinei (haptoglobină, ceruloplasmină, $\alpha 1$ -glicoproteină acidă, $\alpha 1$ -antitripsină), astfel încât creșterea acestei fracții poate să fie asociată cu starea inflamatorie și expunerea

la diverși factori stresanți (Kaneko 1997). Cu toate acestea, concentrațiile mai mari de α 1-globuline la viței la scurt timp după naștere nu indică neapărat un semn al activării proceselor inflamatorii și nici un semn al unei boli. Kaneko (1997) a raportat că serurile nou-născutului și ale animalelor tinere conțin cantități mari de α -globuline datorate concentrațiilor mai mari ale unor proteine din această fracțiune, care trebuie să protejeze animalele tinere de atacurile imunologice.

O tendință opusă a fost observată însă în cazul fracției α 2, care a înregistrat o creștere semnificativă a valorilor concentrațiilor serice în primele 48 de ore de viață (0/48 h: $p < 0,001$). Valorile medii ale globulinelor α 2 la o zi după aportul de colostru și până în ziua a 7-a de viață au fost aproximativ uniforme (tabel 8.1, fig. 8.5). Această fracțiune include câteva proteine plasmatiche de fază acută precum α 2-macroglobulină și amiloidul seric A. Potrivit lui Lomborg ș.a. (2008), nu numai stimulii inflamatorii, ci și condițiile de mediu reprezintă un declanșator important al schimbării în faza acută a proteinelor și al creșterii concentrațiilor de α -globuline, prin urmare aceste efecte pot fi prezente în condiții care nu au neapărat legătură cu bolile inflamatorii. Prin urmare, creșterea valorilor de α 2-globuline la viței din studiul de față pot fi asociate cu procesul normal de creștere și pot fi legate de expunerea animalelor la schimbarea condițiilor de mediu și a factorilor nutriționali.

Modificări semnificative în prima săptămână de viață s-au înregistrat și pentru fracțiile β 1- și β 2-globuline. Cea mai mică concentrație relativă medie de β 1-globuline a fost găsită la naștere – 4,32 g/l. Valorile concentrației au crescut treptat din prima zi de viață și până la vârsta de 7 zile – 12,02 g/l (0/7 zile: $p < 0,001$, tabel 8.1, fig. 8.6).

La naștere, concentrația medie de β 2-globuline a fost foarte scăzută (0,5 g/l), însă a crescut semnificativ de la o zi după aportul de colostru (0/24 h: $p < 0,001$), cu o scădere ulterioară a valorilor din a 2-a zi de viață (48 h/7 zile: $p < 0,004$, tabel 8.1, fig. 8.6). Aceste constatări pot fi legate de creșterea concentrației unor proteine serice din această fracție, în special a complementului, care, la fel ca proteinele în faza acută, este implicat în răspunsul imun la factorii stresanți din mediu (Bernabucci ș.a. 2009). Mai mult, creșterea β 1-globulinelor o dată cu vârsta poate fi atribuită unei creșteri a expunerii la agenții ambientali (França ș.a., 2011).

Cele mai mici concentrații medii dintre globulinele obținute în ziua 0 au fost cele pentru β 2- și γ -globuline (0,5 g/l, respectiv 0,24 g/l). La o zi după aportul de colostru s-a observat o creștere marcantă în valorile lor (0/24 h: $p < 0,001$, tabel 8.1, fig. 8.6, 8.7). urmând ca, până la sfârșitul studiului, să înregistreze o tendință de scădere continuă în ambele cazuri.

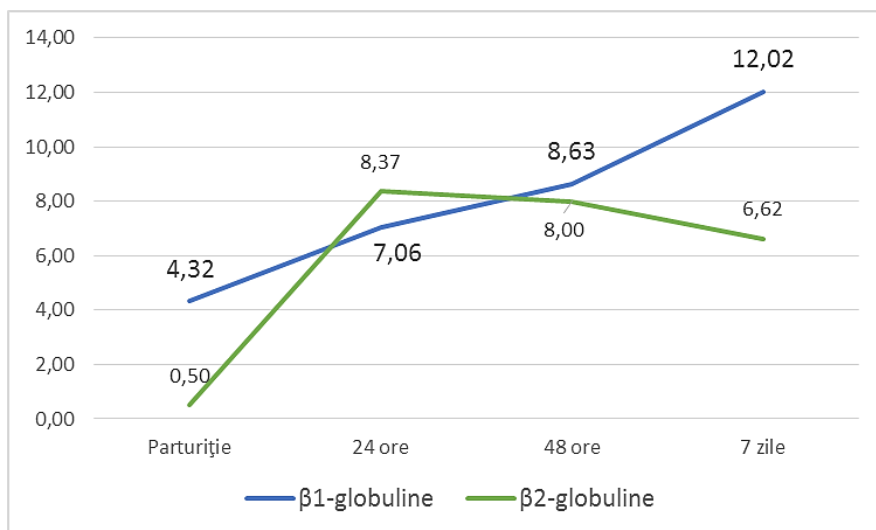


Fig. 8.6 Modificările concentrațiilor serice ale beta-globulinelor la viței în primele 7 zile de viață (g/l)

Fig. 8.6 Changes in serum beta-globulin concentrations in calves during the first 7 days of life (g/l)

Beta2-lipoproteina, transferina sau lactoferina și, ocazional, moleculele de imunoglobulină de tip IgM și IgA migrează în fracția proteică de β2-globuline. Concentrațiile de lactoferină sunt foarte mari în colostru și în serul animalelor nou-născute (Sobczuk-Szul ș.a., 2013). Prin urmare, creșterea rapidă a concentrațiilor de β2-globuline la viței la o zi după naștere poate fi cauzată de absorbția lactoferinei din colostru.

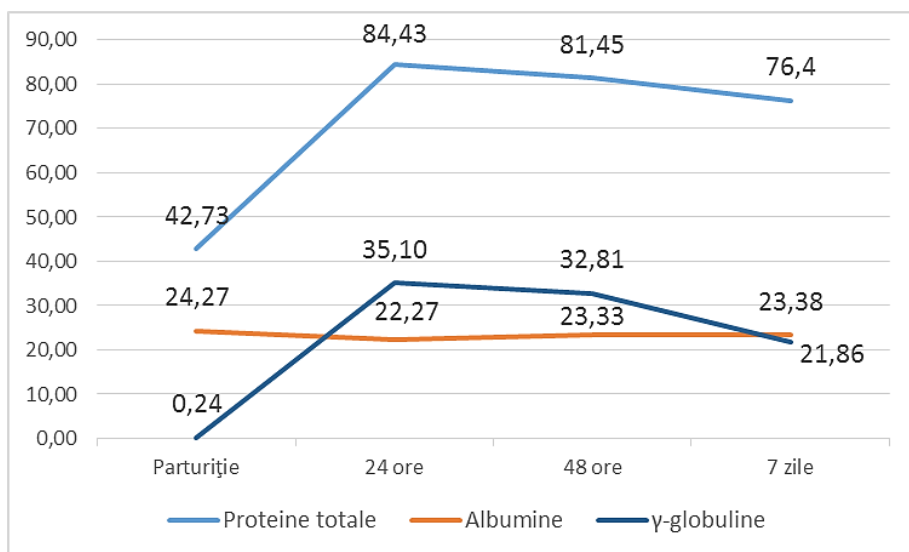


Fig. 8.7 Modificările concentrațiilor serice ale albuminei și fracțiilor proteice gamma la viței în primele 7 zile de viață (g/l)

Fig. 8.7 Changes in serum albumin concentrations and gamma protein fractions in calves in the first 7 days of life (g/l)

Proteinele care compun fracția γ -globulină sunt în principal imunoglobulinele (IgG, IgA, IgM, IgD și IgE). Determinarea proteinelor serice totale oferă informații estimative privind transferul pasiv al imunității, respectiv asupra cantității de gamaglobuline absorbite pasiv la nivel intestinal. Rezultatele studiului au indicat un efect semnificativ asupra aportului de colostru. Concentrația medie de γ -globuline la naștere a fost de numai 0,24 g/l, dar a crescut semnificativ la o zi după aportul de colostru la 35,10 g/l ($p < 0,001$). Începând cu a doua zi de viață, s-a observat o scădere treptată semnificativă a valorilor până în a 7-a zi de viață (tabel 8.1, fig. 8.7). Relația direct proporțională dintre evoluția proteinelor totale și a gamaglobulinelor serice la viței studiați este redată grafic în fig. 8.7.

Modificările proteinelor serice la o zi după naștere reflectă absorbția de imunoglobuline colostrale în timpul primelor 24 de ore de la naștere. La viței, în mod normal, serul precolostral nu conține γ -globuline, dar în câteva ore după ingestia colostrului, apar γ -globulinele în ser și absorbția continuă, conform diverșilor autori, până la 36-48 de ore după naștere, după care permeabilitatea intestinului încetează (Weaver ș.a., 2000; Castro-Alonso ș.a., 2008). Hammon ș.a. (2002) au raportat că, la naștere, concentrațiile de proteine serice ale majorității animalelor sunt destul de reduse și creșterea valorilor în primele 24 de ore de viață reflectă absorbția intestinală a proteinelor (în special a imunoglobulinelor) din colostru datorită creșterii permeabilității intestinale. Și Piccione ș.a. (2009) au găsit, de asemenea, la viței, cele mai mari concentrații totale de proteine serice în prima zi de viață. Rezultate asemănătoare fost înregistrate la miei de către Loste ș.a. (2008).

Imunoglobulinele absorbite din colostru asigură imunitatea umorală pentru viței nou-născuți până când aceștia pot produce singuri imunoglobuline în cantități suficiente pentru a oferi protecție împotriva agenților infecțioși (Meyer și Harvey, 2004; Blum ș.a., 2006). Piccione ș.a. (2009) au înregistrat în serul vițelor o scădere a γ -globulinelor din ziua 1 până în ziua 15, cu o creștere mică a valorilor ulterioare din ziua 20, care poate fi legată de dezvoltarea funcției limfatice.

8.3. Concluzii parțiale

După efectuarea cercetărilor privind concentrația proteinelor serice totale și a fracțiilor proteice în urma consumului de colostru pe loturile de viței studiate, putem concluziona următoarele:

1. Proteinele serice totale și fracțiile proteice evaluate în raport au înregistrat schimbări semnificative, îndeosebi în ziua 0 (42,73 g/l), înainte de aportul de colostru, și la 24 de ore de la prima administrare a colostrului (ziua 1 - 84,43 g/l).

2. Concentrația medie a proteinelor serice totale a crescut semnificativ, aproape dublându-se, de 42,73 g/l în ziua 0 până la 84,43 g/l în ziua 1. După acest timp, valorile au scăzut treptat până la sfârșitul studiului.
3. Rezultatele obținute au arătat scăderi treptate ale valorilor concentrațiilor de proteine serice totale din a 2-a zi de viață și până la sfârșitul primei săptămâni, fiind influențate semnificativ de vârsta, creșterea și dezvoltarea vițelilor.
4. În toate cele 6 fracțiuni proteice au fost găsite schimbări variabile evaluate pe întreaga perioadă de studiu. Ele reflectă răspunsul nou-născuților la aportul de colostru și la modificările mediului înconjurător în perioada neonatală.

CAPITOLUL 9 - INFLUENȚA CONSUMULUI DE COLOSTRU ASUPRA LACTOFERINEI SERICE LA VITEII NOU-NĂSCUȚI

CHAPTER 9 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM CONSUMPTION ON SERUM LACTOFERRIN IN NEWBORN CALVES

Lactoferina (lactotransferina) este o glicoproteină din familia transferinelor, proteine capabile de a lega și a transfera ionii de Fe^{3+} . Lactoferina a fost izolată pentru prima dată din laptele bovin de Sorensen în 1939. Constituie cea mai mare fracție proteică din zer și este prezentă în diverse lichide fiziologice, inclusiv plasmă, lacrimi, salivă, lichide vaginale, spermă, secreții nazale și bronșice, secreție biliară, lichide gastro-intestinale, urină, lichide sinoviale și amniotice, granule plasmatiche și neutrofile.

Lactoferina are multiple proprietăți, printre cele mai importante fiind cele antimicrobiene (Embleton ș.a., 2013), imunomodulatoare (Puddu ș.a., 2009) și antiinflamatorii (Conneely, 2001). Lactoferina a fost cercetată pe larg la om, în primul rând la sugari și copii mici (Manzoni ș.a., 2012; Ochoa ș.a., 2013; Pammi și Abrams, 2015; Manzoni, 2016) și există dovezi că lactoferina reduce severitatea și prevalența longitudinală a diareei (Ochoa ș.a., 2013).

Lactoferina din laptele uman conține 691 de aminoacizi, iar cea din laptele de vacă conține 689 aminoacizi. Ambele au omologie de secvență ridicată și au proprietăți similare. Cu toate acestea, un scop important de producție al lactoferinei este de a îndepărta fierul de care virusii au nevoie pentru replicare și cataliză.

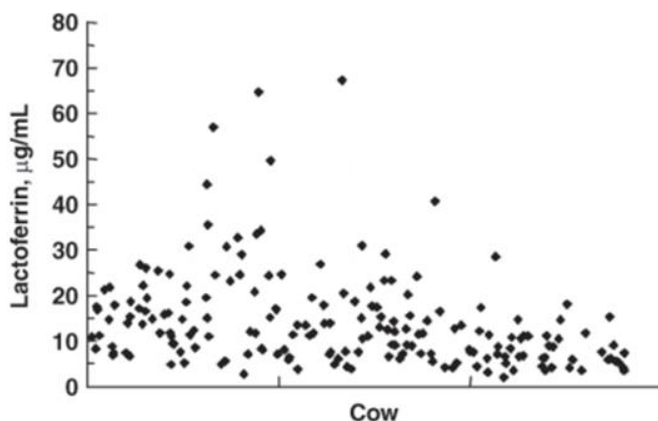


Fig. 9.1 - Concentrația de lactoferină în laptele vacilor sănătoase (nr. = 189) într-un efectiv de vaci de lapte din Noua Zeelandă în timpul lactației timpurii (57 de zile de lactație; K. Stelwagen, 2009)

Fig. 9.1 - Lactoferrin concentration in milk of healthy cows (nr. =189) in a commercial New Zealand dairy herd during early lactation (57 days in milk; K. Stelwagen, 2009)

Lactoferina din colostru și laptele bovin a devenit tot mai importantă datorită gamei variate de proprietăți biologice și astăzi prezintă un potențial adjuvant în chimioprevenția cancerului de colon și a altor tipuri de cancer. Un studiu recent a luat în considerare lactoferina ca posibil adjuvant terapeutic în infecția cu SARS-COV2 la oameni, datorită activității antivirale puternice împotriva unui spectru larg de virusi ADN și ARN cu sau fără capsidă. Lactoferina poate acționa de fapt direct asupra virusului sau asupra receptorilor săi celulari. De exemplu, poate bloca proteinele spike (S) ale COVID-19 de a se lega de celulele gazdă, creind astfel un mecanism de apărare al gazdei împotriva virusului (Yilmaz ș.a., 2020).

Concentrația lactoferinei din lapte variază considerabil la vacile sănătoase (fig. 9.1). În probele de lapte colectate dintr-o turmă de 189 de vaci sănătoase, s-au înregistrat mai mult de 20 de diferențe în concentrațiile de lactoferină (Stelwagen, 2009).

La animale au fost efectuate mai puține studii, dar, cu toate acestea, s-a dovedit că lactoferina reduce morbiditatea și îmbunătățește rata de creștere la viței (Robblee ș.a., 2003). Studiile au indicat, de asemenea, că lactoferina poate duce la eliminarea agenților patogeni și, prin urmare, la reducerea incidenței bolilor neonatale prin mecanismul de legare al fierului, inhibarea dezvoltării bacteriilor (Singh ș.a., 2002) și activitatea proteolitică (Adlerova ș.a., 2008).

9.1. Materiale și metode

Scopul acestui studiu a fost de a observa variațiile concentrațiilor serice de lactoferină în urma aportului de colostru.

În vederea realizării studiului, în perioada noiembrie 2019 - ianuarie 2020, au fost recoltate 40 de probe de colostru și 168 probe de ser de la viței în intervalul 0-7 zile de viață. Vițeii au primit colostru proaspăt recoltat de la mamele lor, imediat după fătare.



Fig. 9.2 Kit ELISA pentru evaluarea cantitativă a lactoferinei (original)
Fig. 9.2 ELISA kit for quantitative evaluation of lactoferrin (original)

Pentru analiza probelor recoltate s-a utilizat kitul ELISA de competiție Bio-X Diagnostics Bovine Lactoferrin (fig. 9.2) care permite determinarea concentrației de lactoferină din diverse lichide biologice (lapte, colostru, ser sanguin, etc.) și din unele preparate industriale (lapte praf, pastă de dinți, salivă artificială, etc.). Tehnica ELISA este rapidă și fiabilă și este potrivită în special pentru analiza unui număr mare de eșantioane.

Testul folosește microplăci sensibilizate cu anticorpi policlonali specifici lactoferinei bovine. Probele prelucrate corespunzător sunt incubate concomitent cu conjugatul enzimatic specific format din lactoferină bovină purificată legată chimic de peroxidază.

Compoziție kit:

- ✓ Plăci de microtitrare cu 96 de godeuri sensibilizate cu anticorpi anti-lactoferină specifici;
- ✓ Soluție de spălare (flacon 100 ml) concentrată (20x). Soluția cristalizează spontan când este rece. Se aduce flaconul la 21°C +/- 3°C până la dispariția tuturor cristalelor. Se amestecă bine, se diluează 1:20 cu apă distilată sau demineralizată. Soluția diluată se depozitează la + 2 - 8°C;
- ✓ Tampon de diluție colorat (flacon 30 ml) pentru diluarea conjugatului. Acest reactiv este gata de utilizare;
- ✓ Conjugat enzimatic (flacon 50x) de lactoferină-peroxidază;
- ✓ Standard Lactoferină: 2 sticle cu aproximativ 80 mg de lactoferină bovină;
- ✓ TMB (flacon 25 ml), gata de utilizare – Tetrametilbenzidină (substrat cromogen);
- ✓ Soluție de stopare (flacon 15 ml) - acid fosforic 1 M.

Mod de lucru:

1. Înainte de utilizare toți reactivii s-au adus la 21°C +/- 3°C;
2. S-a diluat soluția de spălare concentrată în apă distilată (în funcție de numărul de probe lucrate);
3. S-a preparat soluția standard de lactoferină după cum urmează: cu o balanță de înaltă precizie s-au cântărit exact 50 mg de pulbere, care s-au transferat într-un recipient și s-a dizolvat în 50 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline), folosind un agitator magnetic. Când pulberea s-a dizolvat în întregime s-a transferat soluția într-o sticlă de 1 litru și s-a completat volumul la 1 litru cu PBS. După omogenizare s-a obținut concentrația de 50 µg/ml. Precizia testului ELISA depinde acuratețea cu care s-a preparat această soluție standard stock din care s-au preparat încă 8 diluții ce conțin concentrații diferite de lactoferină, după cum se observă în tabelul 9.1.

Tabel 9.1/Table 9.1

Diluții standard pentru curba etalon
Standard dilutions for the standard curve

	Diluția	Concentrația (ng/ml)
Soluția stock	1/1	50000
D1 (diluția 1)	1/5	10000
D2 (diluția 2)	1/7.5	6667
D3 (diluția 3)	1/11.25	4444
D4 (diluția 4)	1/16.88	2963
D5 (diluția 5)	1/25.31	1975
D6 (diluția 6)	1/37.97	1317
D7 (diluția 7)	1/56.95	878
D8 (diluția 8)	1/85.43	585

4. S-au diluat probele de ser și colostru în PBS, după cum urmează: colostrul bovin: 1/200, serul sangvin: 1/5 (fig. 9.3);

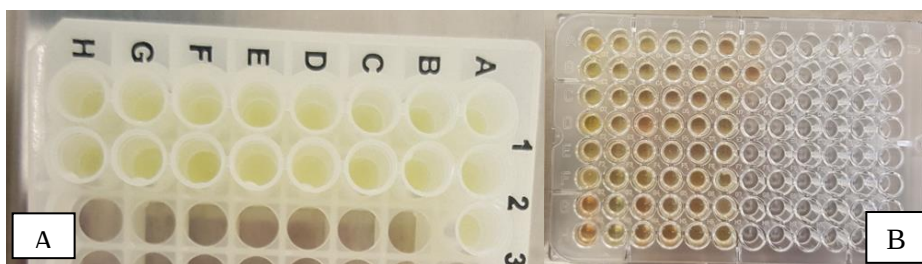


Fig. 9.3 Diluții probe de colostru - A; diluții probe de ser - B (original)

Fig. 9.3 Dilutions of colostrum samples - A; serum sample dilutions - B (original)

- S-au distribuit în duplicat, câte 100 μ l din cele opt diluții ale soluției standard (utilizate pentru curba de calibrare), precum și din probele de ser și de colostru de testat;
- S-a diluat 1:50 conjugatul enzimatic cu soluție tampon de diluare și s-au distribuit câte 100 μ l în fiecare godeu;
- S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la 21°C +/- 3°C, timp de o oră;
- S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μ l soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600;
- S-au adăugat câte 100 μ l de substrat cromogen (TMB) în fiecare godeu. Soluția de cromogen trebuie să fie absolut incoloră, o culoare albastră vizibilă, fiind semn de contaminare;

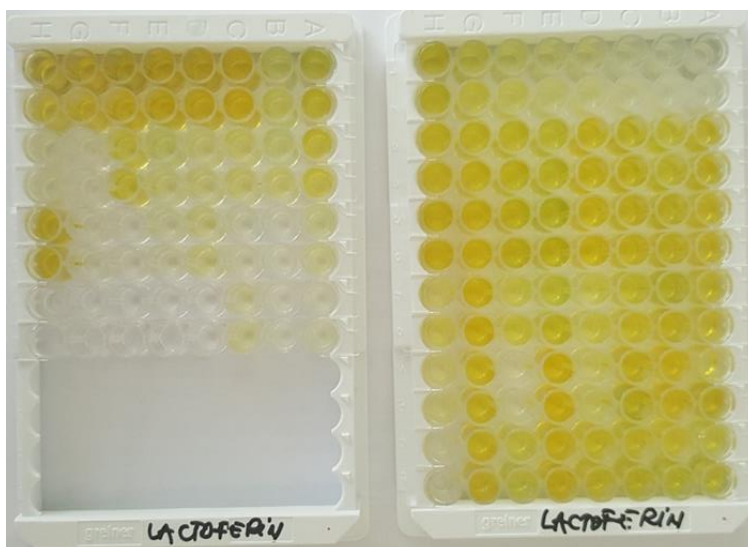


Fig. 9.4 Aspect placă după adăugarea soluției STOP (original)
Fig. 9.4 Plate appearance after addition of STOP solution (original)

10. S-a incubat timp de 10 minute, la 21°C +/- 3°C, la întuneric;
11. S-au adăugat câte 50 µl de soluție de stopare în fiecare godeu (culoarea albastră va deveni galbenă - fig. 9.4);
12. Citirea densității optice s-a realizat în interval de 5-10 minute cu ajutorul spectrofotometrului Stat Fax 3200 Awariness Technology, utilizând un filtru de 450 nm.

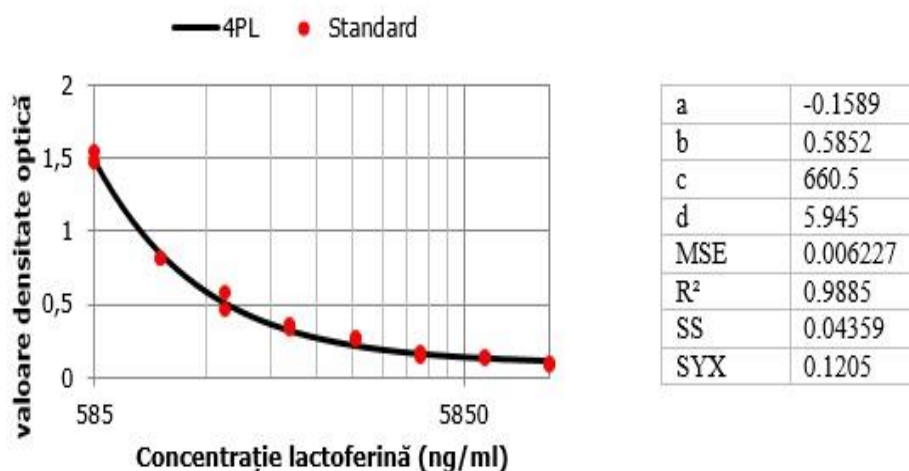


Fig. 9.5 Curba standard de calibrare pentru calculul concentrațiilor de lactoferină
Fig. 9.5 Standard calibration curve for calculating lactoferrin concentrations

Pentru evaluarea cantitativă se utilizează o curbă de calibrare obținută cu ajutorul diluțiilor dintr-o concentrație cunoscută de lactoferină bovină. Curba de calibrare s-a realizat cu ajutorul programului Four Parameter Logistic Curve (log-log, fig. 9.5).

Mediile aritmetice, erorile și deviațiile standard pentru fiecare variabilă din eșantion au fost calculate folosind proceduri statistice descriptive din programul IBM SPSS și Microsoft Office. Testele statistice folosite au fost Anova Simplu și Testul T-independent.

9.2. Rezultate și discuții

Rezultatele statistice ale analizelor efectuate sunt redată în tabelul 9.2.

Tabel 9.2/Tabel 9.2

Valorile concentrațiilor serice de lactoferină în urma consumului de colostru la vițeii nou-născuți

Serum lactoferrin levels after colostrum consumption in newborn calves

	Colostru (mg/ml)	Ser viței ziua 0 (μg/ml)	Ser viței ziua 1 (μg/ml)	Ser viței ziua 2 (μg/ml)	Ser viței ziua 7 (μg/ml)
$\bar{X} \pm SD$	0,67 ± 0,42	2,68 ± 1,05	5,24 ± 1,87	4,24 ± 1,91	3,11 ± 1,8
SE	0,10	0,30	0,42	0,42	0,40
Minim	0,15	0,25	2,70	1,70	0,8
Maxim	1,40	3,97	9,05	8,60	7,4
CI 95%	0,22	0,67	0,87	0,89	0,84
Valoare p	ser viței ziua 0 – ser viței ziua 1 p< 0,0001* p< 0,0002**				

* Testul T Student, **Anova simplu

În cele 40 de probe de colostru de la vaci din rasa Holstein valoarea medie de lactoferină colostrală a fost de 0,67±0,42 mg/ml, cu o valoare maximă de 1,4 mg/ml și minimă de 0,15 mg/ml (tabel 9.2, fig 9.6).

Colostrul bovin conține concentrații mai mici de lactoferină decât colostrul altor specii de animale (Masson și Heremans, 1971). Tsuji ș.a. (1990) au raportat o medie de 1,96 ± 0,27 mg/ml pentru 45 de vaci Holstein, în timp ce Yoshida ș.a. (2000) au raportat o medie de 0,34 ± 0,23 mg/ml pentru 6 vaci prin cromatografie. Stelwagen ș.a. (2009) susțin de asemenea că în colostru bovin se găsesc cantități mari de lactoferină, ce variază între 1 și 5 mg/ml.

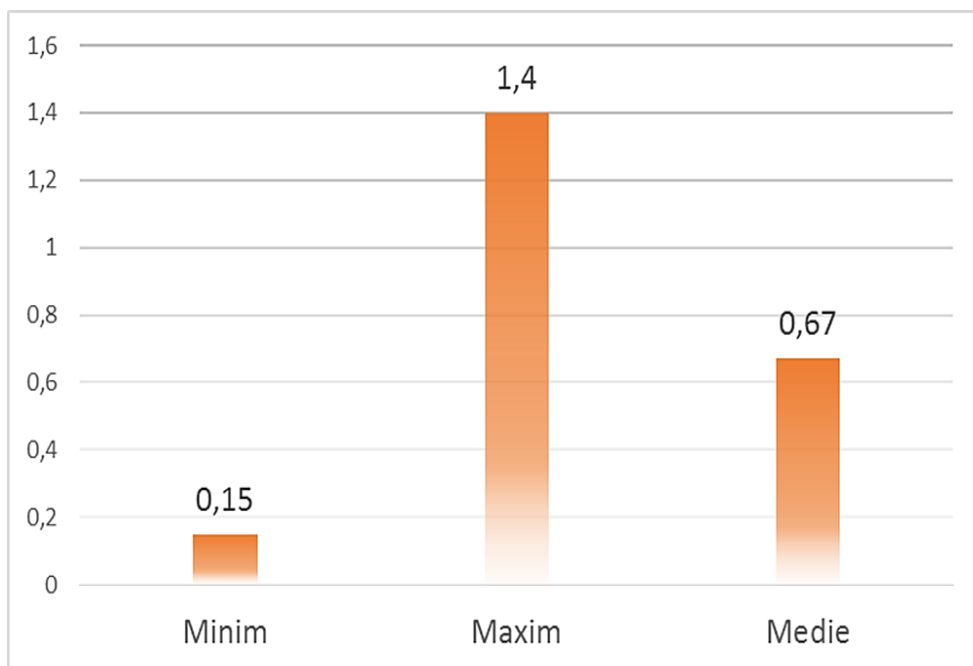


Fig 9.6 Concentrațiile de lactoferină din probele de colostru (mg/ml)
 Fig 9.6 Lactoferrin concentrations in colostrum samples (mg/ml)

Lactoferina este influențată în mod semnificativ de numărul de lactații și de producția zilnică de lapte (Cheng ș.a., 2008). Concentrația sa poate crește de multe ori, chiar până la 100 mg/ml, în timpul involuției glandei mamare. Lactoferina este, de asemenea, prezentă în concentrații mari (până la 100 mg/ml) în secrețiile mamare ale vacilor care nu alăptează. Ca proteină antimicrobiană, lactoferina produsă de glanda mamară poate avea un rol dublu, protejând atât glanda mamară, cât și intestinul vițelilor nou-născuți (Cheng ș.a., 2008).

Utilitatea potențială a lactoferinei ca predictor al imunității pasive a fost evaluată de Gokce ș.a. (2014) la miei. Studiul lor a relevat importanța lactoferinei în prevenirea dezvoltării bolilor la miei și în evaluarea calității colostrului, prin corelația pozitivă între valorile lactoferinei colostrale și IgG. Holloway ș.a. (2002) au sugerat că nu au existat dovezi între absorbția colostrului și nivelurile de lactoferină serică. Dawes ș.a. (2004) au raportat că au găsit niveluri de lactoferină serică înainte de absorbția colostrului și că acestea sunt de aproximativ 5 ori mai mici decât nivelurile măsurate la 24 h în serul vițelilor. Mai mult, acești cercetători au evidențiat o scădere progresivă a nivelurilor de lactoferină serică din prima zi și până la sfârșitul primei luni de viață a vițelilor.

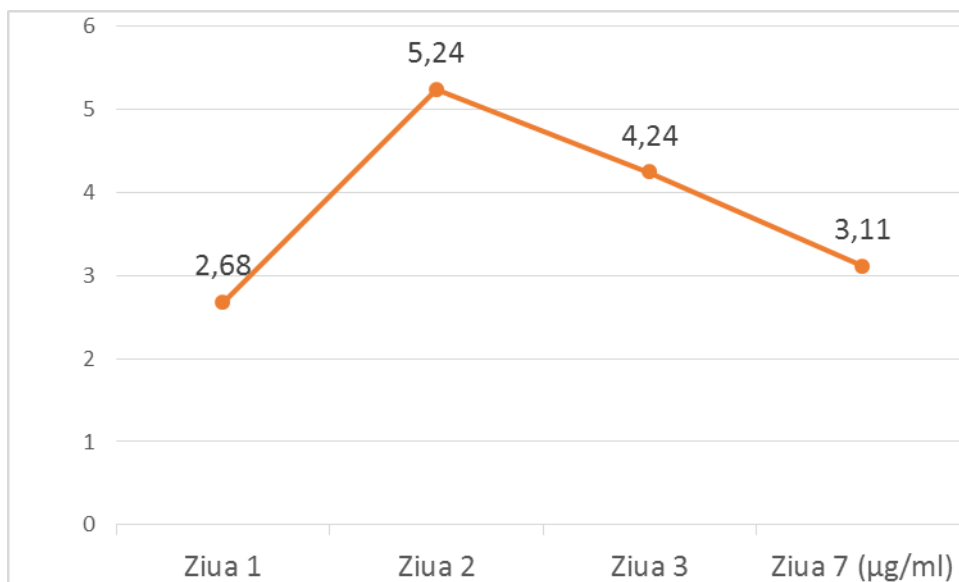


Fig 9.7 Concentrațiile de lactoferină din probele de ser
Fig 9.7 Lactoferrin concentrations in serum samples

În studiul de față, concentrația medie a lactoferinei serice în ziua 0 (2,68 μg/ml) a crescut de aproximativ 2 ori la o zi după aportul de colostru (5,24 μg/ml, tabel 9.2, fig. 9.7). În mod similar, Hurley și Sixiang (2000) au prezentat la vițelii nou-născuți o concentrație serică scăzută a lactoferinei (1,09 μg/ml) imediat după naștere, care a crescut de aproximativ 10 ori la 8 ore după primul colostru și ulterior a scăzut treptat până în a doua zi de viață. Acești autori au sugerat că tendința de creștere a concentrațiilor serice de lactoferină a fost cel mai probabil cauzată de absorbția sa din colostru. Talukder ș.a. (2003) au relatat o concentrație relativ mică de lactoferină în plasma sanguină a vițelilor la naștere (0,20 μg/ml), care a crescut de aproximativ 10 ori la 6 ore după primul aport de colostru, dar aceste concentrații mai mari au fost susținute doar în primele 12 ore de viață.

Tendința crescândă a concentrației de lactoferină serică bovină observată în studiul de față la o zi după aportul de colostru mai mică comparativ cu rezultatele autorilor menționați mai sus, ar putea fi influențată de activitatea biologică a lactoferinei colostrale absorbite, care este metabolizată rapid din sângele vițelilor la aproximativ 12 ore după aportul de colostru (Hurley și Sixiang 2000). De asemenea, în continuare, se observă o scădere progresivă a nivelurilor de lactoferină din prima zi până la sfârșitul primei săptămâni de viață (Dawes ș.a., 2004). În studiul de față, nivelurile de lactoferină au atins vârful la 24 de ore (5,24 μg/ml) și au scăzut progresiv până în a șaptea zi de viață (3,11 μg/ml, fig. 9.7).

Tabel 9.3/Table 9.3

Valorile concentrațiilor lactoferinei serice la viței în raport cu valorile concentrațiilor de lactoferină colostră

Serum lactoferrin concentrations in calves relative to colostrum lactoferrin concentrations

Parametri statistici	Colostru (mg/ml)	Ser viței ziua 0 (μg/ml)	Ser viței ziua 1 (μg/ml)	Ser viței ziua 2 (μg/ml)	Ser viței ziua 7 (μg/ml)
Grup 1					
$\bar{X} \pm SD$	0,40±0,20	2,63±1,28	5,07±2,18	4,14± 2,26	3,12± 2,13
SE	0,06	0,48	0,58	0,60	0,57
Minim	0,15	0,25	2,70	1,70	0,8
Maxim	0,81	3,83	9,05	8,60	7,4
CI 95%	0,14	1,19	1,26	1,3	1,23
Grup 2					
$\bar{X} \pm SD$	1,18±0,11	2,76±0,75	5,63±0,79	4,48±0,74	3,07±0,72
SE	0,05	0,34	0,32	0,3	0,29
Minim	1,11	2,07	4,90	3,8	2,12
Maxim	1,40	3,97	6,98	5,76	4,2
CI 95%	0,12	0,93	0,82	0,78	0,75
Valoare p	G1 - ser viței ziua 1 – G2 ser viței ziua 1: p<0,01. G1 - ser viței ziua 2 – G2 ser viței ziua 2: p<0,01. G1 - ser viței ziua 7 – G2 ser viței ziua 7: p<0,01				

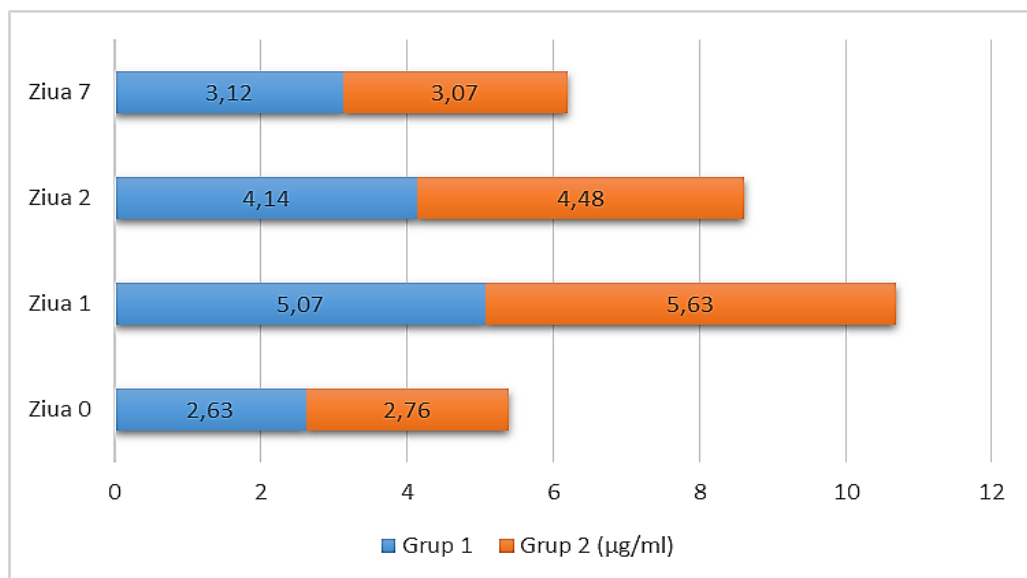


Fig. 9.8 Valorile concentrațiilor lactoferinei serice la viței în urma consumului de colostru
 Fig. 9.8 Serum lactoferrin concentrations in calves following colostrum consumption

Concentrațiile de lactoferină găsite în sângele nou-născuților sunt dependente de concentrația de lactoferină din colostrul ingerat și de cantitatea de colostru administrată, sugerează Cheng ș.a. (2008). Pentru a testa această ipoteză, am constituit 2 grupuri experimentale, în funcție de mediile concentrațiilor de lactoferină colostrală obținute, și anume:

- Grupul 1 – concentrații de lactoferină colostrală cuprinsă între 0,15-0,81 mg/ml, cu o medie de 0,4 mg/ml, 20 vaci, 20 de viței;
- Grupul 2 - concentrații de lactoferină colostrală cuprinsă între 1,11-1,40 mg/ml cu o medie de 1,18 mg/ml, 20 vaci, 20 viței.

Concentrația medie a lactoferinei serice la viței din grupul 2 a fost semnificativ mai mare decât a celor din grupul 1 ($p < 0,03$, tabel 9.3, fig. 9.8, 9.9). Acest rezultat confirmă faptul că lactoferina din sângele nou-născuților este dependentă de concentrația de lactoferină din colostrul ingerat, așa cum sugerează Cheng ș.a. (2008).

După cum se poate observa în fig. 9.8 și 9.9, cantitatea de lactoferină serică la viței a fost direct proporțională cu nivelul de lactoferină din colostrul ingerat.

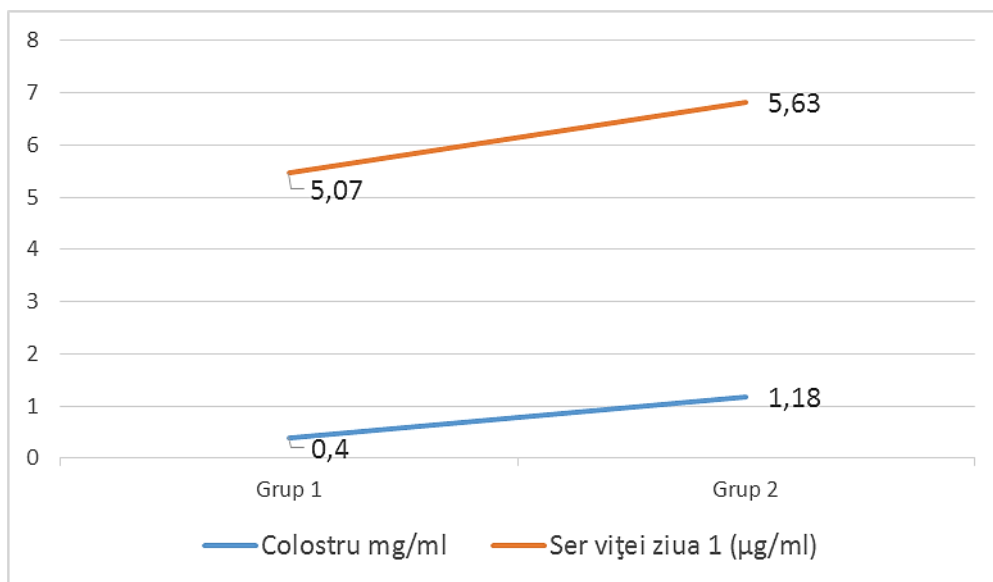


Fig. 9.9 Valorile concentrațiilor lactoferinei serice la viței în raport cu valorile concentrațiilor de lactoferină colostrală

Fig. 9.9 Serum lactoferrin concentrations in calves relative to colostrum lactoferrin concentrations

Studiile anterioare au indicat faptul că lactoferina colostrală are un rol important în imunitatea neonatală și oferă protecție împotriva bolilor. Protecția vițelilor depinde de prezența lactoferinei colostrale în tractul intestinal în timpul primelor 2-3 săptămâni de viață. De aceea este esențială asigurarea unei hrăniri adecvate cu colostru în această perioadă pentru o eficacitate maximă a vaccinării.

Întrucât în unele ferme, vițelii primesc o doză de colostru imediat după fătare, apoi sunt hrăniți fie cu lapte praf, fie cu lapte de vacă, fie cu lapte de vacă amestecat cu colostrul de la vacile recent fătate, pentru a identifica corelațiile dintre metoda de hrănire, deci a aportului de lactoferină colostrală, și diareea neonatală, am creat 2 loturi experimentale, astfel:

- Lotul 1 – 15 viței care au primit o doză de colostru în primele 2 ore de viață și ulterior au fost hrăniți doar cu lapte simplu de vacă, pasteurizat.
- Lotul 2 – 15 viței care au primit o doză de colostru în primele 2 ore de viață și ulterior au primit colostru în amestec cu laptele de vacă, pasteurizat.

Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 9.4.

Tabel 9.4/Table 9.4

Corelația aportului de lactoferină colostră și diareea neonatală în primele 14 de zile de viață

Correlation of colostrum lactoferrin intake and neonatal diarrhea in the first 14 days of life

Nr. total	Lot 1	Lot 2
	15	15
Nr. viței cu diaree Mb %	4 26,6%	3 20%
Nr. viței morți din cauza diareei	0	0
Vârsta medie a vițelilor cu diaree minim/maxim (zile)	10,5 7/15	13,3 10/14
Durata medie a diareei minim/maxim (zile)	3,5	2,8
Durata medie a tratamentului diareei minim/maxim (zile)	5 4/7	3 3/5

După cum se poate observa în tabelul 9.4, morbiditatea la vițelii cu diaree a fost mai mare în lotul 1 (26,6%) comparativ cu lotul 2 (20%). De asemenea, durata medie (zile) a diareei la cazurile înregistrate în lotul 1 a fost mai mare (3,5 zile) comparativ cu cea înregistrată în lotul 2 (2,8 zile), însă diferențele nu au fost semnificative, durata totală a simptomelor clinice fiind în medie de aproximativ 3 zile în ambele loturi. Durata tratamentului specific și nespecific aplicat a avut variații mai mari în lotul 1 (4-7 zile) față de lotul 2 (3-5 zile).

Nu există studii care să determine relația dintre boli și concentrația de lactoferină serică în urma aportului de colostru. Prin urmare, efectele potențiale ale lactoferinei asupra protecției împotriva bolilor neonatale și imunitatea pasivă la viței nu prea sunt cunoscute. Chiar dacă în lotul 2 morbiditatea a fost semnificativ mai mică comparativ cu lotul 1, nu se poate afirma că suplimentarea cu lactoferină colostră previne apariția focarelor de boală, fapt dovedit de morbiditatea redusă din lotul 2 de viței. Totuși, aceasta poate oferi o protecție locală a vițelilor care au primit colostru pe o perioadă mai îndelungată de timp.

9.3. Concluzii parțiale

În urma cercetărilor privind variațiile concentrațiilor de lactoferină serică la viței în urma consumului de colostru, extragem următoarele concluzii:

1. Modificările semnificative ale concentrațiilor serice de lactoferină, în special în ziua 1 de viață (5,24 $\mu\text{g/ml}$), când, acestea aproape s-au dublat comparativ cu ziua 0 (2,68 $\mu\text{g/ml}$), evidențiază răspunsul imun al vițelilor obținut prin consumul de colostru.
2. Lactoferina înregistrează o scădere progresivă a concentrației serice din prima zi și până la sfârșitul primei săptămâni de viață, acest lucru fiind influențat de activitatea biologică a lactoferinei colostrale absorbite.
3. Totodată, rezultatele obținute au evidențiat ca lactoferina din sângele nou-născuților este dependentă de concentrația de lactoferină din colostrul ingerat.
4. Lactoferina colostrală poate oferi o protecție locală extinsă pe o perioadă mai îndelungată de timp vițelilor care au primit colostru în amestec cu laptele integral.

CAPITOLUL 10 - INFLUENȚA CONSUMULUI DE COLOSTRU ASUPRA HAPTOGLOBINEI SERICE LA VIȚII NOU-NĂSCUȚI CHAPTER 10 - THE INFLUENCE OF COLOSTRUM CONSUMPTION ON SERUM HAPTOGLOBIN IN NEWBORN CALVES

Haptoglobina este o glicoproteină care are ca funcție principală legarea hemoglobinei libere din sânge. Prin eliminarea din circulație a hemoglobinei libere care are activitate peroxidazică inerentă, Hp previne deteriorarea oxidativă a țesuturilor (Yang ș.a., 2003). Gruparea Hp-hemoglobină reduce și disponibilitatea rezidului de hem din creșterea bacteriană, prin urmare, Hp are o activitate antibacteriană indirectă (Murat H. ș.a., 2004).

Aportul de colostru influențează răspunsul sistemului imun al nou-născutului, inclusiv expresia haptoglobinei. Pe lângă numeroasele sale funcții biologice, Hp este implicată în răspunsurile de apărare ale gazdei la infecție și inflamație (Dobryszczycka, 1997). Hp este una dintre proteinele de fază acută pozitive majore la bovine, care este eliberată ca răspuns la citokinele proinflamatorii. Caracterizarea modificărilor concentrațiilor proteinelor de fază acută după naștere poate ajuta la o mai bună cunoaștere a rolului răspunsului inflamator în adaptarea nou-născuților la viața extrauterină.

Asigurarea unui aport adecvat de colostru este cel mai important factor pentru sănătatea și supraviețuirea vițelilor deoarece colostrul conține concentrații mari de imunoglobuline, antioxidanți și alți factori bioactivi care susțin dezvoltarea și maturarea sistemului imun, inclusiv a imunității intestinale locale (Blum și Hammon, 1998; Chase ș.a., 2008).

La nou-născuți, sistemul imunitar este imatur și se presupune că producția endogenă de Hp (pe baza cercetărilor la oameni) este scăzută. Spre deosebire de alte proteine care sunt abundente în colostrul, cum ar fi IgG, Hp pare să nu fie transferată în circulația vițelului (Gruse ș.a., 2016).

Hiss-Pesch ș.a. (2011) au evidențiat la purceii nou-născuți o relație directă între creșterea concentrațiilor circulante de haptoglobină serică și consumul de colostru imediat după naștere. Aceștia au raportat concentrații serice scăzute de haptoglobină la purceii nou-născuți care a crescut substanțial în primele 12 ore de viață la purceii care au primit colostru, în comparație cu cei care au primit înlocuitor de lapte. Pe baza acestor rezultate, Hiss-Pesch ș.a. (2011) au concluzionat că Hp maternă este transferată de la scroafă la purceii nou-născuți prin colostru și că debutul sintezei endogene de haptoglobină la purceii nou-născuți este stimulat de colostru.

Sadri H. ș.a. (2020) au realizat același studiu comparativ pe viței, iar rezultatele obținute nu au indicat modificări semnificative a absorbției haptoglobinei plasmatice după primul aportul de colostru la vițeei nou-născuți. Același rezultat l-au obținut și Tothova ș.a. (2011) care au sugerat că acest lucru poate fi legat de modul diferit de sinteză a haptoglobinei în ficat la vițeei nou-născuți comparativ cu purceii. Gruse ș.a. (2016) au raportat o creștere a concentrațiilor plasmatice de Hp la vițeei nou-născuți hrăniți cu formulă de lapte.

Cu toate acestea, rezultatele obținute în cazul Hp plasmatice la vițeei nou-născuți hrăniți cu formulă sau colostru sunt conflictuale.

Într-un studiu recent, Liermann ș.a. (2020) au observat o tendință de creștere a Hp plasmatice la vițeei hrăniți cu colostru. Motivul acestei discrepante nu este clar; cu toate acestea, se speculează că aceste concentrații mai mari de Hp la vițeei hrăniți cu formulă pot sugera existența unor procese inflamatorii mai severe comparativ cu vițeei hrăniți cu colostru (Besser ș.a., 1988; Gânheim ș.a., 2007). Interesant, activarea răspunsului imun local al mucoasei intestinale s-a redus la vițeei cărora li s-a administrat colostru comparativ cu cei care au primit formulă de lapte (Norrman ș.a., 2003). Aceste cercetări sunt susținute de incidența mai mare a infecțiilor gastrointestinale la vițeei hrăniți cu formulă de lapte (Gruse ș.a., 2016). Vițeei care primesc colostru au o rezistență mai mare la infecții datorată transferului pasiv al imunității împotriva agenților patogeni specifici, ceea ce duce la un nivel scăzut al concentrației de Hp în plasmă.

10.1. Materiale și metode

Scopul acestui studiu a fost evaluarea variațiilor concentrațiilor serice de haptoglobină în urma aportului de colostru. În vederea realizării studiului, în perioada noiembrie 2019 – ianuarie 2020, au fost recoltate 168 probe de ser de la viței în intervalul 0-7 zile de viață. Vițeei au primit colostru proaspăt recoltat de la mamele lor, imediat după fătare.

Pentru analiza probelor recoltate s-a utilizat kitul ELISA sandwich Bovine haptoglobin BIO-X Diagnostics. Testul utilizează microplăci cu 96 de godeuri sensibilizate cu anticorpi monoclonali specifici haptoglobinei bovine care asigură captarea specifică a proteinei din ser. Probele prelucrate corespunzător sunt incubate concomitent cu conjugatul enzimatic specific format din haptoglobină bovină purificată legată chimic de peroxidază.

Compoziție kit:

- ✓ Plăci de microtitrare cu 96 de godeuri sensibilizate cu anti-haptoglobină bovină;
- ✓ Soluție de spălare (flacon 100 ml) concentrată (20x). Soluția cristalizează spontan când este rece. Se aduce flaconul la 21°C +/- 3°C până la dispariția tuturor

cristalelor. Se amestecă bine, se diluează 1:20 cu apă distilată sau demineralizată. Soluția diluată se depozitează la + 2 - 8°C;

- ✓ Tampon de diluție colorat 5x (flacon 50 ml) care trebuie diluat cu apă distilată înainte de utilizare;
- ✓ Calibrator (500 µl)
- ✓ Conjugat enzimatic anticorpi anti-haptoglobină-peroxidază (12 ml), gata de utilizat;
- ✓ TMB (flacon 12 ml), gata de utilizare – Tetrametilbenzidină (substrat cromogen);
- ✓ Soluție de stopare (flacon 6 ml) - acid fosforic 1 M.



Fig. 10.1 Kit ELISA pentru evaluarea haptoglobinei (original)

Fig. 10.1 ELISA kit for haptoglobin evaluation (original)

Mod de lucru:

1. Înainte de utilizare, toți reactivii s-au adus la 21°C +/- 3°C;
2. Se prepară calibratorii utilizați pentru obținerea curbei de calibrare. Calibratorul liofilizat se dizolvă în 500 µl apă distilată. După dizolvarea completă a acestuia, 150 µl sunt diluați în 1350 µl tampon de diluție (diluția 1/10);
3. S-a realizat diluția probelor de ser de testat 1/1000;
4. S-au distribuit câte 100 µl din cei 7 calibratori (D1-D7) și din probele de ser diluate;
5. S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la 21°C +/- 3°C, timp de o oră;
6. S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 µl soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600;
7. S-au distribuit câte 100 µl conjugatul enzimatic (fig. 10.2);

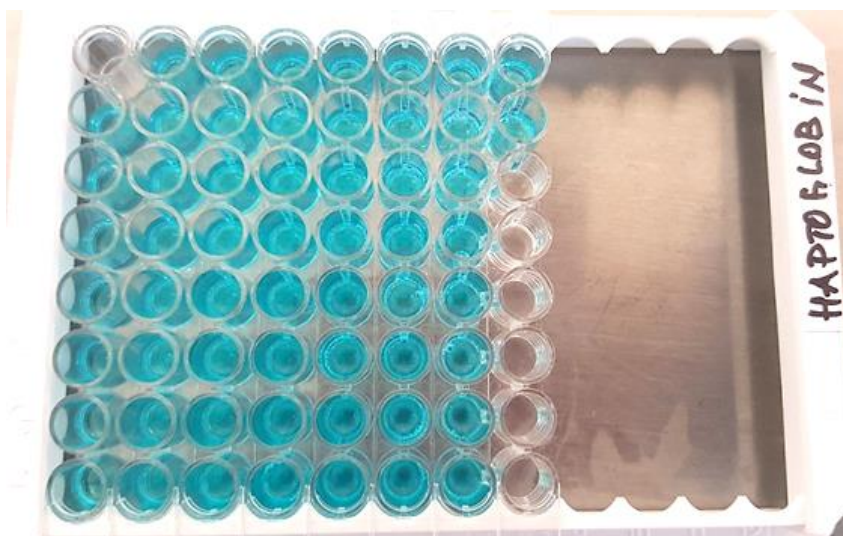


Fig. 10.2 Distribuția conjugatului enzimatic (original)
Fig. 10.2 Distribution of the enzyme conjugate (original)

8. S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, timp de o oră;
9. S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μl soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600;
10. S-au adăugat câte 100 μl de substrat cromogen (TMB) în fiecare godeu. Soluția de cromogen trebuie să fie absolut incoloră, o culoare albastră vizibilă, fiind semn de contaminare;
11. S-a incubat timp de 10 minute, la $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, la întuneric (fig. 10.3 A);

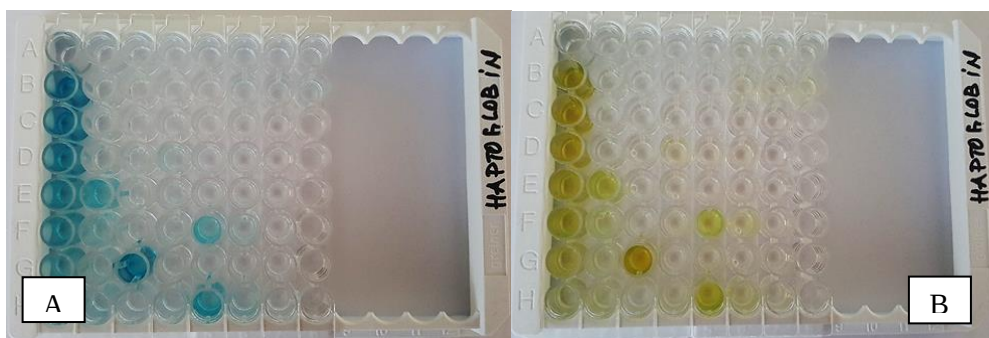


Fig. 10.3 Aspect placă după adăugarea substratului cromogen - A; aspect placă după stopare reacție - B (original)

Fig. 10.3 Plaque appearance after the addition of the chromogenic substrate - A; plate appearance after stop reaction - B (original)

12. S-au adăugat câte 50 μl de soluție de stopare în fiecare godeu (culoarea albastră va deveni galbenă) (fig. 10.3 B);

13. Citirea densității optice s-a realizat în interval de 5-10 minute cu ajutorul spectofotometrului Stat Fax 3200 Awareness Technology, utilizând un filtru de 450 nm (fig. 10.4).



Fig. 10.4 Spectofotometru Stat Fax 3200 Awareness Technology (original)
 Fig. 10.4 State Fax Spectrophotometer 3200 Awareness Technology (original)

Pentru evaluarea cantitativă, se utilizează o curbă de calibrare obținută cu ajutorul diluțiilor dintr-o concentrație standard de haptoglobină bovină furnizată în kit. Pentru a calcula concentrațiile de haptoglobină din probele de ser de testat s-a realizat o curbă de calibrare ajutorul programului Four Parameter Logistic Curve (log-log), (fig. 10.5).

Mediile aritmetice, erorile și deviațiile standard pentru fiecare variabilă din eșantion au fost calculate folosind proceduri statistice descriptive din programul IBM SPSS și Microsoft Office. Testele statistice folosite au fost Anova Simplu și Testul T-independent.

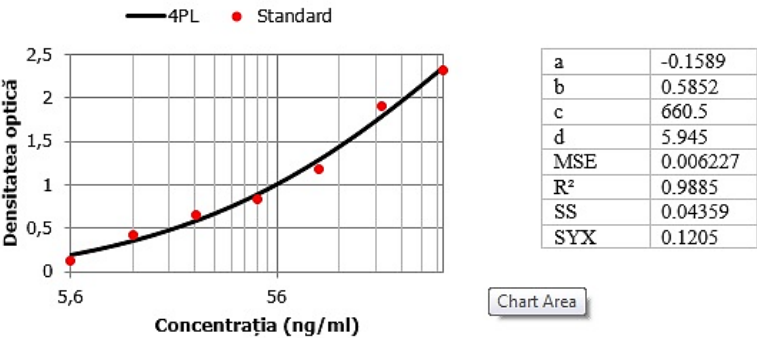


Fig. 10.5 Curba standard de calibrare pentru calculul concentrațiilor de haptoglobină
 Fig. 10.5 Standard calibration curve for the calculation of haptoglobin concentrations

10.2. Rezultate și discuții

Valorile obținute în acest studiu au fost asemănătoare cu cele raportate de Orro ș.a. (2008), care au investigat modificările temporale ale proteinelor de fază acută la viței nou-născuți.

Tabel 10.1/Table 10.1

Valorile concentrațiilor serice de haptoglobină în urma consumului de colostru la viței nou-născuți

Serum haptoglobin concentrations following colostrum consumption in newborn calves

	Ser viței ziua 0 (μg/ml)	Ser viței ziua 1 (μg/ml)	Ser viței ziua 2 (μg/ml)	Ser viței ziua 7 (μg/ml)
$\bar{X} \pm SD$	2,03 ± 0,21	2,86 ± 0,87	5,42 ± 0,88	7,43 ± 0,89
SE	0,06	0,22	0,21	0,22
Minim	1,72	1,72	4,31	6,32
Maxim	2,36	4,36	6,95	8,97
CI 95%	0,14	0,47	0,45	0,47
Valoare p	ser viței ziua 0 – ser viței ziua 1 p< 0,001 ser viței ziua 0 – ser viței ziua 7 p< 0,03			

Analiza statistică a rezultatelor obținute a arătat că media concentrației de haptoglobină a înregistrat cele mai mici valori la parturiție (2,03 μg/ml). Ulterior, valorile au crescut discret, dar semnificativ după administrarea colostrului (2,86 μg/ml; p<0.001, tabel 10.1, fig. 10.6, 10.7).

Au fost observate variații semnificative legate de vârstă pentru concentrațiile de haptoglobină, cu o creștere treptată a valorilor până în ziua a 7-a de viață (ser viței ziua 0 – ser viței ziua 7 p< 0,03, tabel 10.1, fig. 10.6). În mod similar, valori foarte scăzute ale haptoglobinei la naștere și o creștere în timpul primei săptămâni de viață au fost raportate și de alți autori (Orro, 2008; Tothova, 2015). Concentrații mari de Hp în primele două săptămâni de viață au fost, de asemenea, demonstrate într-un grup de 14 viței (Knowless, 2000).

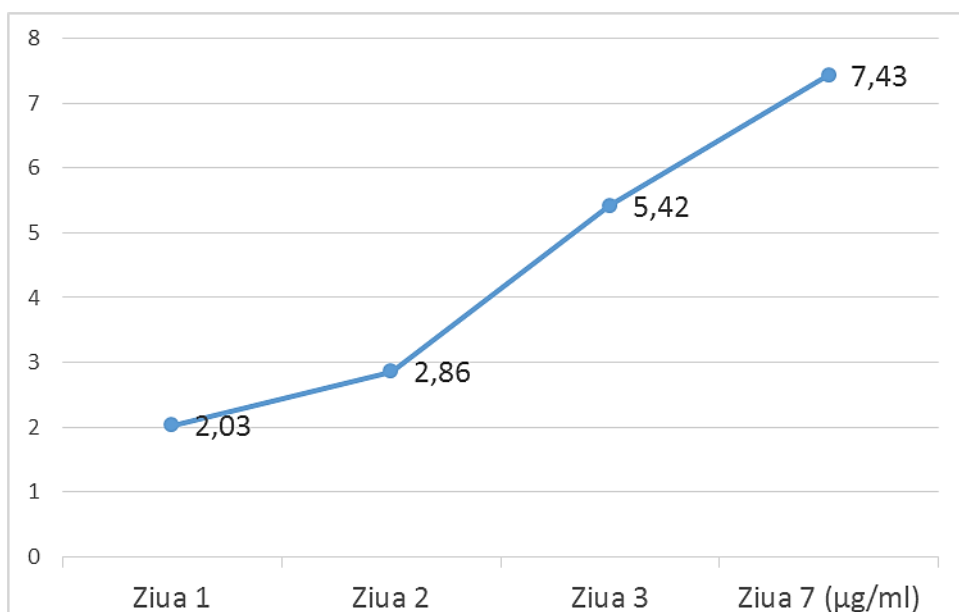


Fig. 10.6 Valorile concentrațiilor serice de haptoglobină în urma consumului de colostru la vițeii nou-născuți

Fig. 10.6 Serum haptoglobin concentrations following colostrum consumption in newborn calves

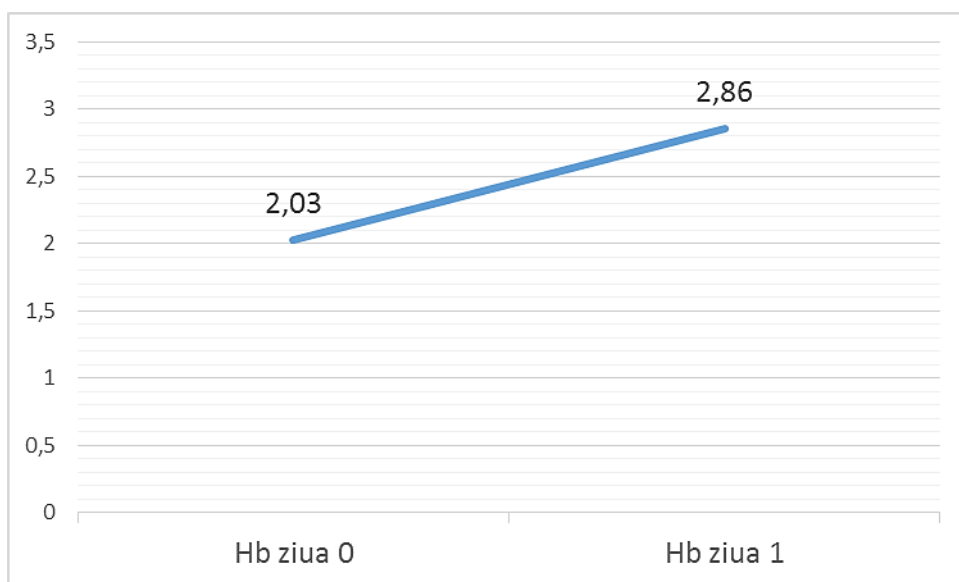


Fig. 10.7 Dinamica concentrațiilor de haptoglobină după administrarea colostrului

Fig. 10.7 Dynamics of haptoglobin concentrations after colostrum administration

Pe de altă parte, un studiu anterior a descris cum concentrațiile de haptoglobină la vițeii nou-născuți nu difereau între probele obținute la naștere, la vârsta de 1 zi și la vârsta de 10 zile (Schroedl, 2003). Concentrațiile scăzute de haptoglobină după naștere pot fi legate de imaturitatea ficatului vițelului nou-născut pentru a produce haptoglobină într-o situație în care consumul de haptoglobină este crescut din cauza hemolizei eritrocitelor fetale (Dobryszcka, 1997).

Transferul haptoglobinei materne prin colostru s-a demonstrat la purceii nou-născuți (Hiss-Pesch, 2011). Nivelurile crescute de haptoglobină au funcția de protecție și joacă un rol important în mecanismele de apărare intrinseci ale purceilor nou-născuți care sunt alăptați. Cu toate acestea, nu s-a demonstrat încă transferul direct de haptoglobină prin colostru la vițeii nou-născuți, iar acest lucru poate fi legat de diferita reglare hepatică a producției de haptoglobină între viței și purcei (Hiss-Pesch, 2011).

Producția hepatică de proteine de fază acută este unul dintre mecanismele implicate în compensarea unui sistem imunitar imatur în perioada neonatală timpurie, care facilitează adaptarea la viața extrauterină. Modificările concentrației acestora au fost recunoscute ca un instrument util pentru evaluarea sănătății bovinelor.

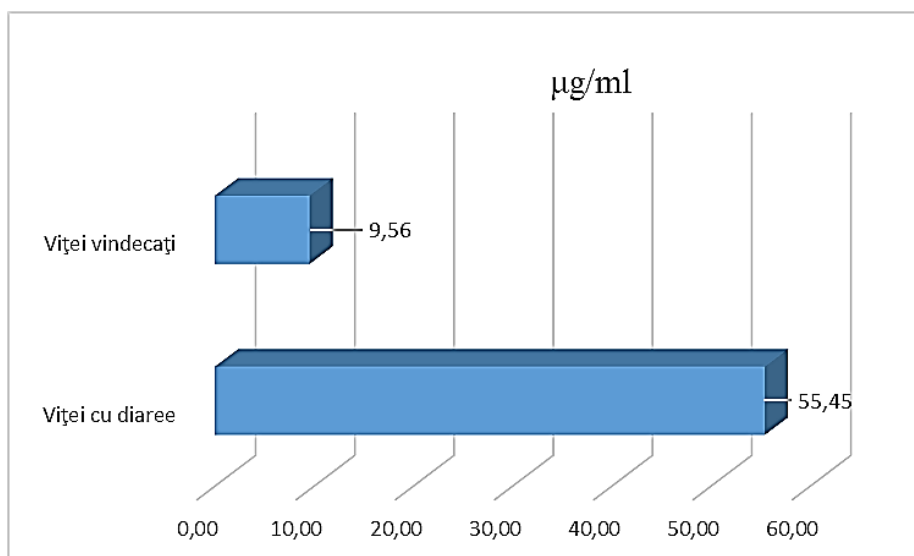


Fig. 10.8 Concentrațiile de haptoglobină (medie) în serul vițelilor cu diaree și a vițelilor care s-au vindecat de diaree. O diferență cu o valoare P mai mică de 0,05 conform testului T a fost considerată semnificativă ($p < 0,001$)

Fig. 10.8 Haptoglobin concentrations (mean) in the serum of calves with diarrhea and calves that recovered from diarrhea. A difference with a P value less than 0.05 according to T- test was considered significant ($p < 0,001$)

Hp și amiloidul seric A sunt cele mai frecvente proteine de fază acută la bovine (Cray, 2009). Proteinele de fază acută sunt proteine plasmatic sintetizate de hepatocite ca răspuns la stres, infecție, leziuni tisulare sau inflamații. Un alt studiu a sugerat că

modificările concentrațiilor de proteine de fază acută la nou-născuți pot reflecta mecanismele de adaptare necesare vieții extrauterine (Martin,2005).

Pentru a testa această ipoteză, am analizat probele de sânge ale unui eșantion de 20 de viței, în momentul episoadelor de diaree și după vindecare. Rezultatele obținute sunt redată grafic în fig. 10.8.

O creștere a concentrației de haptoglobină este în mod obișnuit legată de intensitatea unei reacții inflamatorii, prin urmare concentrația de haptoglobină serică a fost mai mare la viței cu semne clinice de diaree ($55,45 \pm 163 \mu\text{g/ml}$) comparativ cu aceeași viței vindecați de diaree ($9,56 \pm 23,7 \mu\text{g/ml}$).

Concentrațiile de haptoglobină serică au fost de 5,8 ori mai mari la viței cu diaree, cu o diferență semnificativă statistic ($p < 0,001$) între viței bolnavi și viței vindecați.

10.3. Concluzii parțiale

Cercetările efectuate în vederea evaluării variațiilor concentrațiilor serice de Hp în urma aportului de colostru la viței nou-născuți ne orientează spre următoarele concluzii:

1. Rezultatele obținute au arătat schimbări subtile, dar semnificative ale haptoglobinei serice la viței în urma consumului de colostru.
2. Cele mai mici valori obținute au fost înaintea consumului de colostru ($2,03 \mu\text{g/ml}$), iar cele mai mari la sfârșitul primei săptămâni de viață ($7,43 \mu\text{g/ml}$).
3. Concentrațiile mai mari de haptoglobină la viței pot fi rezultatul unor factori de stres, infecții sau a unor boli inflamatorii, precum diareea neonatală.

CAPITOLUL 11 - INVESTIGAȚII PRIVIND RĂSPUNSUL IMUN AL VIȚELOR ÎN URMA APLICĂRII UNEI SCHEME DE IMUNIZARE ACTIVĂ

CHAPTER 11 - INVESTIGATIONS REGARDING THE IMMUNE RESPONSE OF CALVES AS A RESULT OF THE APPLICATION OF AN ACTIVE IMMUNIZATION SCHEME

Vaccinurile administrate unei vaci înainte de fătare cresc anticorpii colostrali împotriva acelor antigene specifice. Acest lucru a fost demonstrat cel mai bine cu vaccinurile care sunt administrate vacilor împotriva agenților patogeni ai diareei neonatale (Cortese, 2009). Aceste vaccinuri sunt concepute pentru a crește concentrația de anticorpi colostrali împotriva unor organisme specifice care cauzează diaree la viței, cum ar fi *Escherichia coli*, rotavirus și coronavirus. Însă părerile sunt contradictorii. Ellis ș.a. (1996) au demonstrat că titrul de anticorpi colostrali a crescut în urma vaccinării vacilor cu un vaccin viral viu modificat. De asemenea, Schmidt ș.a. (2018) au demonstrat că imunizarea vacilor cu vaccin ce conține toxine Shiga inactivate și recombinat genetic, determină un răspuns imun mai eficient al vițelilor împotriva tulpinilor de *E.coli* producătoare de Shiga toxin în efectivul de viței studiat.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea nivelului de anticorpi specifici anti- BoRV, anti-BoCV și anti-E.coli F5 (K99) în serul vacilor gestante, în colostru și în serul vițelilor nou-născuți pentru a putea pune în evidență transferul imun pasiv. Răspunsurile imune au fost comparate pe baza titrurilor de anticorpi (evaluate prin ELISA) evidențiate în probele analizate (digestive) în efectivele de bovine.

11.1. Materiale și metode

În vederea realizării studiului comparativ s-au stabilit 2 loturi a câte 20 de perechi de vacă-vițel de la care au fost recoltate 104 de probe de ser și 40 de probe de colostru în perioada noiembrie 2019 – decembrie 2020.

Lotul martor a fost format din 20 de vaci, rasa Holstein, respectiv cei 20 de viței ai acestora. Lotului martor nu i s-a aplicat nici o metoda de imunoprofilaxie specifică, în afara celor din programul strategic național, deci nici un vaccin contra rotavirus, coronavirus sau E.coli F5 (K99).

Vițelilor li s-a administrat o doză de 4 litri de colostru proaspăt recoltat de la mamele lor în prima oră de viață.

Probele de sânge de la vacile gestante au fost recoltate în intervalul 240-250 de zile de gestație, iar probele de colostru imediat după parturiție. Probele de sânge de la viței au fost recoltate în intervalul 24-48 de ore de viață.

Lotul experimental a fost format din 20 de vaci Holstein care au fost imunizate cu vaccinul Rotavec Corona la data de 23.10.2019, în doză de 2 ml intramuscular, în intervalul 220-230 de zile de gestație și 22 de viței proveniți din mamele vaccinate. În lotul experimental s-au înregistrat 2 sarcini gemelare. Probele de sânge au fost recoltate la 21 de zile post vaccinare, respectiv în intervalul 241-251 de zile de gestație. Probele de colostru au fost recoltate imediat după fătare.

Vițeilor li s-a administrat o doză de 4 litri de colostru proaspăt recoltat de la mamele lor în prima oră de viață. S-au recoltat probe de sânge înaintea administrării colostrului și ulterior la 24-48 de ore de viață.

Probele de ser și colostru au fost testate pentru a evalua eficiența instalării unei imunități active la vacile gestante vaccinate și a unei imunități pasive la viței, ca urmare a administrării colostrului și a trecerii anticorpilor specifici de la nivel intestinal la nivel sangvin. Cu ajutorul kiturilor ELISA specifice, au fost puși în evidență anticorpi specifici anti-Coronavirus, anti-Rotavirus și anti-E.coli.

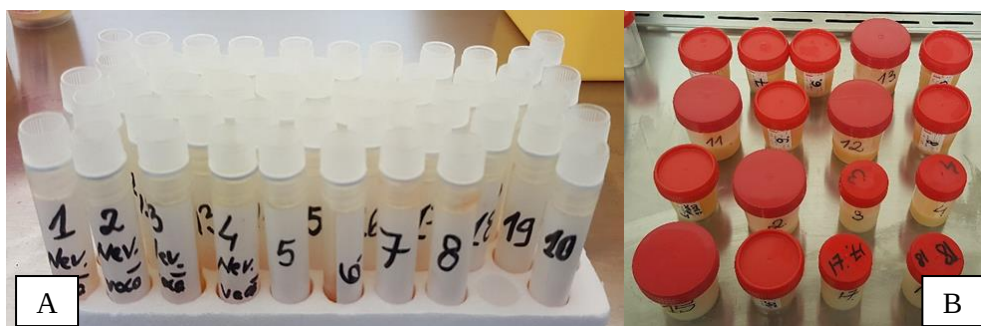


Fig. 11.1 Probe de ser - A; probe de colostru - B (original)
Fig. 11.1 Serum samples - A; colostrum samples - B (original)

Imunoprofilaxia specifică folosită

Rotavec™ Corona MSD Animal Health este o emulsie injectabilă pentru bovine ce conține:

- Bovine rotavirus, tulpina UK-Compton, serotipul G6 P5 (inactivat) - 1/4 din doza vaccinală stimulează un titru de anticorpi determinați prin virus neutralizare: $\geq 7.7 \log_2/\text{ml}$ (Porci de Guinee).
- Bovine coronavirus, tulpina Mebus (inactivată) - 1/20 din doza vaccinală stimulează un titru de anticorpi determinați prin ELISA: $\geq 3.41 \log_{10}/\text{ml}$ (Porci de Guinee).
- E. coli F5 (K99) aglutinat - 1/20 din doza vaccinală stimulează un titru de anticorpi determinați prin ELISA (OD492): > 0.64 (Porci de Guinee).

Vaccinul este indicat pentru imunizarea activă a vacilor gestante și a junincilor cu producere de anticorpi împotriva E. coli aglutinat F5 (K99), rotavirusului și

coronavirusului bovin. În urma hrănirii vițelilor cu colostru de la vacile vaccinate, în timpul primelor 2 până la 4 săptămâni de viață, anticorpii prezenți au demonstrat că:

- reduc severitatea diareei provocată de E. coli F5 (K99),
- reduc incidența diareelor produse de rotavirus,
- reduc diseminarea virusului de către vacile infectate cu rotavirus sau coronavirus.

Protecția pasivă împotriva patogenilor începe prin consumul de colostru. La vițelii hrăniți artificial cu colostru, protecția va dura până când încetează hrănirea, iar la vițelii hrăniți natural, protecția împotriva rotavirusului va persista cel puțin 7 zile și împotriva coronavirusului cel puțin 14 zile. Protecția vițelilor depinde de prezența anticorpilor colostrali (de la vacile vaccinate) în tractul intestinal în timpul primelor 2-3 săptămâni de viață, până când vițelii își dezvoltă propria imunitate. De aceea este esențială asigurarea unei hrăniri adecvate cu colostru în această perioadă pentru o eficacitate maximă a vaccinării. Rezultate optime vor fi obținute dacă întreg efectivul va fi vaccinat, asigurând vițelilor din fermă un nivel minim al infecției și excreției virale.

Teste folosite și metode de calcul statistic

Determinarea indirectă a titrurilor de anticorpi post vaccinali s-a realizat cu ajutorul kiturilor imunoenzimice de competiție ELISA Bovine Rotavirus BIO-X Diagnostics , ELISA Coronavirus BIO-X Diagnostics pentru probe de ser și colostru, respectiv ELISA blocking E. coli F5 (K99) BIO-X Diagnostics pentru probe de ser. Analizele au fost efectuate în cadrul laboratorului de Imunologie al FMV Iași.



Fig. 11.2 Kit ELISA de competiție Bovine Rotavirus BIO-X Diagnostics (original)

Fig. 11.2 BIO-X Diagnostics Bovine Rotavirus Competition ELISA Kit (original)

Pentru serodiagnosticul infecțiilor cu rotavirus, s-a utilizat kitul ELISA de competiție Bovine Rotavirus BIO-X Diagnostics (fig. 11.2), ce poate fi utilizat pentru identificarea anticorpilor în serul sangvin, plasmă și colostru. În acest fel se poate evalua eficiența protecției pasive specifice la vițeii care primesc colostru de la vaci vaccinate împotriva rotavirusului. Resorbția imunoglobulinelor specifice și nespecifice de la nivel intestinal se realizează în câteva ore, după care acestea pot fi puse în evidență în serul sangvin.

Compoziție kit:

- ✓ Plăci de microtitrare cu 96 de godeuri sensibilizate cu antigen rotavirus;
- ✓ Soluție de spălare (flacon 100 ml) concentrată (20x). Soluția cristalizează spontan când este rece. Se aduce flaconul la 21°C +/- 3°C până la dispariția tuturor cristalelor. Se amestecă bine, se diluează 1:20 cu apă distilată sau demineralizată. Soluția diluată se depozitează la + 2 - 8°C;
- ✓ Tampon de diluție colorat 5x (flacon 30 ml) sticlă colorată pentru diluarea probelor și a conjugatului enzimatic. Diluarea se face cu 1:5 cu apă distilată sau demineralizată. Dacă se formează un depozit în partea de jos a recipientul, se filtrează soluția cu hârtie filtrantă Whatman;
- ✓ Conjugat enzimatic anticorpi monoclonali anti-rotavirus-peroxidază (2,5 ml). Reactivul trebuie diluat 1:20 cu tamponul de diluție;
- ✓ Ser pozitiv (fl. 0,5ml);
- ✓ Ser negativ (fl. 0,5ml);
- ✓ TMB (flacon 25 ml), gata de utilizare – Tetrametilbenzidină (substrat cromogen);
- ✓ Soluție de stopare (flacon 15 ml) - acid fosforic 1 M.

Mod de lucru:

1. Înainte de utilizare toți reactivii s-au adus la 21°C +/- 3°C;
2. S-a realizat diluția probelor;
3. S-au distribuit câte 100 µl din probele de ser și de colostru de testat diluate, precum și serurile de referință (serul pozitiv și serul negativ);
4. S-a diluat 1:20 conjugatul enzimatic cu soluție tampon de diluare și s-au distribuit câte 100 µl în fiecare godeu;
5. S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la 21°C +/- 3°C, timp de o oră;

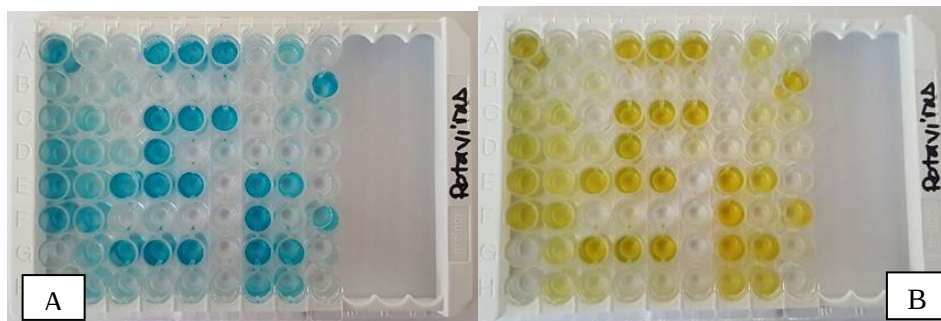


Fig. 11.3 Aspect placă după adăugarea substratului cromogen - A; aspect placă după stopare reacție - B (original)

Fig. 11.3 Plaque appearance after the addition of the chromogenic substrate - A; plate appearance after stop reaction - B (original)

6. S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μ l soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600;
7. S-au adăugat câte 100 μ l de substrat cromogen (TMB) în fiecare godeu. Soluția de cromogen trebuie să fie absolut incoloră, o culoare albastră vizibilă, fiind semn de contaminare;
8. S-a incubat timp de 10 minute, la 21°C +/- 3°C, la întuneric (fig. 11.3 A);
9. S-au adăugat câte 50 μ l de soluție de stopare în fiecare godeu (culoarea albastră va deveni galbenă - fig. 11.3 B);
10. Citirea densității optice s-a realizat în interval de 5-10 minute cu ajutorul spectrofotometrului Stat Fax 3200 Awareness Technology, utilizând un filtru de 450 nm.

Calcularea rezultatelor

După măsurarea densității optice (DO) a serului pozitiv și negativ (DO poz și DO neg) și ale tuturor probelor de ser și de colostru (DO probe), s-a calculat procentul de inhibiție (% inh) pentru fiecare probă testată și serul pozitiv cu ajutorul următoarelor formule:

$$\% \text{ inh probă} = [(DO \text{ neg} - DO \text{ probă}) / DO \text{ neg}] * 100$$

$$\% \text{ inh pozitiv} = [(DO \text{ neg} - DO \text{ poz}) / DO \text{ neg}] * 100$$

Validarea testului

Testul poate fi validat numai dacă sunt îndeplinite următoarele două condiții:

$$DO \text{ neg} - DO \text{ poz} > 0,5$$

$$\% \text{ inh pozitiv} > 40$$

Pentru validarea testului s-au aplicat formulele de calcul ale celor doi parametri.

$$\checkmark \quad DO \text{ neg} - DO \text{ poz} = 1,868 - 0,281 = 1,585 > 0,5$$

$$\checkmark \quad \% \text{ inh pozitiv} = 84,85 > 40$$

Aplicând formula oferită de producător s-au calculat valorile procentelor de inhibiție ale probelor de ser și colostru, iar valorile se regăsesc în tabelul 11.1.

Pentru serodiagnosticul infecțiilor cu coronavirus s-a utilizat kitul ELISA de competiție Bovine Coronavirus BIO-X Diagnostics (fig. 11.4), ce poate fi utilizat pentru identificarea anticorpilor în serul sangvin, plasmă și colostru. În acest fel se poate evalua eficiența protecției pasive specifice la vițeii care primesc colostru de la vaci vaccinate împotriva coronavirusului. Resorbția imunoglobulinelor specifice și nespecifice de la nivel intestinal se realizează în câteva ore, după care acestea pot fi puse în evidență în serul sangvin.



Fig. 11.4 Kit ELISA de competiție Bovine Coronavirus BIO-X Diagnostics (original)

Fig. 11.4 BIO-X Diagnostics Bovine Coronavirus Competition ELISA Kit (original)

Compoziție kit:

- ✓ Plăci de microtitrare cu 96 de godeuri sensibilizate cu antigen coronavirus bovin purificat;
- ✓ Soluție de spălare (flacon 100 ml) concentrată (20x). Soluția cristalizează spontan când este rece. Se aduce flaconul la 21°C +/- 3°C până la dispariția tuturor cristalelor. Se amestecă bine, se diluează 1:20 cu apă distilată sau demineralizată. Soluția diluată se depozitează la + 2 - 8°C;
- ✓ Tampon de diluție colorat 5x (flacon 30 ml) sticlă colorată pentru diluarea probelor și a conjugatului enzimatic. Diluarea se face cu 1:5 cu apă distilată sau demineralizată. Dacă se formează un depozit în partea de jos a recipientul, se filtrează soluția cu hârtie filtrantă Whatman;

- ✓ Conjugat enzimatic anticorpi monoclonali anti-coronavirus-peroxidază (1.25 ml).
Reactivul trebuie diluat 1:20 cu tamponul de diluție;
- ✓ Ser pozitiv (fl. 0,5ml);
- ✓ Ser negativ (fl. 0,5ml);
- ✓ TMB (flacon 25 ml), gata de utilizare – Tetrametilbenzidină (substrat cromogen);
- ✓ Soluție de stopare (flacon 15 ml) - acid fosforic 1 M.

Mod de lucru:

1. Înainte de utilizare, toți reactivii s-au adus la 21°C +/- 3°C;
2. S-a realizat diluția probelor;

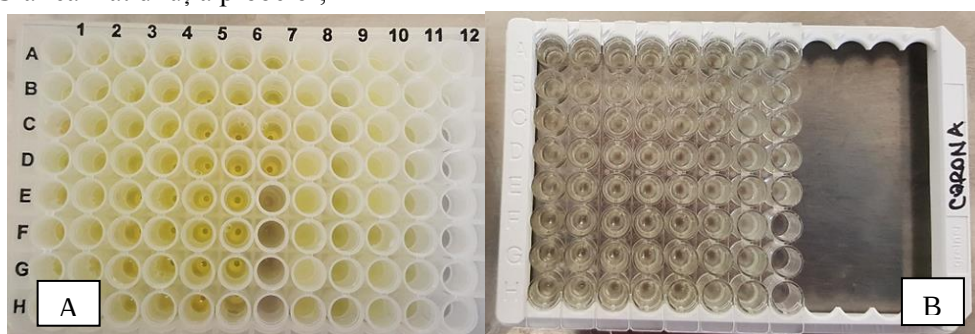


Fig. 11.5 Diluții probe de colostru - A; repartizare probe în placă - B (original)

Fig. 11.5 Dilutions of colostrum samples - A; distribution of samples in the plate - B (original)

3. S-au distribuit câte 100 µl din probele de ser și de colostru de testat diluate, precum și serurile de referință (serul pozitiv și serul negativ);
4. S-a diluat 1:20 conjugatul enzimatic cu soluție tampon de diluare și s-au distribuit câte 100 µl în fiecare godeu;
5. S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la 21°C +/- 3°C, timp de o oră;
6. S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 µl soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600;
7. S-au adăugat câte 100 µl de substrat cromogen (TMB) în fiecare godeu. Soluția de cromogen trebuie să fie absolut incoloră, o culoare albastră vizibilă, fiind semn de contaminare;
8. S-a incubat timp de 10 minute, la 21°C +/- 3°C, la întuneric (fig. 12.3 A);
9. S-au adăugat câte 50 µl de soluție de stopare în fiecare godeu (culoarea albastră va deveni galbenă - fig. 12.3 B);
10. Citirea densității optice s-a realizat în interval de 5-10 minute cu ajutorul spectrofotometrului Stat Fax 3200 Awareness Technology, utilizând un filtru de 450 nm.

Calcularea rezultatelor

După măsurarea densității optice (DO) a serului pozitiv și negativ (DO poz și DO neg) și ale tuturor probelor de ser și de colostru (DO probe), s-a calculat procentul de inhibiție (% inh) pentru fiecare probă testată și serul pozitiv cu ajutorul următoarelor formule:

$$\% \text{ inh probă} = [(DO \text{ neg} - DO \text{ probă}) / DO \text{ neg}] * 100$$

$$\% \text{ inh pozitiv} = [(DO \text{ neg} - DO \text{ poz}) / DO \text{ neg}] * 100$$

Validarea testului

Testul poate fi validat numai dacă sunt îndeplinite următoarele două condiții:

$$DO \text{ neg} - DO \text{ poz} > 0,5$$

$$\% \text{ inh pozitiv} > 40$$

Pentru validarea testului s-au aplicat formulele de calcul ale celor doi parametri.

$$\checkmark DO \text{ neg} - DO \text{ poz} = 2 - 0,029 = 1,971 > 0,5$$

$$\checkmark \% \text{ inh pozitiv} = 98,55 > 40$$

Aplicând formula oferită de producător, s-au calculat valorile procentelor de inhibiție ale probelor de ser și colostru, iar valorile se regăsesc în tabelul 11.2.



Fig. 11.6 Kit ELISA blocking E. coli F5 (K99) BIO-X Diagnostics (original)

Fig. 11.6 BIO-X Diagnostics E. coli F5 (K99) blocking ELISA Kit (original)

Escherichia coli enterotoxigenă care posedă un aparat fimbrial (F5) bine reprezentat cu rol de atașare la suprafața celulară poate fi identificată la viței cu vârstă mai mică de trei zile, în special la subiecții care nu au primit colostru care să conțină anticorpi împotriva acestui agent patogen și a antigenului fimbrial.

Pentru identificarea anticorpilor serici postvaccinali transmiși prin colostru de la mamele imunizate la viței s-a utilizat kitul ELISA blocking E. coli F5 (K99) BIO-X Diagnostics (fig. 11.6).

Compoziție kit:

- ✓ Plăci de microtitrare cu 96 de godeuri sensibilizate cu antigen E. coli F5;
- ✓ Soluție de spălare (flacon 100 ml) concentrată (20x). Soluția cristalizează spontan când este rece. Se aduce flaconul la 21°C +/- 3°C până la dispariția tuturor cristalelor. Se amestecă bine, se diluează 1:20 cu apă distilată sau demineralizată. Soluția diluată se depozitează la + 2 - 8°C;
- ✓ Tampon de diluție colorat (flacon 60 ml) gata de utilizare;
- ✓ Conjugat enzimatic anticorpi monoclonali anti-E.coli F5 - peroxidază (0,3 ml). Reactivul trebuie diluat 1:50 cu tamponul de diluție;
- ✓ Ser pozitiv (fl. 0,5ml) liofilizat, s-a reconstituit;
- ✓ Ser negativ (fl. 0,5ml);
- ✓ TMB (flacon 25 ml), gata de utilizare – Tetrametilbenzidină (substrat cromogen);
- ✓ Soluție de stopare (flacon 15 ml) - acid fosforic 1 M.

Mod de lucru:

1. Înainte de utilizare, toți reactivii s-au adus la 21°C +/- 3°C;
2. S-a realizat diluția 1:2 a probelor de ser de testat, precum și a serurilor de referință (serul pozitiv și serul negativ);
3. S-au distribuit câte 100 μl din probele de ser și de colostru de testat diluate, precum și serurile de referință (serul pozitiv și serul negativ);
4. S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la 37°C, timp de 2 ore;
5. S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μl soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600 (fig. 11.7);
6. S-a diluat 1:50 conjugatul enzimatic cu soluție tampon de diluare și s-au distribuit câte 100 μl în fiecare godeu;
7. S-a sigilat microplaca cu folie și s-a incubat la 37°C, timp de 1/2 ore;
8. S-a golit placa și s-a spălat de 3 ori cu câte 300 μl soluție de spălare diluată. S-a utilizat Microplate Washer Stat Fax 2600;
9. S-au adăugat câte 100 μl de substrat cromogen (TMB) în fiecare godeu. Soluția de cromogen trebuie să fie absolut incoloră, o culoare albastră vizibilă, fiind semn de contaminare;

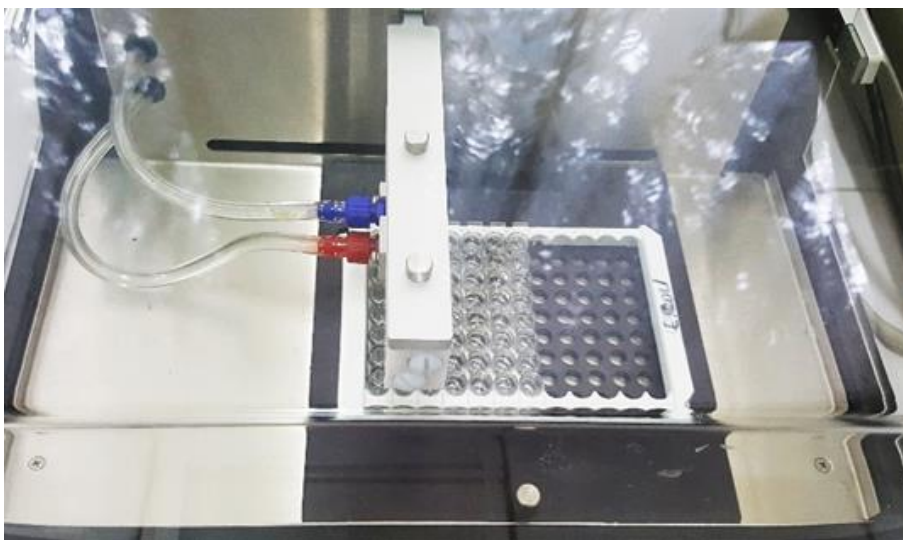


Fig. 11.7 Spălarea automată a plăcilor (original)
Fig. 11.7 Automatic plate washing (original)

10. S-a incubat timp de 10 minute, la 21°C +/- 3°C, la întuneric;
11. S-au adăugat câte 50 µl de soluție de stopare în fiecare godeu (culoarea albastră va deveni galbenă);
12. Citirea densității optice s-a realizat în interval de 5-10 minute cu ajutorul spectrofotometrului Stat Fax 3200 Awareness Technology, utilizând un filtru de 450 nm.

Calcularea rezultatelor

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.021	2.263	2.195	0.112	0.027	2.092	1.961
B	2.158	0.13	0.248	2.211	2.277	2.128	2.114
C	0.034	2.369	0.129	0.023	0.032	2.355	2.125
D	0.055	0.027	0.752	0.019	2.382	2.303	0.848
E	0.035	0.097	0.019	0.024	2.342	2.142	
F	0.481	2.196	0.02	0.033	2.354	2.237	
G	0.03	0.052	2.061	2.231	2.423	2.239	
H	0.025	1.467	0.019	0.021	2.281	2.237	

Fig. 11.8 Valori densități optice (DO) probe de ser și colostru (original)
Fig. 11.8 Optical density values (OD) serum and colostrum samples (original)

După măsurarea densității optice (DO) a serului pozitiv și negativ (DO poz și DO neg) și ale tuturor probelor de ser și de colostru (DO probe), s-a calculat procentul de

inhibiție (% inh) pentru fiecare probă testată și serul pozitiv cu ajutorul următoarelor formule:

$$\% \text{ inh probă} = [(\text{DO neg} - \text{DO probă}) / \text{DO neg}] * 100$$

$$\% \text{ inh pozitiv} = [(\text{DO neg} - \text{DO poz}) / \text{DO neg}] * 100$$

Validarea testului

Testul poate fi validat numai dacă sunt îndeplinite următoarele două condiții:

$$\text{DO neg} - \text{DO poz} > 0,7$$

$$\% \text{ inh pozitiv} > 50$$

Pentru validarea testului s-au aplicat formulele de calcul ale celor doi parametri.

$$\checkmark \text{ DO neg} - \text{DO poz} = 2,159 - 0,021 = 2,138 > 0,7$$

$$\checkmark \% \text{ inh pozitiv} = 99,22 > 50$$

Aplicând formula oferită de producător, s-au calculat valorile procentelor de inhibiție ale probelor de ser și colostru, iar valorile se regăsesc în tabelul 11.3.

Datele statistice descriptive și comparațiile intra-grup au fost efectuate folosind programele IBM SPSS Statistics Subscription și Microsoft Office Excel.

11.2. Rezultate și discuții

Analiza statistică a rezultatelor obținute cu ajutorul kiturilor imunoenzimaticice de competiție ELISA Bovine Rotavirus BIO-X Diagnostics sunt redate în tabelul 5.1.

În urma administrării vaccinului, se poate observa că în lotul experimental nivelul de anticorpi anti-rotavirus în serul vacilor gestante a crescut considerabil față de lotul martor, în lotul E înregistrându-se o medie de 77% PI, față de 41,5% PI în lotul M (valoare $p < 0,001$).

Totodată, un nivel seric crescut de anticorpi al vacilor gestante imunizate (lotul E) a determinat un nivel ridicat al anticorpilor specifici sintetizați în colostru (79,3% PI), ceea ce a dus la un grad mai mare de absorbție serică la viței (94,4% PI).

Tabel 11.1/ Table 11.1

Valorile anticorpilor anti-rotavirus bovin (BoRV), exprimat în procente de inhibiție (%), măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițeiilor

Bovine anti-rotavirus (BoRV) antibody values, expressed as percent inhibition (%), measured by competitive ELISA in pregnant cow serum, colostrum and calf serum

Antigen	Parametri statistici	PI% Lot martor (M)			PI% Lot experimental (E)		
		Ser vaci gestante	Colostru	Ser viței 24-48 h de viață	Ser vaci gestante	Colostru	Ser viței 24-48 h de viață
BoRV tulpina UK-Compton, serotipul G6 P5 (inactivat)	$\bar{X}$	41,5	52,9	59,0	77,0	79,3	94,4
	SE	3,7	4,2	5,2	6,0	6,4	1,1
	Val. mediană	36,0	60,1	64,2	78,9	89,2	95,1
	SD	11,7	13,1	16,3	18,9	20,3	3,7
	Val. minimă	33,2	33,2	33,9	33,2	35,0	88,3
	Val. maximă	67,2	64,1	74,8	97,7	97,9	98,5
	CI 95%	8,4	9,4	11,7	13,5	14,5	2,3
Valoarea p		Ser vaci M/E p<0,001 ; Colostru M/E p<0,008 ; Ser viței M/E p<0,001					

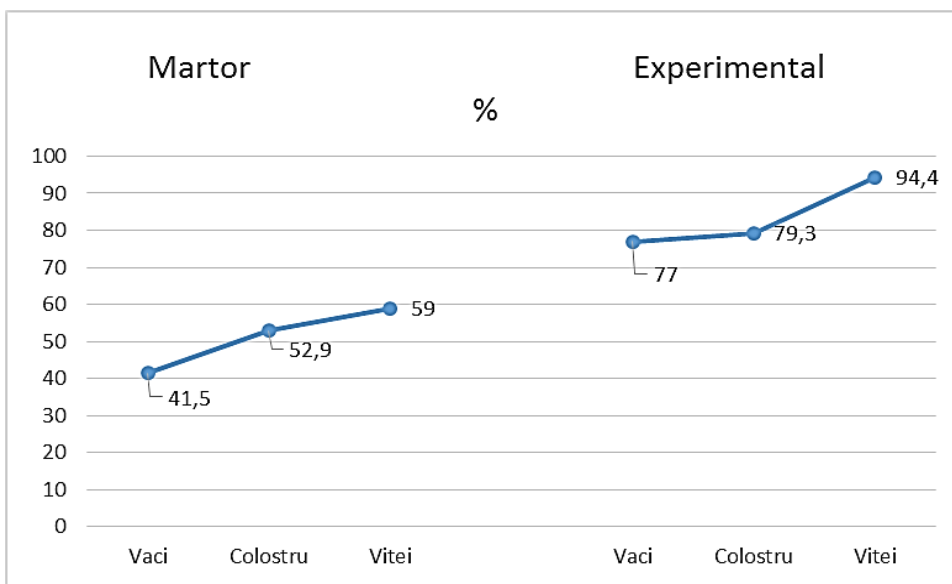


Fig. 11.9 Graficul valorilor medii ale anticorpilor anti-rotavirus bovin (BoRV), exprimat în procente de inhibiție % măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițelor
 Fig. 11.9 Graph of mean values of bovine anti-rotavirus antibodies (BoRV), expressed as% inhibition measured with competitive ELISA from pregnant cows, colostrum and calves

În serul vițelor din lotul experimental se înregistrează o medie de 94,4% PI cu valori minime de 88,3% PI și maxime de 98,5% PI, iar în lotul martor s-a înregistrat o medie de 59% PI și valori minime de 33,9% PI și maxime de 74,8% PI (tabel 11.1). Diferența dintre mediile din cele 2 loturi este semnificativ statistică cu o valoare $p < 0,001$.

Pe baza datelor din tabelul 11.1 s-a realizat figura 11.9 unde sunt reprezentate grafic valorile medii ale PI% obținute. Se poate observa că nivelul de anticorpi serici vaci-anticorpi colostrali-anticorpi serici viței înregistrează în ambele cazuri o curbă ascendentă, valorile cele mai ridicate înregistrându-se în lotul experimental. Aceste valori confirmă faptul că vaccinarea a crescut semnificativ titlurile de anticorpi serici specifici.

În tabelul 11.2 este redată analiza statistică a rezultatelor obținute cu ajutorul kiturilor imunoenzimatic de competiție ELISA Bovine Coronavirus BIO-X Diagnostics. Ca și în cazul analizei anticorpilor anti-rotavirus se poate observa că în lotul experimental nivelul de anticorpi anti-coronavirus în serul vacilor gestante a crescut considerabil față de lotul martor, în lotul E înregistrându-se o medie de 96,2% PI, față de 32,6% PI în lotul M (valoare $p < 0,001$).

Prezența anticorpilor specifici anti-coronavirus a fost decelată într-un nivel mai mare în serul vacilor gestante în comparație cu anticorpii serici anti-rotavirus bovin, diferențele PI% dintre lotului E și M în cazul coronavirusului fiind mai mare (63,6% PI) față de aceeași categorie în cazul rotavirusului (35,4% PI).

Tabel 11.2/Table 11.2

Valorile anticorpilor anti-coronavirus bovin (BoCV), exprimat în procente de inhibiție %, măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițeiilor

Bovine anti-coronavirus (BoCV) antibody values, expressed as% inhibition, measured with competitive ELISA from pregnant cows' serum, colostrum and calf sera

Antigen	Parametri statistici	PI% Lot martor (M)			PI% Lot experimental (E)		
		Ser vaci gestante	Colostru	Ser viței 24-48 h de viață	Ser vaci gestante	Colostru	Ser viței 24-48 h de viață
BoCV tulpina Mebus (inactivată)	$\bar{X}$	32,6	40,0	48,2	96,2	96,4	97,3
	SE	2,2	4,7	5,0	2,1	1,8	1,0
	Val. mediană	29,7	43,2	56,4	99,1	98,9	99,1
	SD	7,0	14,7	15,8	6,7	5,8	3,5
	Val. minimă	27	18,3	25,3	79,3	80,2	89,7
	Val. maximă	49	60,6	66,9	99,3	99,1	99,2
	CI 95%	5	10,5	11,3	4,8	4,2	2,2
Valoarea p		Ser vaci M/E p<0,001; Colostru M/E p<0,001; Ser viței M/E p< p<0,001.					

Nivelul seric crescut de anticorpi al vacilor gestante imunizate (lotul E) a determinat un nivel ridicat de sinteză a anticorpilor specifici în colostru (98,9% PI).

În serul vițelor din lotul experimental se înregistrează o medie de 97,3% PI cu valori minime de 89,7% PI și maxime de 99,2% PI, iar în lotul martor s-a înregistrat o medie de 32,6% PI și valori minime de 27% PI și maxime de 49% PI (tabel 11.2). Diferența dintre mediile celor 2 loturi este semnificativ statistică cu o valoare $p < 0,001$.

Pe baza datelor din tabelul 11.2 s-a realizat figura 11.10 unde sunt reprezentate grafic valorile medii ale PI% obținute în urma analizei anticorpilor anti-coronavirus bovin.

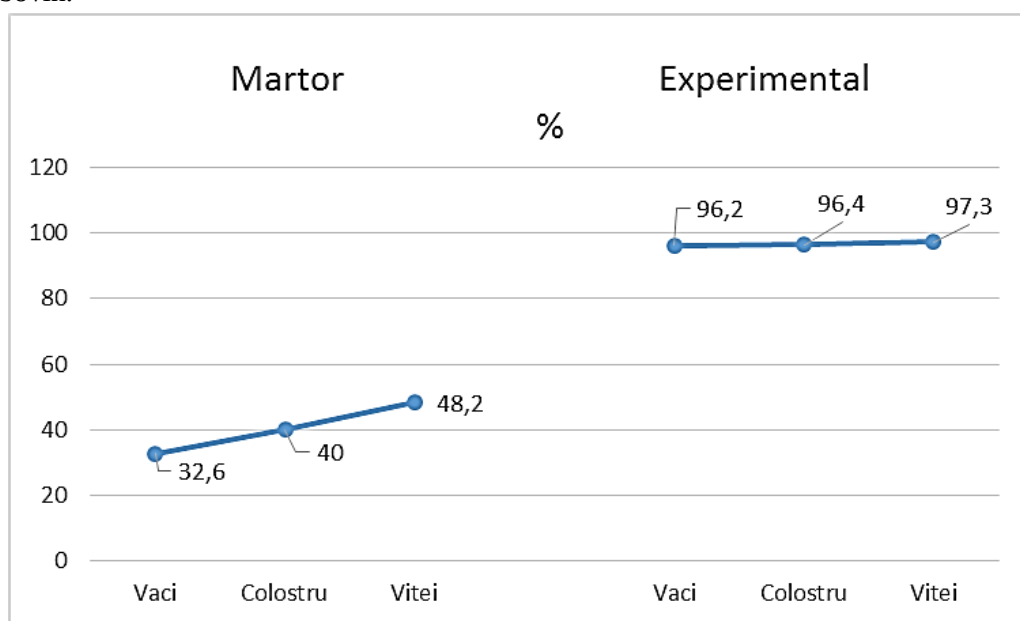


Fig. 11.10 Graficul valorilor medii ale anticorpilor anti-coronavirus bovin (BoCV), exprimat în procente de inhibiție măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițelor

Fig. 11.10 Graph of mean values of bovine anti-coronavirus antibodies (BoCV), expressed as percent inhibition measured by competitive ELISA in pregnant cow sera, colostrum and calf sera

Ca și în cazul rotavirusului, se poate observa că nivelul de anticorpi serici vaci-anticorpi colostrali-anticorpi serici viței înregistrează o curbă ascendentă în cazul lotului M, în timp ce în lotul E valorile se mențin aproximativ în platou.

Valorile crescute ale PI% în cazul coronavirusului bovin în lotul E confirmă faptul că vaccinarea a crescut semnificativ titlurile de anticorpi serici specifici.

Kitul ELISA blocking E. coli F5 (K99) BIO-X Diagnostics se pretează pentru testarea probelor de ser, nu și a celor de colostru. Analiza statistică a rezultatelor obținute este redată în tabelul 11.3.

Tabel 11.3/Table 11.3

Valorile anticorpilor anti- E. coli F5 (K99), exprimat în procente de inhibiție % măsurate cu ELISA blocking din serurile vacilor gestante și serurile vițeiilor Anti-E. coli F5 (K99) antibody values, expressed as percent inhibition measured with ELISA blocking in pregnant cow serums and calf sera

Antigen	Parametri statistici	PI% Lot martor (M)		PI% Lot experimental (E)	
		Ser vaci gestante	Ser viței 24-48 h de viață	Ser vaci gestante	Ser viței 24-48 h de viață
E. coli F5 (K99) aglutinat	$\bar{X}$	0,3	0,2	90,9	97,4
	SE	0,2	0,2	6,6	0,9
	Val. mediană	0	0	98,4	98,7
	SD	0,7	0,5	20,7	3,2
	Val. minimă	0	0	32,1	88,5
	Val. maximă	2,0	1,5	99,1	99,1
	CI 95%	0,5	0,4	14,8	2
	Valoarea p	Ser vaci M/E p<0,001 ; Ser viței M/E p<0,001 .			

În lotul M, atât în serul vacilor gestante cât și în serul vițelor s-a decelat o prezență infimă a anticorpilor anti-E.coli F5 (K99), cu o medie de 0,3% PI la vaci, respectiv 0,2% PI la viței și valori minime de 0 și maxime de 2% PI la vaci, respectiv 1,5% PI la viței.

Diferențele dintre lotul experimental și martor sunt semnificative statistic ($p < 0,001$), în lotul E înregistrându-se o medie a nivelului de anticorpi anti-E.coli F5 (K99) de 90,9% PI în cazul serului vacilor gestante și de 97,4% PI în cazul serului vițelor.

În lotul E, în cazul serului vacilor gestante valoarea minimă a fost de 32,1% PI și maximă de 99,1% PI, în timp ce în serul vițelor s-a înregistrat o valoare minimă de 88,5% PI și maximă de 99,1% PI.

Pe baza datelor din tabelul 11.3 s-a realizat figura 11.11 unde sunt reprezentate grafic valorile medii ale PI% obținute în urma analizei anticorpilor anti-E.coli F5 (K99). Se poate observa că în cazul lotului E, curba transmiterii anticorpilor specifici prin colostru este ascendentă, în timp ce în cazul lotului M aceasta este aproximativ în platou.

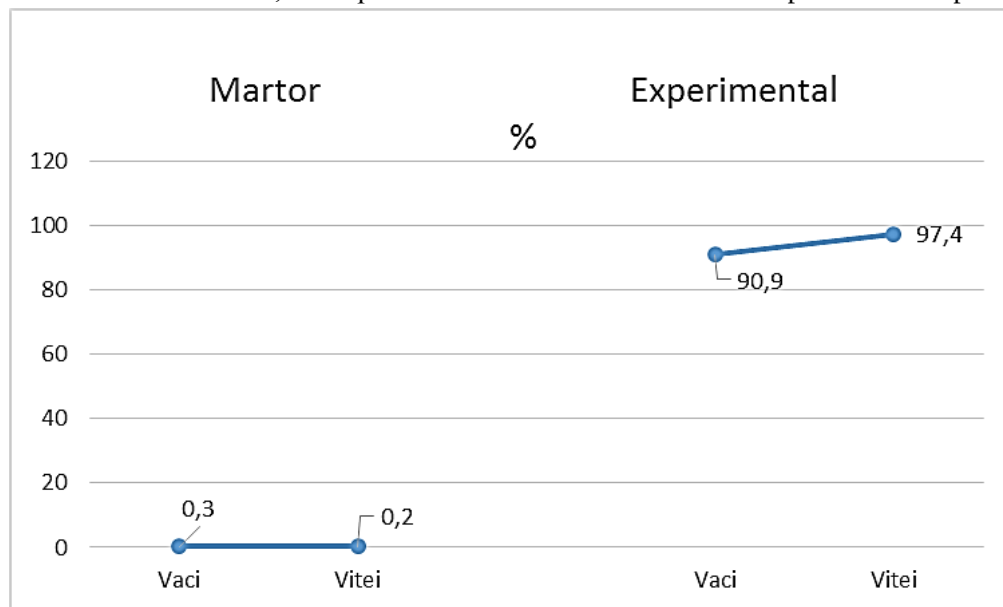


Fig. 11.11 Graficul valorilor medii ale anticorpilor anti-E.coli F5 (K99), exprimat în procente de inhibiție măsurate cu ELISA blocking din serurile vacilor gestante și serurile vițelor

Fig. 11.11 Graph of mean values of anti-E.coli F5 (K99) antibodies, expressed as inhibition percentages measured by blocking ELISA in pregnant cow sera and calf sera

Deoarece infecțiile cu rotavirus și coronavirus sunt endemice la bovine, majoritatea vacilor adulte au fost infectate în mod natural. Răspunsul susținut de anticorpii evidențiați în serul și colostrul vacilor din lotul M, se datorează cel mai probabil unei asemenea expuneri infecțioase.

De asemenea, și răspunsul imun al vacilor din lotul E se poate datora unei expuneri infecțioase primare anterioare vaccinării sistemice, însă vaccinarea determină o creștere evidentă a nivelurilor de anticorpi serici specifici.

Dacă în cazul rotavirusului și coronavirusului bovin s-au detectat în urma analizelor titruri de anticorpi maternali sintetizați în urma unor infecții active (lotul M), în cazul anticorpilor anti-E.coli F5 (K99) în lotul luat în studiu aceștia au fost aproape inexistenți.

Rezultatele obținute au evidențiat faptul că prin imunizarea activă a vacilor în ultima perioadă de gestație titrurile de anticorpi specifici au crescut semnificativ în lotul E față de lotul M, la toate cele 3 tulpini infecțioase. Acest lucru dovedește eficiența vaccinării în efectivul de animale.

Sistemul imun al vițelului nou-născut este imatur și incapabil să producă suficiente Ig pentru a combate infecțiile. Vițelul are o particularitate esențială sub aspect imunologic: titrul de anticorpi la naștere este zero, în perioada vieții intrauterine transferul de anticorpi pe cale transplacentară de la mamă la făt fiind nul. În consecință, acesta se naște fără imunitate umorală adecvată și este în totalitate dependent de transferul pasiv al Ig maternale prin intermediul colostrului. Pentru a verifica această ipoteză, s-au recoltat probe de sânge de la vițeii din lotul experimental înainte de administrarea colostrului și la 24/48 de ore după administrare pentru a pune în evidență nivelul anticorpilor anti-rotavirus, anti-coronavirus și anti-E.coli F5 (K99). Rezultatele sunt evidențiate în tabelul 11.4. În cele 22 de probe de ser recoltate înaintea administrării colostrului nu s-a decelat prezența anticorpilor anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin sau anti-E.coli F5 (K99) ceea ce evidențiază importanța administrării colostrului la vițeii nou-născuți în vederea transferului imun pasiv de imunoglobuline specifice anti-infecțioase.

Achiziția Ig prin absorbție intestinală protejează vițelul până la momentul în care sistemul imun propriu devine complet funcțional. Studiile de specialitate au raportat faptul că vițeii care au consumat colostru sintetizează cantități semnificative de Ig după 4 săptămâni de viață, iar cei privați de colostru începând cu primele 2 săptămâni de viață. Vițeii încep să sintetizeze propriile imunoglobuline la un nivel normal la vârsta de circa 8 săptămâni.

Starea de sănătate a vițelilor din lotul martor și cel experimental a fost supravegheată în primele 28 de zile de viață și a fost evaluat fiecare caz de diaree clinică apărut în efectiv. În vederea stabilirii unui diagnostic, s-au recoltat probe de fecale de la vițeii cu semne clinice de diaree și s-au testat folosind kitul de diagnostic rapid Huve Check°Calf Scours. Datele obținute sunt redată în tabelul 11.5.

Valorile anticorpilor din serul vițeiilor înainte și după administrarea colostrului, exprimate în procente de inhibiție % măsurate cu ELISA
 Calf serum antibody values before and after colostrum, expressed as % inhibition measured by ELISA

Tabel 11.4/Table 11.4

Valorile anticorpilor exprimate în PI % în funcție de antigen									
Parametri statistici	BoRV tulpina UK-Compton, serotipul G6 P5 (inactivat)			BoCV tulpina Mebus (inactivată)			E. coli F5 (K99) aglutinat		
	Ser viței înainte de colostru	Colostru	Ser viței 24-48 h de viață	Ser viței înainte de colostru	Colostru	Ser viței 24-48 h de viață	Ser viței înainte de colostru	Ser viței 24-48 h de viață	
$\bar{X}$	0	79,3	94,4	0	96,4	97,3	0	97,4	
SE	0	6,4	1,1	0	1,8	1,0	0	0,9	
Val. mediană	0	89,2	95,1	0	98,9	99,1	0	98,7	
SD	0	20,3	3,7	0	5,8	3,5	0	3,2	
Val. minimă	0	35,0	88,3	0	80,2	89,7	0	88,5	
Val. maximă	0	97,9	98,5	0	99,1	99,2	0	99,1	
CI 95%	0	14,5	2,3	0	4,2	2,2	0	2	

După cum se poate observa în tabelul 11.5, nu s-a înregistrat nici o mortalitate în cele 2 loturi comparative. Morbiditya diareei clinice însă a fost mai mare în lotul martor (20%) comparativ cu lotul experimental (13,6%). De asemenea, nu sunt diferențe semnificative în ceea ce privește durata diareei la cazurile înregistrate în cele 2 loturi, aceasta fiind în medie de 3 zile. Durata tratamentului aplicat a avut variații mai mari în lotul martor (3-7 zile) față de lotul experimental (3-5 zile).

Tabel 11.5/ Table 11.5

Evaluarea cazurilor de diaree clinică din loturile de viței în primele 28 de zile de viață
Evaluation of cases of clinical diarrhea in calves in the first 28 days of life

	Viței Lot M - din mame nevaccinate	Viței lot E - din mame vaccinate
Nr. total	20	22
Nr. viței cu diaree	4	3
Mb %	20%	13,6%
Nr. viței morți din cauza diareei	0	0
Vârsta medie a vițelilor cu diaree minim/maxim (zile)	12,5 8/20	16,3 14/19
Durata medie a diareei minim/maxim (zile)	3,3	2,9
Durata medie a tratamentului diareei minim/maxim (zile)	5 3/7	3,6 3/5
Nr. viței pozitivi rotavirus /%	1 / 5%	0
Nr. viței pozitivi coronavirus	0	0
Nr. viței cu E.coli F5 (K99) /%	1 / 5%	1 / 4,5%

În urma testării s-au identificat 3 cazuri pozitive, o singură infecție cu rotavirus și două infecții cu *E.coli*. Rezultatul a fost negativ pentru coronavirus în ambele loturi.

Chiar dacă în urma vaccinării s-a evidențiat un nivel ridicat al transferului imun pasiv al anticorpilor specifici, nu se poate afirma că vaccinarea previne apariția focarelor de boală, fapt dovedit de morbiditatea redusă din lotul experimental de viței. Totuși, vârsta apariției diareei clinice mai mare în lotul E (14 zile) comparativ cu lotul M (8 zile) indică o protecție mai îndelungată a vițelilor care au primit colostru cu un nivel mai ridicat de anticorpi specifici obținuți în urma imunizării vacilor gestante (lotul E). Aceasta se poate explica prin faptul că nivelul de anticorpi din colostru scade progresiv în primele 2 zile de lactație și ulterior din lapte. Titrurile mai mici de anticorpi specifici colostrali vor scădea mai repede sub pragul de protecție infecțioasă, oferind o perioadă mai scurtă de imunitate locală în lumenul intestinal al vițelilor nou-născuți.

11.5. Concluzii parțiale

În urma investigațiilor privind răspunsul imun al vițelilor după aplicarea unei scheme de imunizare activă specifică, concluzionăm următoarele:

1. După imunizarea activă a vacilor gestante, titrurile de anticorpi specifici anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin și anti-E.coli F5 (K99) au crescut semnificativ în lotul experimental față de lotul martor, atât în serul vacilor gestante, cât și în colostru și în serul vițelilor nou-născuți.
2. În probele de ser recoltate înaintea administrării colostrului nu s-a decelat prezența anticorpilor anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin sau anti-E.coli F5 (K99) ceea ce evidențiază faptul că vițelii sunt în totalitate dependenți de transferul pasiv al Ig maternale prin intermediul colostrului.
3. Morbiditatea diareei clinice a fost mai mare în lotul de viței născuți din mame nevaccinate (20%) comparativ cu lotul de viței născuți din mame vaccinate (13,6%), iar durata tratamentului aplicat a avut variații mai mari în primul caz (3-7 zile).
4. Vârsta apariției semnelor clinice de diaree mai mare în lotul experimental (14 zile) comparativ cu lotul martor (8 zile) indică o protecție mai îndelungată a vițelilor care au primit colostru cu un nivel mai ridicat de anticorpi specifici.
5. Rezultatele obținute în urma acestui studiu dovedesc eficiența administrării unui vaccin specific în prevenirea și protecția diareei neonatale infecțioase în efectivele de bovine, în urma consumului de colostru.

CAPITOLUL 12 - CERCETĂRI PRIVIND MANAGEMENTUL COLOSTRULUI ȘI EVALUAREA TRANSFERULUI PASIV IMUN ÎN FERME DE VACI DE LAPTE

CHAPTER 12 - RESEARCHES REGARDING COLOSTRUM MANAGEMENT AND EVALUATION OF PASSIVE IMMUNE TRANSFER IN DAIRY FARMS

Scopul acestui studiu a constat în formarea unei imagini de ansamblu asupra metodelor de gestionare a colostrului în fermele de vaci din România și a avut ca obiectiv obținerea informațiilor cât mai actuale despre recoltare, manipulare, stocare și modul de administrare a colostrului la viței, precum și importanța acestor metode asupra stării de sănătate a vițelilor nou-născuți.

Administrarea colostrului este recunoscută ca fiind o componentă importantă a menținerii sănătății vițelului nou-născut, deoarece o absorbție adecvată a imunoglobulinelor colostrale este necesară pentru formarea unui status imun competent. Recomandările actuale sunt de a administra 3 până la 4 litri de colostru de înaltă calitate ($>50\text{g IgG/l}$) la vițelii nou-născuți, respectiv, cel puțin $150\text{-}200\text{g IgG}$, în decurs de 2 ore de la naștere pentru a evita eșecul transferului imunității pasive (Weaver ș.a., 2000; McGuirk și Collins, 2004; Chigerwe și colab., 2008).

Colostrul de înaltă calitate are concentrații adecvate de imunoglobulină, este lipsit de agenți patogeni și joacă un rol vital în sănătatea vițelilor nou-născuți. Procedurile care scad riscul de contaminare cu agenți patogeni includ colectarea colostrului de la vaci clinic sănătoase, alegerea metodei de stocare adecvate și pasteurizarea înainte de administrare.

Metodele de testare ale calității colostrului și ale serului sangvin la viței în vederea evaluării transferului pasiv de imunoglobuline încep să fie folosite la scară largă în cât mai multe ferme. Evaluarea proteinelor serice totale (PST) prin refractometrie este o metodă calitativă ce poate fi utilizată pentru a determina cu succes reușita transferului pasiv la viței (Moore ș.a., 2009). Măsurarea calității colostrului în teren, în special în ferme, este o metodă fiabilă, precisă și ușor de executat. Studiile recente au sugerat ca refractometrul este un instrument necesar pentru determinarea IgG din colostru și serul bovin (Quigley ș.a., 2002; Chigerwe ș.a., 2009; Biemann ș.a., 2010; Morrill ș.a., 2012). Refractometria reprezintă o aproximare de finețe a concentrației de IgG deoarece imunoglobulinele constituie o proporție mare de proteine din serul vițelilor nou-născuți, iar între acestea IgG reprezintă cel mai mare procent. Numeroase rapoarte din literatura de specialitate au documentat relația dintre proteinele serice totale și IgG (Weaver ș.a., 2000; Godden, 2008) concluzionând că evaluarea acestora cu ajutorul refractometriei

poate fi implementată ca sistem de monitorizare în ferme pentru gestionarea corectă a colostrului și ca predictor al sănătății vițelor.

Înțelegerea rolului informațiilor în identificarea și îmbunătățirea gestionării colostrului în ferme este un domeniu cheie de interes în cercetarea bunăstării animalelor. Creșterea gradului de conștientizare și educare a fermierilor cu privire la practicile legate de sănătate, influențează pozitiv bunăstarea vițelor (Beam ș.a., 2009).

12.1. Materiale și metode

Pentru a evalua metodele de management ale colostrului în fermele de vaci de lapte din România, am întocmit un chestionar standard cu Google Forms cu privire la manipularea, testarea, depozitarea și administrarea colostrului. La acest studiu au participat medici veterinari din 30 de ferme de vaci de lapte de pe teritoriul României. Majoritatea fermelor au efective cuprinse între 500 și 2000 de animale (fig. 12.1). Datele au fost colectate din martie până în iunie 2019, iar sondajul a inclus un interviu cu fiecare dintre medicii veterinari.

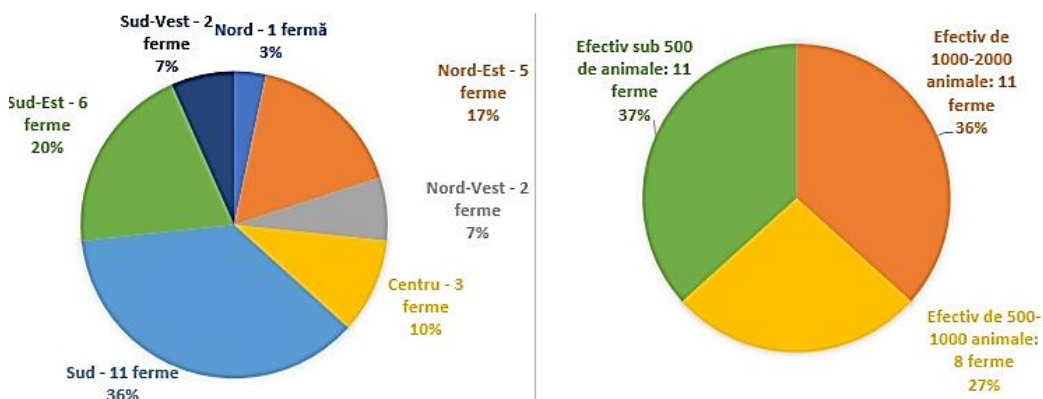


Fig. 12.1 Distribuția pe teritoriul României a celor 30 de ferme luate în studiu (A) și mărimea efectivelor de animale (B)

Fig. 12.1 Distribution in the Romania territory of the 30 farms studied (A) and the livestock numbers of the farms (B)

Chestionarul utilizat a constat în 25 de întrebări cu alegeri unice sau multiple, pentru a facilita interviul prin reducerea timpului necesar completării și îmbunătățirea omogenității răspunsurilor. Chestionarul a inclus mai multe subiecte din studiile de specialitate ale Sistemului Național de Monitorizare a Sănătății Animalelor din Statele Unite ale Americii. De asemenea, am pregătit și adaptat întrebările după consultarea cu specialiști regionali în domeniul distribuției de medicamente în România, care oferă consultanță în fermele pe care le vizitează. Chestionarul a fost testat anterior pentru a verifica fezabilitatea și a arătat că interviul poate fi completat în aproximativ 10-15

minute. Am încercat să includem cât mai multe detalii posibile, în cât mai puține întrebări și cu răspunsuri exacte, scurte și omogene, tocmai pentru că am observat că cei chestionați nu au răbdarea de a participa la un chestionar care implică elaborarea de răspunsuri complexe și care au un timp de răspuns foarte lung. Chestionarele completate au fost examinate individual pentru a identifica răspunsurile aberante, atunci când o întrebare a fost probabil neînțeleasă. Cu toate acestea, nu am întâlnit astfel de situații.

Variațiile concentrațiilor de proteine serice în funcție de metoda, calitatea și cantitatea de colostru administrată vițelor au fost puse în evidență prin refractometrie, direct în ferma unde am format loturile comparative. Numeroase studii au dovedit că prin folosirea instrumentelor calitative de măsurare putem obține valori ale IgG foarte apropiate de valorile obținute prin testele de laborator, cum ar fi imunodifuzia radială (Bielmann et al., 2009; Deelen et al. 2014).



Fig. 12.2 Refractometru Atago, scară de citire (original)

Fig. 12.2 Atago refractometer, reading scale (original)

În vederea realizării studiului, în perioada martie – iunie 2020, au fost recoltate probe de colostru de la vaci și de ser de la vițeii din rasa Holstein. Probele de colostru au fost recoltate imediat după primul muls, iar probele de ser au fost recoltate la un interval de 20-24 de ore de la administrarea colostrului.

Probele de ser au fost examinate cu refractometrul Atago (fig.12.2, 12.3). Aparatul are 3 scale de măsurare: proteine serice totale (0-12 g/100ml), gravitatea specifică a urinei (1.000-1.060 SG) și indexul de refracție al urinei (1.3330 to 1.3660). Numeroase studii de specialitate au arătat că o valoare a proteinelor serice totale de la 5,2 până la 5,5 g/dl indică faptul că vițeii au obținut „transferul pasiv de succes” al imunității, adică o concentrație serică de IgG ≥ 10 g/l (Godden, 2008).

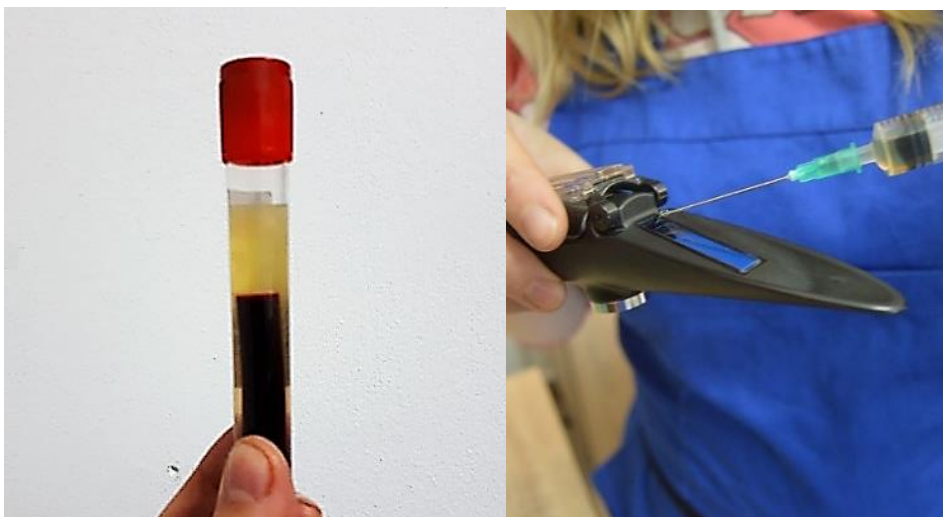


Fig. 12.3 Exprimarea serului în proba de sânge și examinarea acestuia cu refractometrul (original)
 Fig. 12.3 Expression of serum in the blood sample and examination with a refractometer (original)

Probele de colostru au fost examinate cu refractometrul ColoQuick (fig. 12.4, 12.5). Acest refractometru folosește o scală de măsurare Brix. Studiile au demonstrat că o valoare BRIX de 22 g/dl se corelează cu o valoare de cel puțin 50 g/l de IgG (Bielmann et al., 2010). S-a folosit pentru studiu doar colostru de la prima mulsoare, atât pentru prima cât și pentru a 2-a doză administrată.



Fig. 12.4 Probă de colostru gata pentru examinare (original)
 Fig. 12.4 Colostrum sample ready for examination (original)



Fig. 12.5 Refractometru ColoQuick, scară de citire, schema pentru interpretarea rezultatelor (original)

Fig. 12.5 ColoQuick refractometer, reading scale, diagram for interpretation of results (original)

Mediile aritmetice, erorile și deviațiile standard pentru fiecare variabilă din eșantion au fost calculate folosind proceduri statistice descriptive din programul IBM SPSS și Microsoft Office.

12.2. Rezultate și discuții

12.2.1. Managementul colostrului și evaluarea transferului imun pasiv în ferme

Metode de administrare a colostrului

Metoda de administrare a colostrului poate influența timpul primei administrări, volumul consumat și, eventual, expunerea la agenții patogeni, care pot afecta transferul pasiv de IgG și sănătatea vițelilor.



Fig. 12.6 Vaca și vițelul imediat după fătare (original)
Fig 12.6 Dam and calf immediately after calving (original)

Separarea vițelilor de mamele lor imediat după fătare este o modalitate de a reduce posibilitatea de transmitere a anumitor boli de la vacă la vițel. Însă permiterea unui vițel să sugă colostrul direct de la mama sa la prima alăptare ridică o problemă mai importantă, și anume, creșterea riscului ca vițelul să nu primească o cantitate adecvată de colostru. Prin urmare, nu se poate estima cantitatea de anticorpi ingerată.

Deoarece ratele cele mai ridicate de eșec ale transferului pasiv au fost raportate în cazul vițelilor lăsați să sugă de la mamele lor (Edwards și Broom, 1979; Brignole și Stott, 1980; Besser și colab., 1988, Godden, 2008), în prezent se recomandă separarea vițelului de vacă în decurs de 1 până la maxim 2 ore de la naștere și hrănirea acestuia cu un volum cunoscut de colostru folosind fie un biberon fie o sondă esofagiană (McGuirk și Collins, 2004).

În studiul realizat în cele 30 de ferme de vaci de lapte din România, separarea vițelilor de mamele lor înainte de prima alăptare este practică în 83,3% din cazuri, restul de 16,7% preferând să lase vițelii să sugă primul colostru direct de la mamele lor.



Fig. 12.7 Tub esofagian și rezervă ColoQuick de 4 litri pentru administrarea colostrului (original)

Fig 12.7 Esophageal tube and 4-liter ColoQuick reserve for colostrum administration (original)

Administrarea artificială a colostrului crește probabilitatea ca vițelii să primească cantitatea necesară de imunoglobuline colostrale în primele 24 de ore de viață pentru a dobândi o imunitate adecvată. Administrarea colostrului cu tubul esofagian (fig. 12.7) este o metodă de hrănire mai eficientă în timp, totuși, la noi în țară, este a doua metodă cea mai utilizată în fermele de vaci de lapte (43,3%).

Hrănirea cu biberonul este o metodă de hrănire mai asemănătoare cu cea naturală și este metoda cea mai des folosită în fermele luate în studiu (53,3%, fig. 12.8). Godden ș.a. (2009) au constatat că administrarea colostrului cu biberonul a crescut concentrațiile serice de IgG atunci când vițelii au fost hrăniți cu 1,5 l de colostru, comparativ cu un tub esofagian, dar nu s-a observat nicio diferență între tratamente atunci când s-au administrat

3 litri de colostru. Un procent redus de vițeii primesc colostru administrat la discreție, la găleată (3,3%).



Fig. 12.8 Administrarea laptelui cu biberonul (original)
Fig 12.8 Milk administration with a nipple bottle (original)

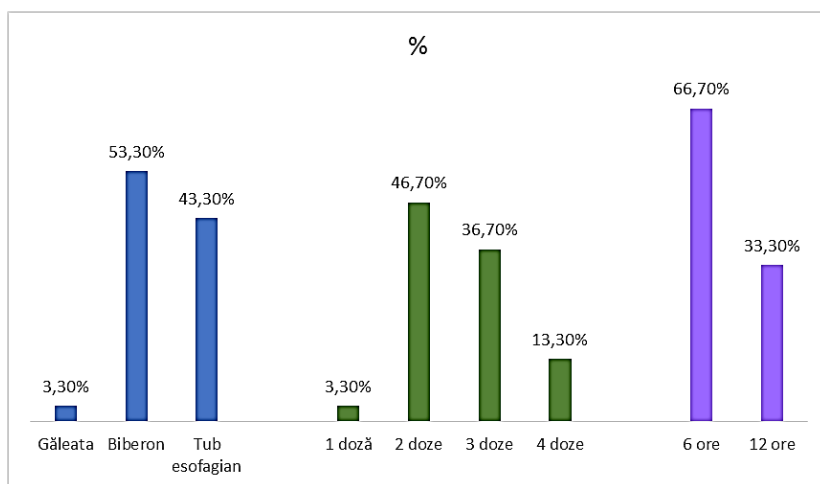


Fig. 12.9 Administrarea colostrului – metode, doze și intervale de administrare
Fig 12.9 Hand-feed colostrum – methods, doses and time interval of administration

În 46,7% din fermele luate în studiu, vițeii primesc 2 doze de colostru în primele 24 de ore de viață. Dozele de colostru diferă de la o administrare la alta. În 33,3% din situații, prima doză este de aproximativ 2 litri, același procent este de 3 litri, iar în 30% din situații, prima doză este de 4 litri (fig. 12.9).

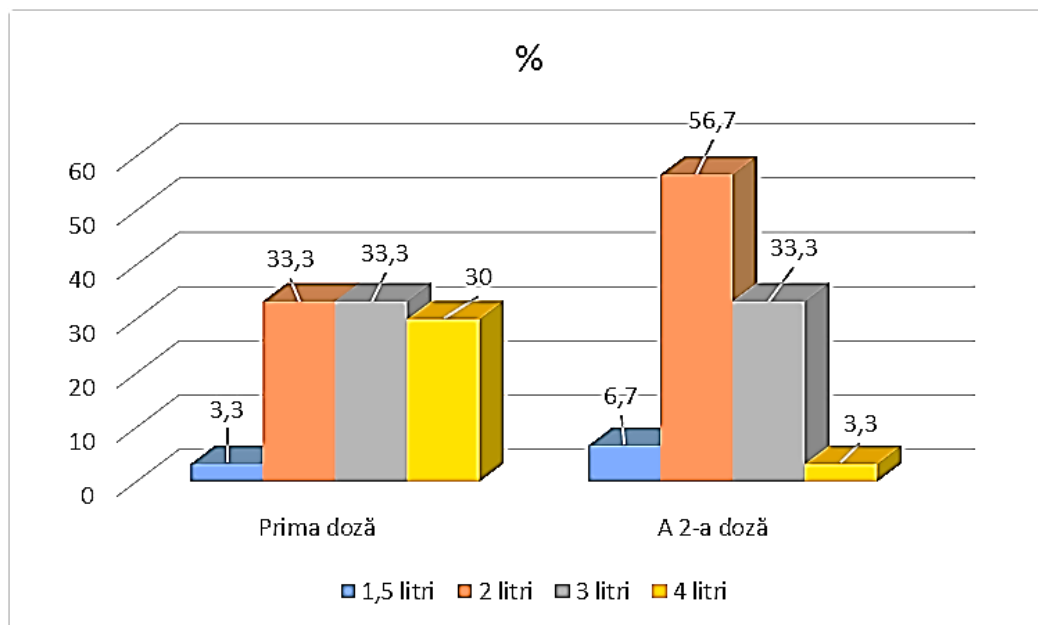


Fig. 12.10 Cantitățile de colostru administrate în primele 24 de ore de viață
Fig. 12.10 Quantities of colostrum administrated in the first 24 hours of life

A doua doză este administrată la 6 ore după fătare în 66,7% din cazuri și la 12 ore după fătare în 33,3% din cazuri (fig. 12.10). În 56,7% din situații, a doua doză de colostru este de 2 litri, iar în 33,3% din situații a doua doză este de 3 litri (fig. 12.10).

Calitatea colostrului

Utilizarea unui colostru de calitate inferioară poate duce la scăderea imunității la viței și, în cele din urmă, la creșterea riscurilor de infecții neonatale.

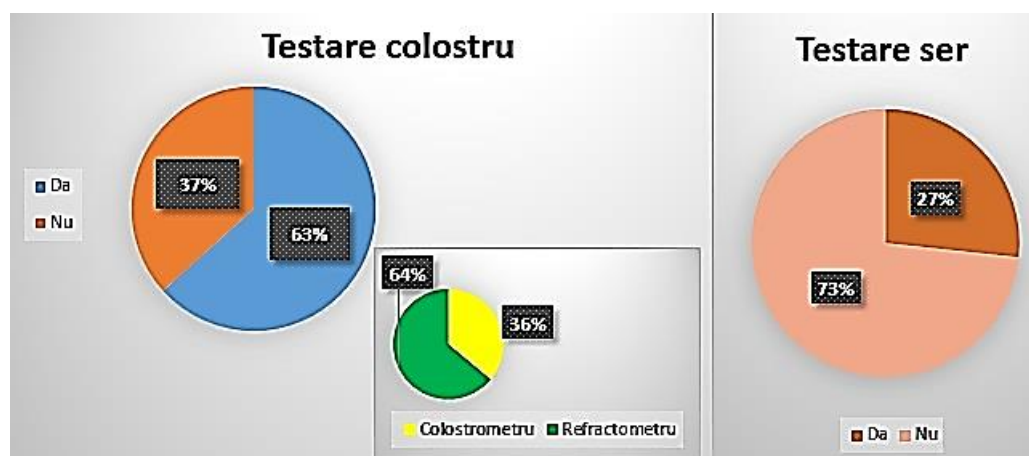


Fig. 12.11 Testarea colostrului și a serului sangvin
Fig. 12.11 Colostrum and blood serum samples testing

Un procent de 63,3% din fermele luate în studiu au măsurat nivelul de imunoglobulină din colostru sau a evaluat calitatea acestuia înainte de administrare. Cele mai frecvente metode utilizate pentru evaluarea calității colostrului au fost refractometrul și colostrometrul (64%, respectiv 36%, fig. 12.11). În general, în 63% din cazuri s-au evaluat nivelul de imunoglobuline colostrale. Totodată, probele de ser de la viței la 24-48 de ore de la fătare sunt testate pentru nivelul de proteine serice totale numai în 27% din cazuri (fig. 12.11).

Stocarea colostrului

Metoda de depozitare afectează calitatea colostrului, în special prin degradarea imunoglobulinelor colostrale și creșterea încărcăturii bacteriene din conținutul acestuia. Dacă colostrul trebuie păstrat mai puțin de 24 de ore, se recomandă refrigerarea, iar dacă acesta trebuie păstrat mai mult de 24 de ore, congelarea este cea mai bună metodă. Cele mai frecvente metode de stocare a colostrului din fermele luate în studiu au fost congelarea (80%) și refrigerarea (6,7%), iar un procent de 13,3% din cazuri nu stochează deloc colostrul (fig. 12.12).

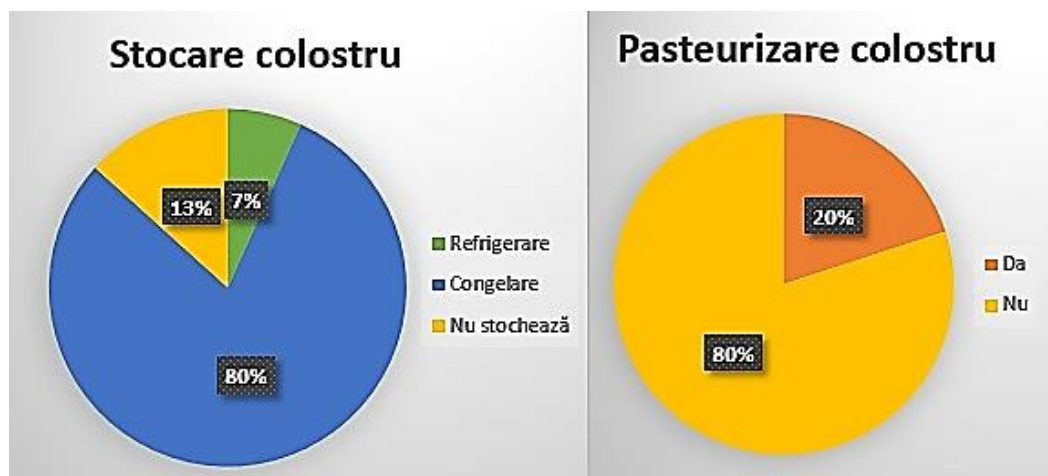


Fig. 12.12 Stocarea și pasteurizarea colostrului
Fig. 12.12 Colostrum storage and pasteurisation

Pasteurizarea colostrului

Pentru a reduce numărul de bacterii din lapte sau colostru pot fi utilizate două metode de pasteurizare: temperatură ridicată în timp scurt și pasteurizare în serie.

Deoarece pasteurizarea la temperatură ridicată în timp scurt reduce nivelurile de imunoglobulină cu 25-30% și crește vâscozitatea, în prezent nu este recomandată utilizarea în cazul colostrului. Alternativ, utilizarea pasteurizării prin încălzirea

colostrului la 60°C timp de 60 până la 120 de minute reduce agenții patogeni bacterieni și nu afectează concentrațiile de anticorpi sau nu modifică viscozitatea.



Fig 12.13 Kit ColoQuick de stocare și pasteurizare a colostrului (original)

Fig 12.13 ColoQuick colostrum storage and pasteurization kit (original)

Dintre cele 30 de ferme luate în studiu, doar 20% au pasteurizat colostrul înainte de a hrăni vițeii (fig 12.12). Investiția economică într-un kit special pentru pasteurizarea colostrului (fig. 12.13) este un preț pe care mulți fermieri nu sunt dispuși să-l plătească, prin urmare acesta este și motivul principal pentru care această metodă este folosită în procent atât de redus.

12.2.2. Importanța testării calității colostrului

Pentru a evalua gradul de reușită al transferului pasiv de imunoglobuline colostrale în funcție de metoda de administrare, am format 3 loturi experimentale de viței:

- ✚ Lotul A – 20 viței care au primit o doză de 3 litri de colostru la biberon;
- ✚ Lotul B – 20 viței care au primit o doză de 4 litri de colostru cu tubul esofagian;
- ✚ Lotul C – 20 viței care au primit 2 doze de colostru cu tubul esofagian astfel: prima de 4 litri în prima oră de viață și a doua doză de 2 litri la interval de 12 ore.

Biberoanele folosite la administrarea colostrului au avut o capacitate de 3 litri. Am hotărât ca această cantitate să fie doza maximă pentru administrarea colostrului la biberon, deoarece am observat că vițeii nu reușesc să sugă o cantitate mai mare de colostru la prima lor masă.

Am folosit atât pentru prima cât și pentru a 2-a doză doar colostrul de la prima mulsoare și doar acel colostru care a avut o cantitate de IgG de >70 g/l, respectiv o valoare Brix >24 . Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 12.1.

Tabel 12.1/Table 12.1

Valorile serice ale IgG în urma consumului de colostru în primele 24 de ore de viață
Serum IgG values after colostrum consumption in the first 24 hours of life

Loturi viței	Cantitatea de IgG	
	Colostru medie $\pm$ SD g/l	Serul vițelor medie $\pm$ SD g/dl
A	124,5 $\pm$ 17,6	5,5 $\pm$ 1,1
B	123,9 $\pm$ 33,7	5,7 $\pm$ 1,2
C	124,9 $\pm$ 20,7	7,4 $\pm$ 1,6

În tabelul 12.1, putem observa că în toate cele 3 loturi experimentale, media valorilor serice de IgG obținute după consumul de colostru indică cantități mai mari de 10 mg/ml IgG în sânge. Am folosit pentru alăptare doar colostrul testat care a avut o cantitate de IgG >70 g/l, iar rezultatele obținute indică faptul că absorbția intestinală a imunoglobulinelor colostrale este influențată de calitatea colostrului. Prin urmare, putem considera că administrarea unui colostru de bună calitate crește considerabil șansele de reușită a unui transfer imun pasiv (Godden, 2008; Godden, 2009).

Vițeii care au primit o doză de 4 litri de colostru cu tubul esofagian nu au înregistrat modificări semnificative ale cantităților de IgG serice comparativ cu cei care au primit o doză de 3 litri de colostru la biberon. Kaske ș.a. (2005) au constatat că absorbția IgG a fost întârziată cu 3 ore în cazul administrării a 4 litri de colostru cu un tub esofagian în comparație cu 2 litri de colostru cu biberonul. Sharifi și colab., 2009, susțin că diferențele între cantitatea și momentul absorbției IgG s-ar putea datora faptului că, atunci când este administrat cu tubul esofagian, colostrul intră inițial în rumen, nu trece direct prin canalul esofagian ca atunci când are loc suțiuinea, iar acest lucru ar determina o creștere a duratei de timp în care colostrul ajunge în intestin pentru absorbția IgG. Cu toate acestea, această limitare nu este semnificativă, deoarece trecerea colostrului din rumen până în abomasum și intestinul subțire are loc în aproximativ 3 ore, după Godden (2008).

Doza a făcut însă diferență între loturi. Vițeii din lotul C, care au primit un total de 6 litri de colostru în primele 12 ore de viață au înregistrat valori mai ridicate de IgG serică față de cei din loturile A și B, care au primit doar o doză de 4 litri de colostru (tabel 12.1). Într-un studiu realizat pe 68 de vițeie din rasa Brown Swiss, Faber ș.a. (2005) au constatat că cele care au primit o doză de 4 litri de colostru au avut o rată de creștere mai bună, cu 1,027 litri mai mult lapte în primele două lactații, mortalitate mai mică până la înțărcare și costuri pentru intervențiile veterinare reduse la jumătate, comparativ cu vițeiele care au primit doar 2 litri de colostru.

Testarea calitativă a colostrului are o influență pozitivă asupra gradului de reușită a transferului pasiv, iar un transfer imun reușit determină o rată a morbidității redusă la vițeii sugari (Godden, 2008).

Pentru a evalua importanța transferului pasiv de imunoglobuline colostrale, am format 2 loturi experimentale de vițeie care au primit colostru de la prima mulsoare cu tubul esofagian:

- Lotul A – 20 vițeie care au primit o doză de 4 litri de colostru netestat;
- Lotul B – 20 vițeie care au primit o doză de 4 litri de colostru testat în prealabil cu un colostrometru Brix. Vițeii au primit doar colostrul care a avut o cantitate de IgG >70 g/l.

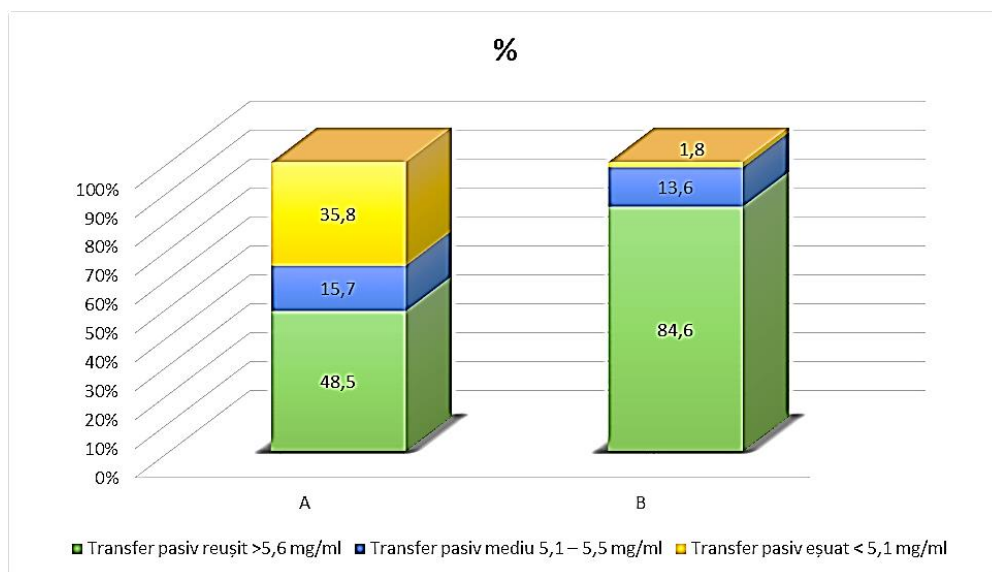


Fig. 12.14 Reușita transferului pasiv în cele 3 loturi de vițeie
Fig. 12.14 Success of the passive transfer in the 3 groups of calves

În figura 12.14 se poate observa că în grupul B, reușita transferului pasiv a fost semnificativ mai mare decât în grupul A ($p < 0,001$). Eșecul transferului pasiv s-a înregistrat în procent mai mare în lotul A (35,8%), comparativ cu grupul B (1,8%). Aceste

rezultate evidențiază importanța testării calității colostrului și rolul asupra stării de sănătate a vițelor nou-născuți. Se știe că, în majoritatea cazurilor, vițeei cu un transfer imun pasiv nereușit sunt mult mai susceptibili în dezvoltarea bolilor neonatale. Prin urmare, vițeei din cele două loturi experimentale au fost urmăriți zilnic, până la vârsta de 2 săptămâni, pentru a observa eventualele modificări de sănătate. Rezultatele obținute sunt redată în tabelul 12.2 și reprezentate grafic în figura 12.15.

Tabel 12.2/Table 12.2

Rata morbidității, letalității și mortalității în loturile experimentale
Morbidity, lethality and mortality rate in the experimental groups

Lotul	Viței sănătoși nr.	Viței bolnavi nr.	Viței morți nr.	Mb %	L %	Mt %
A 20 de viței	13	7	3	35	42,86	15
B 20 de viței	17	3	1	15	33,33	5

Se poate observa că ratele morbidității, letalității, respectiv mortalității au înregistrat cele mai mari valori în lotul experimental A (tabel 12.2, fig. 12.15). Lotul A a înregistrat o rată a morbidității de 35%, cu o mortalitate de 15%, iar lotul B o rată a morbidității de 15%, cu o mortalitate de 5%. Aceste diferențe semnificativ statistice ($p < 0.01$) subliniază încă o dată importanța testării colostrului în dobândirea unui transfer pasiv de succes care poate asigura un status imun competent și pregătit să lupte cu infecțiile care apar în perioada neonatală. De asemenea, rata letalității a fost semnificativ mai mare în lotul A - 42,86%, comparativ cu lotul B - 33,33% ($p < 0.05$).

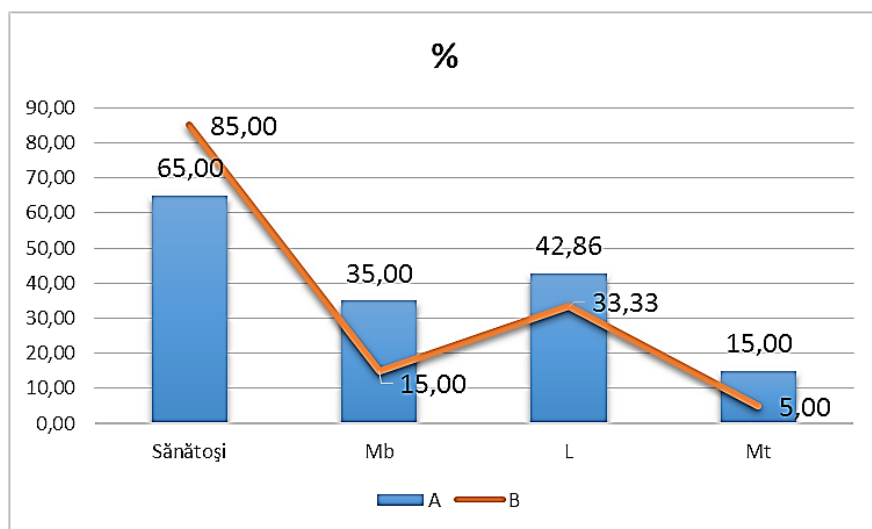


Fig. 12.15 Rata morbidității, letalității și mortalității în loturile experimentale
Fig. 12.15 Morbidity and lethality rate depending on the success of the passive transfer

Rezultatele obținute indică importanța monitorizării cantității de IgG în fermă pentru a asigura vițelor un colostru cât mai calitativ și a crește șansele de reușită a transferului pasiv de imunoglobuline.

12.3. Concluzii parțiale

Studiul privind managementul colostrului și evaluarea transferului pasiv imun în fermele de vaci de lapte a concluzionat următoarele aspecte:

1. Administrarea artificială a colostrului crește probabilitatea ca vițee să primească cantitatea necesară de imunoglobuline colostrale în primele 24 de ore de viață pentru a dobândi o imunitate adecvată, prin urmare metoda de hrănire cu biberonul este cea mai des folosită în fermele luate în studiu (53,3% din cazuri), fiind urmată ca frecvență de administrarea cu tubul esofagian, care este folosită în 43,3% din cazuri.
2. Cele mai frecvente metode de stocare a colostrului din fermele luate în studiu au fost congelarea (80%) și refrigerarea (6,7%), iar un procent de 13,3% din cazuri nu stochează deloc colostrul. De asemenea, dintre cele 30 de ferme luate în studiu, doar 20% au pasteurizat colostrul înainte de a hrăni vițee.
3. Administrarea unei cantități adecvate de colostru de bună calitate în primele 24 de ore de viață crește considerabil șansele de reușită a unui transfer imun pasiv, prin urmare un procent de 63,3% din fermele luate în studiu oferă atenție deosebită acestui aspect și evaluează calitatea colostrului înainte de administrare.
4. Ratele morbidității, respectiv mortalității au înregistrat valori mai mari în cazul vițelor care au primit colostru netestat, fapt care subliniază încă o dată importanța testării colostrului în dobândirea unui transfer pasiv de succes care poate asigura un status imun competent și pregătit să lupte cu infecțiile care apar în perioada neonatală.
5. În ansamblu, calitatea colostrului este evaluată într-un procent destul de mare în fermele de vaci de lapte din România, ceea ce înseamnă că fermierii înțeleg importanța administrării unui colostru de calitate pentru a avea un status imun echilibrat în efectivele de vițe.

CAPITOLUL 13 – CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI

În urma cercetărilor realizate în cadrul prezentei teze de doctorat privind rolul statusului imun în patologia infecțioasă la vițeii nou-născuți, se desprind următoarele 30 concluzii finale și recomandări:

1. În efectivul de viței luat în studiu, morbiditatea la categoria de vârstă 0-3 luni a înregistrat o medie de 6,20%. Rata letalității a fost de 15,10%, cu o rată de mortalitate de 0,94% în efectivul de viței cu vârsta de 0-3 luni.
2. Afecțiunile digestive au fost cele mai frecvente, înregistrând o medie totală de 60,89%, fiind urmate de afecțiunile respiratorii cu o medie totală de 39,11%. Vițeii de peste 2 luni au fost cei mai afectați de infecțiile respiratorii – 46,20%, iar vițeii cu vârsta de 0-1 lună au prezentat predominant afecțiuni digestive – 55,28 %.
3. Diareea a apărut în principal la vițeii cu vârsta între 3-21 zile și prezenta un aspect apos, uneori spumos, de culoare alb - gălbuie sau galbenă, rar cu strii sangvinolente. Modificările clinice respiratorii la vițeii afectați au fost reprezentate în principal de stări febrile, epiforă, jetaj, tuse, frecvent tahipnee și puls accelerat.
4. Procentul de viței morți cu afecțiuni digestive a fost aproape dublu - 52,4% comparativ cu procentul de viței morți cu afecțiuni respiratorii - 27,9%.
5. Semnele clinice, morbiditatea, mortalitatea și letalitatea au fost evidențiate prin rezultatele examenelor de laborator care au confirmat prezența unor boli infecțioase care fac parte din patologia vițelilor 0 -3 luni.
6. Infecția cu *Clostridium perfringens* a fost identificată în 11,69% din cazuri, iar infecția cu *E.coli* factorul F5 a fost identificată doar în 5,19% din cazuri.
7. *Clostridium perfringens* a fost cel mai des identificat la vițeii în vârstă de până la 3 săptămâni în procent de 57,57%, iar *E. coli*, factorul enteropatogen F5, a fost identificat în proporție de 45% la categoria de vârstă sub o săptămână.
8. *Mycoplasma bovis* a fost cel mai frecvent agent patogen detectat la vițeii cu vârsta de 2-3 luni, în 10% din cazuri ca agent patogen unic, în 12,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida* și în 7,5% din cazuri în asociație cu *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* și *Coronavirusul bovin*.
9. Infecția cu *Pasteurella multocida* la vițeii cu vârsta de 2-3 luni a fost identificată în 10% din cazuri, iar *Coronavirusul bovin* a fost identificat doar în 5% din cazuri.
10. Proteinele serice totale și fracțiile proteice evaluate în raport au înregistrat schimbări semnificative, îndeosebi în ziua 0 (42,73 g/l), înainte de aportul de colostru, și la 24 de ore de la prima administrare a colostrului (ziua 1 - 84,43 g/l).
11. Concentrația medie a proteinelor serice totale a crescut semnificativ, aproape dublându-se, de 42,73 g/l în ziua 0 până la 84,43 g/l în ziua 1. După acest timp, valorile au scăzut treptat până la sfârșitul studiului.

12. Rezultatele obținute au arătat scăderi treptate ale valorilor concentrațiilor de proteine serice totale din a 2-a zi de viață și până la sfârșitul primei săptămâni, fiind influențate semnificativ de vârsta, creșterea și dezvoltarea vițelor.
13. În toate cele 6 fracțiuni proteice au fost găsite schimbări variabile evaluate pe întreaga perioadă de studiu. Ele reflectă răspunsul nou-născuților la aportul de colostru și la modificările mediului înconjurător în perioada neonatală.
14. Modificările semnificative ale concentrațiilor serice de lactoferină, în special în ziua 1 de viață (5,24 $\mu\text{g/ml}$), când acestea aproape s-au dublat comparativ cu ziua 0 (2,68 $\mu\text{g/ml}$), evidențiază răspunsul imun al vițelor obținut prin consumul de colostru.
15. Lactoferina înregistrează o scădere progresivă a concentrației serice din prima zi și până la sfârșitul primei săptămâni de viață, acest lucru fiind influențat de activitatea biologică a lactoferinei colostrale absorbite.
16. Totodată, rezultatele obținute au evidențiat ca lactoferina din sângele nou-născuților este dependentă de concentrația de lactoferină din colostrul ingerat.
17. Lactoferina colostrală poate oferi o protecție locală extinsă pe o perioadă mai îndelungată de timp vițelor care au primit colostru în amestec cu laptele integral.
18. Rezultatele obținute au arătat schimbări subtile, dar semnificative ale haptoglobinei serice la vițeii în urma consumului de colostru.
19. Cele mai mici valori obținute au fost înaintea consumului de colostru (2,03 $\mu\text{g/ml}$), iar cele mai mari la sfârșitul primei săptămâni de viață (7,43 $\mu\text{g/ml}$).
20. Concentrațiile mai mari de haptoglobină la vițeii pot fi rezultatul unor factori de stres, infecții sau a unor boli inflamatorii, precum diareea neonatală.
21. După imunizarea activă a vacilor gestante, titrurile de anticorpi specifici anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin și anti-E.coli F5 (K99) au crescut semnificativ în lotul experimental față de lotul martor, atât în serul vacilor gestante, cât și în colostru și în serul vițelor nou-născuți.
22. În probele de ser recoltate înaintea administrării colostrului nu s-a decelat prezența anticorpilor anti-rotavirus bovin, anti-coronavirus bovin sau anti-E.coli F5 (K99) ceea ce evidențiază faptul că vițeii sunt în totalitate dependenți de transferul pasiv al Ig maternale prin intermediul colostrului.
23. Morbiditatea diareei clinice a fost mai mare în lotul de vițeii născuți din mame nevaccinate (20%) comparativ cu lotul de vițeii născuți din mame vaccinate (13,6%), iar durata tratamentului aplicat a avut variații mai mari în primul caz (3-7 zile).
24. Vârsta apariției semnelor clinice de diaree mai mare în lotul experimental (14 zile) comparativ cu lotul martor (8 zile) indică o protecție mai îndelungată a vițelor care au primit colostru cu un nivel mai ridicat de anticorpi specifici.
25. Rezultatele obținute în urma acestui studiu dovedesc eficiența administrării unui vaccin specific în prevenirea și protecția diareei neonatale infecțioase în efectivele de bovine, în urma consumului de colostru.

26. Administrarea artificială a colostrului crește probabilitatea ca vițeei să primească cantitatea necesară de imunoglobuline colostrale în primele 24 de ore de viață pentru a dobândi o imunitate adecvată, prin urmare metoda de hrănire cu biberonul este cea mai des folosită în fermele luate în studiu (53,3% din cazuri), fiind urmată ca frecvență de administrarea cu tubul esofagian, care este folosită în 43,3% din cazuri.
27. Cele mai frecvente metode de stocare a colostrului din fermele luate în studiu au fost congelarea (80%) și refrigerarea (6,7%), iar un procent de 13,3% din cazuri nu stochează deloc colostrul. De asemenea, dintre cele 30 de ferme luate în studiu, doar 20% au pasteurizat colostrul înainte de a hrăni vițeei.
28. Administrarea unei cantități adecvate de colostru de bună calitate în primele 24 de ore de viață crește considerabil șansele de reușită a unui transfer imun pasiv, prin urmare un procent de 63,3% din fermele luate în studiu oferă atenție deosebită acestui aspect și evaluează calitatea colostrului înainte de administrare.
29. Ratele morbidității, respectiv mortalității au înregistrat valori mai mari în cazul vițeeilor care au primit colostru netestat, fapt care subliniază încă o dată importanța testării colostrului în dobândirea unui transfer pasiv de succes care poate asigura un status imun competent și pregătit să lupte cu infecțiile care apar în perioada neonatală.
30. În ansamblu, calitatea colostrului este evaluată într-un procent destul de mare în fermele de vaci de lapte din România, ceea ce înseamnă că fermierii înțeleg importanța administrării unui colostru de calitate pentru a avea un status imun echilibrat în efectivele de vițee.

CHAPTER 13 - FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

Following the research conducted in this doctoral thesis on the role of immune status in infectious pathology in newborn calves, the following 30 final conclusions and recommendations can be drawn:

1. In the calf population studied, the morbidity in the age group 0-3 months recorded an average of 6.20%. The lethality rate was 15.10%, with a mortality rate of 0.94% in the herd of calves aged 0-3 months.
2. Digestive disorders were the most common, recording a total average of 60.89%, followed by respiratory diseases with a total average of 39.11%. Calves over 2 months were most affected by respiratory infections - 46.20%, and calves aged 0-1 months had predominantly digestive disorders - 55.28%.
3. Diarrhea occurred mainly in calves aged 3-21 days and had an aqueous appearance, sometimes frothy, white - yellowish or yellow, rarely with bloody streaks. Clinical respiratory changes in affected calves were mainly fever, epiphora, jet, cough, frequent tachypnea and accelerated pulse.
4. The percentage of dead calves with digestive disorders was almost double - 52.4% compared to the percentage of dead calves with respiratory diseases - 27.9%.
5. Clinical signs, morbidity, mortality and lethality were highlighted by the results of laboratory tests that confirmed the presence of infectious diseases that are part of the pathology of calves 0-3 months.
6. *Clostridium perfringens* infection was identified in 11.69% of cases, and *E. coli* factor F5 infection was identified in only 5.19% of cases.
7. *Clostridium perfringens* was most commonly identified in calves up to 3 weeks of age at 57.57%, and *E. coli*, enteropathogenic factor F5, was identified in 45% of the age group under one age. week.
8. *Mycoplasma bovis* was the most common pathogen detected in 2-3 month old calves, in 10% of cases as a single pathogen, in 12.5% of cases in association with *Pasteurella multocida* and in 7.5% from cases in association with *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* and bovine coronavirus.
9. *Pasteurella multocida* infection in 2-3 month old calves was identified in 10% of cases, and bovine coronavirus was identified in only 5% of cases.
10. The total serum proteins and protein fractions evaluated in the report showed significant changes, especially on day 0 (42.73 g/l), before colostrum intake, and 24 hours after the first administration of colostrum (day 1 - 84.43 g/l).
11. The average concentration of total serum proteins increased significantly, almost doubling, from 42.73 g/l on day 0 to 84.43 g/l on day 1. After this time, the values gradually decreased until the end study.

12. The results obtained showed a gradual decrease in the values of total serum protein concentrations from the second day of life until the end of the first week, being significantly influenced by age, growth and development of calves. Variable changes evaluated over the entire study period were found in all 6 protein fractions. They reflect the response of newborns to the intake of colostrum and changes in the environment in the neonatal period.
13. Variable changes evaluated over the entire study period were found in all 6 protein fractions. They reflect the response of newborns to the intake of colostrum and changes in the environment in the neonatal period.
14. Significant changes in serum lactoferrin concentrations, especially on day 1 of life (5.24 µg/ml), when they almost doubled compared to day 0 (2.68 µg/ml), show the immune response of calves obtained by consuming colostrum.
15. Lactoferrin shows a progressive decrease in serum concentration from the first day to the end of the first week of life, this being influenced by the biological activity of colostrum absorbed.
16. At the same time, the results obtained showed that lactoferrin in the blood of newborns is dependent on the concentration of lactoferrin in ingested colostrum.
17. Colostrum lactoferrin can provide extended local protection over a longer period of time to calves that have received colostrum mixed with whole milk.
18. The results obtained showed subtle but significant changes in serum haptoglobin in calves following colostrum consumption.
19. The lowest values obtained were before the consumption of colostrum (2.03 µg/ml), and the highest at the end of the first week of life (7.43 µg/ml).
20. Higher concentrations of haptoglobin in calves may be the result of stressors, infections or inflammatory diseases, such as neonatal diarrhea.
21. After active immunization of pregnant cows, the specific antibody titers anti-bovine rotavirus, anti-bovine coronavirus and anti-E.coli F5 (K99) increased significantly in the experimental group compared to the control group, both in the serum of pregnant cows and in colostrum and in the serum of newborn calves.
22. The presence of bovine anti-rotavirus, anti-bovine coronavirus or anti-E.coli F5 antibodies (K99) was not detected in the serum samples collected before colostrum, which shows that the calves are totally dependent on the passive transfer of maternal Ig. through colostrum.
23. The morbidity of clinical diarrhea was higher in the group of calves born to unvaccinated mothers (20%) compared to the group of calves born to vaccinated mothers (13.6%), and the duration of treatment applied was greater in the first case (3-7 days).
24. The age of onset of higher clinical signs of diarrhea in the experimental group (14 days) compared to the control group (8 days) indicates a longer protection of calves that received colostrum with a higher level of specific antibodies.

25. The results of this study demonstrate the effectiveness of administering a specific vaccine in the prevention and protection of infectious neonatal diarrhea in cattle following colostrum consumption. The most common methods of storing colostrum in the farms studied were freezing (80%) and refrigeration (6.7%), and 13.3% of cases do not store colostrum at all. Also, of the 30 farms studied, only 20% pasteurized colostrum before feeding the calves.
26. Artificial administration of colostrum increases the likelihood that calves will receive the required amount of colostrum immunoglobulins in the first 24 hours of life to acquire adequate immunity, therefore the bottle-feeding method is most often used on the farms studied (53.3% of cases), followed frequently by esophageal tube administration, which is used in 43.3% of cases.
27. The most common methods of storing colostrum on the farms under study were freezing (80%) and refrigeration (6.7%), and 13.3% of cases do not store colostrum at all. Also, of the 30 farms studied, only 20% pasteurized colostrum before feeding the calves.
28. The administration of an adequate amount of good quality colostrum in the first 24 hours of life considerably increases the chances of success of a passive immune transfer, therefore a percentage of 63.3% of the farms studied pays special attention to this aspect and evaluates colostrum quality before administration.
29. Morbidity and mortality rates were higher for calves that received untested colostrum, which once again underscores the importance of colostrum testing in achieving a successful passive transfer that can ensure a competent and prepared immune status to fight infections, which occur in the neonatal period.
30. Overall, the quality of colostrum is assessed at a fairly high percentage in dairy farms in Romania, which means that farmers understand the importance of administering quality colostrum in order to have a balanced immune status in calves.

BIBLIOGRAFIE

BIBLIOGRAPHY

1. Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M., 2008 - *Lactoferrin: a review*, Journal of Veterinary Medicine Czech, vol. 53, p. 457–468.
2. Alberghina D., Casella S., Vazzana I., Ferrantelli V., Giannetto C., Piccione G., 2010 - *Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (Capra hircus) using agarose gel electrophoresis*, Journal of Veterinary Clinical Pathology, vol. 39, p. 317–321.
3. Alberghina D., Giannetto C., Casella S., Vazzana I., Ferrantelli V., Piccione G., 2011 - *Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows*, Journal veterinary diagnostic investigation, vol. 23, p. 111–114.
4. Annen E.L., Collier R.J., McGuire M.A., Vicini J.L., Ballam J.M., Lormore M.J., 2004 - *Effect of modified dry period lengths and bovine somatotropin on yield and composition of milk from dairy cows*, Journal of Dairy Science, vol. 87, p. 3746–3761.
5. Aragona K.M., Chapman C.E., Pereira A.B.D., 2016 - *Prepartum supplementation of nicotinic acid: Effects on health of the dam, colostrum quality, and acquisition of immunity in the calf*, Journal of Dairy Science vol.99, p. 3529–38.
6. Bandrick M., Ariza-Nieto C., Baidoo S.K., 2014 - *Colostrum antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets*, Developmental & Comparative Immunology Journal, vol.43, p. 114–20.
7. Barrington G.M., 2001 - *Bovine neonatal immunology*, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, vol. 17, p. 463–476.
8. Bartels C.J., Holzhauer M., Jorritsma R., Swart W.A., Lam T.J., 2010 - *Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves*, Preventive Veterinary Medicine, vol. 93 (2), p. 162–169.
9. Barton M.H., Hurley D., Norton N., Heusner G., Costa L., Jones S., Byars D., Watanabe K., 2006 - *Serum lactoferrin and immunoglobulin G concentrations in healthy or ill neonatal foals and healthy adult horses*, Journal of Veterinary Internal Medicine, vol. 20, p. 1457–1462.
10. Baumrucker C.R., Dechow C.D., Macrina A.L., Gross J.J., Bruckmaier R.M., 2016 - *Mammary immunoglobulin transfer rates following prepartum milking*, Journal of Dairy Science, vol. 99, issue 11, p. 9254–9262.
11. Beam A.L., Lombard J.E., Koprak C.A., Garber L.P., Winter A.L., Hicks J.A., Schlatter J.L., 2009 - *Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations*, Journal of Dairy Science, vol. 92, p. 3973–3980.

12. Bejan Alexandru Lucian, 2009 – *Criptosporidioza vițelilor și iezilor – Cercetări privind diagnosticul, epidemiologia și etiopatogeneza bolii*, Teză de doctorat, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca.
13. Bendali F., Bichet H., Schelcher F., Sanaa M., 1999 - *Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France*, Veterinary Research, vol. 30, p. 61– 74.
14. Bernabucci U., Lacetera N., Danieli P.P., Bani P., 2009 - *Influence of different periods of exposure to hot environment on rumen function and diet digestibility in sheep*, International Journal of Biometeorology, vol. 53, p. 387–395.
15. Besser T.E., McGuire T., Gay C., Pritchett L., 1988 - *Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves*, Journal of Virology, vol. 62 (7) , p. 2234.
16. Biemann V., Gillan J., Perkins N.R., Skidmore A.L., Godden S., Leslie K.E., 2010 - *An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle*, Journal of Dairy Science, vol. 93, p. 3713-3721.
17. Blum J.W., 2006 - *Nutritional physiology of neonatal calves*, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition vol. 90 (1), p. 11.
18. Boileau J. Mélanie, Kapil S., 2010 - *Bovine coronavirus associated syndromes*, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, vol. 26 (1), p. 123–146.
19. Brignole T.J., Stott G.H., 1980 - *Effect of suckling followed by bottle feeding colostrums on immunoglobulin absorption and calf survival*, Journal of Dairy Science, vol. 63, p. 451– 456.
20. Butler J. E., 1969 - *Bovine Immunoglobulins: A Review*, Journal of Dairy Science, vol. 52, issue 12, p. 1895-1909.
21. Butler J.E., Zhao Y., Sinkora M., Wertz N., Kacskovics I., 2009 - *Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development*, Developmental & Comparative Immunology Journal, vol. 33, issue 3, p. 321-333.
22. Campler M., Munksgaard L., Jensen M.B., 2015 - *The effect of housing on calving behavior and calf vitality in Holstein and Jersey dairy cows*, Journal of Dairy Science, vol. 98, issue 3, p. 1797-1804.
23. Carp-Cărare M., 2001 – *Microbiologie veterinară – Virusologie*, Editura Venus, Iași.
24. Carp-Cărare M., 2002 – *Imunologie si imunopatologie*, Casa de Editura Venus, Iași.
25. Castro-Alonso A., Castro N., Capote J., Morales-de la Nuez A., Moreno-Indias I., Sánchez-Macias D., Herraiz P., Argüello A., 2008 - *Short communication: apoptosis regulates passive immune transfer in newborn kids*, Journal of Dairy Science, vol. 91, p. 2086–2088.
26. Cartwright S.L., Schaeffer L. R., Burnside E. B., Mallard B. A., 2015 - *Adaptive immune response, survival, and somatic cell score between postpartum Holstein and*

- Norwegian Red*×*Holstein* first-calf heifers, *Journal of Animal Science*, vol. 90, issue 9, p. 2970–2978.
27. Cătană N., 2002 - *Boli infecțioase – viroze (vol. I)*, Editura Waldpress, Timișoara.
28. Cătană N., 2007 - *Curs de Boli Infecțioase, Viroze și boli prionice*, Editura Mirton, Timișoara.
29. Chase C.C., Hurley D.J., Reber A.J., 2008 - *Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response*, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 24 (1), p. 87–104.
30. Chen T., Xie M.Y., Sun J.J., 2016 - *Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells*, *Scientific Reports*, vol. 6, p. 33862.
31. Cheng J.B., Wang J.Q., Bu D.P., Liu G.L., Zhang C.G., Wei H.Y., Zhou L.Y., Wang J.Z., 2008 - *Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk*, *Journal of Dairy Science*, vol. 91, p. 970–976.
32. Chigerwe M., Tyler J.W., Summers M.K., Middleton J.R., Schultz L.G., Nagy D.W., 2009 - *Evaluation of factors affecting serum IgG concentrations in bottle-fed calves*, *Journal of American Veterinary Medical Association*, vol. 234, p. 785–789.
33. Cho Yong-il, Yoon Kyoung-Jin, 2014 - *An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention*, *Journal of Veterinary Science*, vol. 15 (1), p. 1–17.
34. Confer A.W., Fulton R.W., Clinkensbeard K.D., 1998 - *Duration of serum antibody responses following vaccination and revaccination of cattle with non-living commercial Pasteurella haemolytica vaccines*, *The Canadian Journal of Veterinary Research Vaccine*, vol. 16, p. 1962–1970.
35. Conneely O. M., 2001 - *Anti-inflammatory activities of lactoferrin*, *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 20 (E-Suppl. 5), p. 389–395.
36. Conneely M., Berry D. P., Sayers R., Murphy J. P., Lorenz I., Doherty M. L., Kennedy E., 2013 - *Factors associated with the concentration of immunoglobulin G in the colostrum of dairy cows*, *PubMed Animal Journal*, vol. 7 (11), p. 1824-32.
37. Coroian Aurelia, Vioara Mireșan, Camelia Răducu, Daniel Cocan, Stelian Dărăban, Cristian O. Coroian - *Changes of buffalo milk physico-chemical parameters in a population from Cluj County*, *Animal Biology & Animal Husbandry Bioflux*, 2013, vol. 5, issue 2.
38. Cortese V.S., 2009 - *Neonatal immunology*, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 25, p. 221-227
39. Cray C., Zaias J., Altman N.H., 2009 - *Acute phase response in animals: a review*, *Comparative Medicine*, vol.59, p. 517–26.
40. Cummins C., D. P. Berry, J. P. Murphy, I. Lorenz and E. Kennedy, 2016 - *The effect of colostrum storage conditions on dairy heifer calf serum immunoglobulin G*

- concentration and preweaning health and growth rate*, Journal of Dairy Science, vol. 100, p. 525–535.
41. Davidson I.N., Yancey S.P., Campbell S.G., 1981 - *Relationship between serum immunoglobulin values and incidence of respiratory disease in calves*, Journal of American Veterinary Medical Association vol. 179, p. 708, 1981.
 42. Davis T.A., Burrin D.G., Fiorotto M.L., Reeds P.J., Jahoor F., 1998 - *Roles of insulin and amino acids in the regulation of protein synthesis in the neonate*, The Journal of Nutrition, vol. 128, p. 347–350.
 43. Dawes, M.E., Latrkie J., Tyler J.W., Cockrell M., Marsh A.E., Estes D.M., Larson R.L., Steevens B., 2004 - *Effects of supplemental lactoferrin on serum lactoferrin and IgG concentrations and neutrophil oxidative metabolism in Holstein calves*, Journal of Veterinary Internal Medicine, vol. 18, p. 104–108.
 44. Deelen S.M., Ollivett T.L., Haines D.M., Leslie K.E., 2014 - *Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves*, Journal of Dairy Science, vol. 97, issue 6, p. 3838–3844.
 45. Dewell R.D., Hungerford L.L., Keen J.E., Laegreid W.W., Griffin D.D., Rupp G.P., Grotelueschen D.M., 2006 - *Association of neonatal serum immunoglobulin G1 concentration with health and performance in beef calves*, Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 228, p. 914–921.
 46. Dobryszczycka W., 1997 - *Biological functions of haptoglobin, new pieces to an old puzzle*, European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, vol. 35, p. 647–654.
 47. Donovan G.A., Dohoo I.R., Montgomery D.M., Bennett F.L., 1998 - *Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA*, Preventive Veterinary Medicine, vol. 34, p. 31–46.
 48. Donovan D., Reber A., Gabbard J., 2007 - *Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular response to pathogen antigens in neonatal calves*, American Journal of Veterinary Research, vol. 68, p. 778–82.
 49. Dunn A., Ashfield A., Earley B., Gordon A., McGee M., Morrison S.J., 2016 - *Effect of concentrate supplementation during the dry period on colostrum quality and effect of colostrum feeding regimen on passive transfer of immunity, calf health, and performance*, Journal of Dairy Science, vol. 100, issue 1, p. 357–370.
 50. Durell L., Clancy Rose, Tracy Bainbridge, Julien Roubert, Klaus-Ulrich, Dressele Johanna Bennemann, Antje Rückner, Thomas Vahlenkamp, Renaud Maillard, 2017 - *Immune response of mature cows subjected to annual booster vaccination against neonatal calf diarrhoea with two different commercial vaccines: A non-inferiority study*, Livestock Science, vol. 204, p. 52–58.

51. Earley B., Fallon R.J., 1998 - *The relationship between immunoglobulin deficiency and disease in calves*, Irish Journal of Agricultural & Food Research, vol. 37, p. 118-119.
52. Edwards S. A., Broom D. M., 1979 - *The period between birth and first suckling in dairy calves*, Research in Veterinary Science, vol. 26, p. 255–256.
53. Elfstrand L., Lindmark-Mansson H., Paulsson M., 2002 - *Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing*, International Dairy Journal, vol. 12, p. 879–87.
54. Elizondo-Salazar J.A., Jones C.M., Heinrichs A.J., 2010 - *Evaluation of calf milk pasteurization systems on 6 Pennsylvania dairy farms*, Journal of Dairy Science, vol. 93, issue 11, p. 5509-5513.
55. Ellis J.A., Hassard L.E., Cortese V.S., 1996 - *Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves*, Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 208, p. 393–399.
56. Ellis J.A., Gow S., West K., Waldner C., Rhodes C., Mutwiri G., Rosenberg H., 2007 - *Response of calves to challenge exposure with virulent bovine respiratory syncytial virus following intranasal administration of vaccines formulated for parenteral administration*, Journal of American Veterinary Medical Association, vol. 230, p. 233-243.
57. Ellis J.A., 2017 - *How efficacious are vaccines against bovine respiratory syncytial virus in cattle?*, Veterinary Microbiology, vol. 206, p. 59–68.
58. Elsohaby I., McClure J. T., Waite L. A., Cameron M., Heider L. C., Keefe G. P., 2019 - *Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive immunity in dairy calves*, Journal of Dairy Science, vol. 102, p. 567–577.
59. Embleton N. D., Berrington J. E., McGuire W., Stewart C. J., Cummings S. P., 2013 - *Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential*, Seminars in Fetal & Neonatal Medicine, vol.18, p. 143–149.
60. Faber S.N., Faber N.E., McCauley T.C., 2005 - *Case study: Effects of colostrum ingestion on lactational performance*, Applied Animal Scientist, vol. 21, p. 420–425.
61. Fecteau G., Van Metre D.C., Paré J., Smith B.P., Higgins R., Holmberg C.A., Jang S., Guterbock W., 1997 - *Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves*, Canadian Veterinary Journal, vol. 38, p. 95– 100.
62. Fischer A.J., Malmuthuge N., Guan L.L, 2018 - *Short communication: The effect of heat treatment of bovine colostrum on the concentration of oligosaccharides in colostrum and in the intestine of neonatal male Holstein calves*, Journal of Dairy Science, vol.101, p. 401–407.

63. Fisher A.J., Song Y., He Z., 2018 - *Effect of delaying colostrum feeding on passivetransfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves*, Journal of Dairy Science, vol. 101, p. 3099–109.
64. Fox E.S., Thomas, P.E., Broitman, S.A., 1987 - *Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells*, Infection and Immunity, vol. 55, p. 2962–2966.
65. França R.T., Costa M.M., Martins D.B., Pagnoncelli M., Leal M.L., Mazzanti C.M., Palma H.E., Kunert C.P., Paim F.C., Anjos Lopes S.T., 2011 - *Protein profile of buffaloes of different ages*, Acta Scientific Veterinary Sciences, vol. 39, p. 995–999.
66. Fulton R. W., Cook B.J., Step D.L., Anthony W., et al., 2002 - *Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves*, The Canadian Journal of Veterinary Research, vol. 66, p. 173-180.
67. Fuhrmann T.J., Reggiardo C., Meerdink G.L., Bicknell E.J., 1989 - *Diagnostic features of chlamydia infection in dairy calves*, Journal veterinary diagnostic investigation, vol. 1 (4), 305-308.
68. Ganheim C., Alenius S., Waller K.P., 2007 - *Acute phase proteins as indicators of calf herd health*, The Veterinary Journal, vol. 173 (3), p. 645–51.
69. Gay-Bellile Cecile, Bengoufa D., Houze P., Le Carrer D., Benlakehal M., Bousquet B., Gourmel B., Le Bricon T., 2003 - *Automated Multicapillary Electrophoresis for Analysis of Human Serum Proteins*, Clinical Chemistry vol. 49, p. 11.
70. Godden Sandra M., Fetrow J.P., Feirtag J.M., Green L.R., Wells S.J., 2003 - *Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves*, Journal of the American Veterinary Medical Association, vol. 226, p. 1547– 1554.
71. Godden Sandra, McMartin S., Feirtag J., Stabel J., Bey R., Goyal S., Metzger L., Fetrow J., Wells S., Chester-Jones H., 2006 - *Heat treatment of bovine colostrum. II: Effects of heating duration on pathogen viability and Immunoglobulin G*, Journal of Dairy Science, vol. 89 (9), p. 3476- 3483.
72. Godden Sandra M., 2008 - *Colostrum management for dairy calves*, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, vol. 24 (1), p. 19-39.
73. Godden Sandra M., Haines D.M., Hagman D., 2009 - *Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. I: Dose effect of feeding a commercial colostrum replacer*, Journal of Dairy Science, vol. 92, p. 1750–1757.
74. Godden Sandra M., Lombard J.E., Woolums A.R., 2019 - *Colostrum Management for Dairy Calves*, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, vol. 35 (3), p. 535-556.

75. Gökçe E., Atakisi O., Kirmizigul A.H., Unver A., Erdoğan H.M., 2014 - *Passive immunity in lambs: Serum lactoferrin concentrations as a predictor of IgG concentration and its relation to health status from birth to 12 weeks of life*, Small Ruminant Research, vol. 116, p. 219-228.
76. Gruse J., Görs S., Tuchscherer A., Otten W., Weitzel J.M., Metges C.C., 2016 - *The Effects of Oral Quercetin Supplementation on Splanchnic Glucose Metabolism in 1-Week-Old Calves Depend on Diet after Birth*, The Journal of Nutrition, vol. 145 (11), p. 2486-95.
77. Gruse J., Kanitz E., Weitzel J.M., Tuchscherer A., Stefaniak T., Jawor P., 2016 - *Feeding in Newborn Dairy Calves Cannot Compensate Colostrum Deprivation: Study on Metabolic, Antioxidative and Inflammatory Traits*, PLoS ONE, vol. 11 (1), e0146932.
78. Grusenmeyer D.J., Ryan C.M., Galton D.M., 2006 - *Shortening the dry period from 60 to 40 days does not affect colostrum quality but decreases colostrum yield by Holstein cows*, Journal of Dairy Science, vol. 89(Suppl. 1), p. 336.
79. Gulliksen S.M., Lie K.I. Løken T., Osterås O., 2008 - *Calf mortality in Norwegian dairy herds*, Journal of Dairy Science, vol. 92 (6), p. 2782-95.
80. Hammon H.M., Blum J.W., 1998 - *Metabolic and endocrine traits of neonatal calves are influenced by feeding colostrum for different durations or only milk replacer*, The Journal of Nutrition, vol.128 (3), p. 624-32.
81. Hammon H.M., Schiessler G., Nussbaum A., Blum J.W., 2002 - *Feed intake patterns, growth performance and metabolic and endocrine traits in calves fed unlimited amounts of colostrum and milk by automate starting in the neonatal period*, Journal of Dairy Science, vol. 85, p. 3352-3362.
82. Hammon H.M., Steinhoff-Wagner J., Flor J., 2013 - *Lactation Biology Symposium: Role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves*, Journal of Animal Science, vol. 91:685-95.
83. Hancock J. T., Salisbury V., Ovejero-Boglione M. C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R., Harrison R., 2002 - *Antimicrobial properties of milk: Dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite*. Antimicrob, Agents Chemother, vol. 46, p. 3308-3310.
84. Harada E., Itoh Y., Sitizyo K., Takeuchi T., Araki Y., Kitagawa H., 1999 - *Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets*, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, vol. 124 (3), p. 321.
85. Hein W.R., 1994 - *Ontogeny of T cells*. In: Goddeeris BML, Morrison WI, editors. *Cell mediated immunity in ruminants*, Boca Raton (FL): CRC press, p. 19-36.
86. Hiss-Pesch S., Daniel F., Dunkelberg-Denk S., 2011 - *Transfer of maternal haptoglobin to suckling piglets*, Vet. Imm and Imm, vol. 144 (1-2), p. 104-10.

87. Hodgins D.C., Shewen P.E., 1996 - *Preparturient vaccination to enhance passive immunity to the capsular polysaccharide of Pasteurella haemolytica A1*, Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 50, p. 67–77.
88. Holloway N. M., Tyler J. W., Lakritz J., Carlson S. L., Tessman R. K., Holle J., 2002 - *Serum immunoglobulin G concentrations in calves fed fresh colostrum or a colostrum supplement*, Journal of Veterinary Internal Medicine, vol. 16, p. 187–191.
89. Horhoge Cristina, 2015 - *Imunologie și imunopatologie*, Ed. „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, ISBN 978-973-147-185-3.
90. Hulbert Lindsey E., Moisé Sonia J., 2016 - *Stress, immunity, and the management of calves*, Journal of Dairy Science, vol. 99, p. 3199-3216.
91. Hurley W., Sixiang Z., 2000 - *Absorption of colostrum lactoferrin in newborn calves*, Illini DairyNet Papers, vol. 11/15.
92. Husband A.J., 1980 - *Ontogeny of the gut-associated immune system*, In Butler JE (ed): The Ruminant Immune System, New York, Plenum Press, p. 633-647.
93. Ignătescu (Țîmpău) R.M., Goanță, A.M., Mihai, A. and Ioniță, L., 2018 - *A review of the adaptation of the newborn calf to its environment*, Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, vol. 61 (1), p. 52-57.
94. Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., 2014 - *Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey*, PLoS One, vol. 9 (2), e88843.
95. Jayappa H., Davis R., Dierks L., Sweeney D., Wasmoen T., 2008 - *Demonstration of passive protection in neonatal calves against colibacillosis following immunization of pregnant heifers at 3 months of gestation*, Veterinary Therapeutics, vol. 9, p. 283.
96. Ježek J., Klopčič M., Klinkon M., 2006 - *Influence of age on biochemical parameters in calves*, Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, vol. 50, p. 211–214.
97. Jones P.W., Collins P., Aitkin M.M., 1988 - *Passive protection of calves against experimental infection with Salmonella typhimurium*, Journal of Veterinary Record, vol. 123, p. 536–41.
98. Kalaeva Elena, Kalaev V., Efimova K., Anton Chernitskiy A., Safonov V., 2019 - *Protein metabolic changes and nucleolus organizer regions activity in the lymphocytes of neonatal calves during the development of respiratory diseases*, Veterinary World, vol. 12, EISSN: 2231-0916.
99. Kaneko J.J., 1997 - *Serum proteins and the dysproteinemias*, Clinical biochemistry of domestic animals 5th ed. London: Academic Press, p. 117.
100. Kaske M., Werner A., Schberth H. J., Rehage J., Kehler W., 2005 - *Colostrum management in calves: effects of drenching vs. bottle feeding*, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, vol. 89, p. 151–157.

101. Kehoe S.I., Jayarao B.M., Heinrichs A.J.: *A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on pennsylvania dairy farms*, Journal of Dairy Science, vol. 90, p. 4108–4116.
102. Knolle P.A., Gerken G., 2000 - *Local control of the immune response in the liver*, Immunological Reviews, vol. 174, p. 21–34.
103. Knowles T.G., Edwards J.E., Bazeley K.J., Brown S.N., Butterworth A., Warriss P.D., 2000 - *Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age*, Journal of Veterinary Record, vol. 147, p. 593–598.
104. Kohara J., Hirai T., Mori K., Ishizaki H., Tsunemitsu H., 1997 - *Enhancement of Passive Immunity With Maternal Vaccine Against Newborn Calf Diarrhea*, Journal of Veterinary Medical Science, vol. 59 (11), p. 1023-5.
105. Lacetera N., Bernabucci U., Ronchi B., 1966 - *Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring*, American Journal of Veterinary Research, vol. 57, p. 1776–80.
106. Lacy-Hulbert S. J., Woolford M. W., Nicholas G., Prosser C. G., Stelwagen K., 1999 - *Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows*, Journal of Dairy Science, vol. 82:, p.1232–1239.
107. Langel S.N., Wark W.A., Garst S.N., 2015 - *Effect of feeding whole compared with cell-free colostrum on calf immune status: The neonatal period*, Journal of Dairy Science, vol. 98, p. 3729–40.
108. Larson B.L., Heary H.L., Devery J.E., 1980 -*Immunoglobulin production and transport by the mammary gland*, Journal of Dairy Science, vol. 63, p. 665–671.
109. Lassen E.D., 2004. *Laboratory evaluation of plasma and serum proteins*, Veterinary hematology and clinical chemistry Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, p. 401–415.
110. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J., 2005 - *Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses*, Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 62, p. 2549–2559.
111. Leitner G., Krifucks O., Jacoby S., Lavi Y., Silanikove N., 2008 - *Concentrations of ganglioside type M1 and immunoglobulin Gin colostrum are inversely related to bacterial infection at early lactation in cows*, Journal of Dairy Science, vol. 91, p. 3337–3342.
112. Liermann W., Schäff C.T., Gruse J., Derno M., Weitzel J.M., Kanitz E., Otten W., Hoeflich A., Stefaniak T., Sauerwein H., Bruckmaier R.M., Gross J.J., Hammon H.M., 2020 - *Effects of colostrum instead of formula feeding for the first two days post natum on whole body energy metabolism and its endocrine control in neonatal calves*, Journal of Dairy Science, vol. 103, p. 3577-3598.

113. Ling T., Hernandez-Jover M., Sordillo L.M., Abuelo A., 2018 - *Maternal late-gestation metabolic stress is associated with changes in immune and metabolic responses of dairy calves*, Journal of Dairy Science, vol. 101(7), p. 6568.
114. Logan E.F., Pearson G.R., McNulty M.S., 1977 - *Studies on the immunity of the calf to colibacillosis--VII: the experimental reproduction of enteric colibacillosis in colostrum-fed calves*, Journal of Veterinary Record, vol. 101 (22), p. 443-6.
115. Lomborg S.R., Nielsen L.R., Heegaard P.M.H., Jacobsen S., 2008 - *Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress*, Veterinary Research Communications, vol. 32, p. 575–582.
116. Loste A., Ramos J.J., Fernández A., Ferrer L.M., Lacasta D., Verde M.T., Marca M.C., Ortín A., 2008 - *Effect of colostrum treated by heat on immunological parameters in newborn lambs*, Livestock Science, vol. 117, p. 176.
117. Mann S., Leal Yepes F.A., Overton T.R., 2016 - *Effect of dry period dietary energy level in dairy cattle on volume, concentration of immunoglobulin G, insulin, and fatty acid composition of colostrum*, Journal of Dairy Science, vol. 99, p. 1515–26.
118. Manzoni P., Stolfi I., Messner H., Cattani S., Laforgia N., Romeo M. G., Bollani L., Rinaldi M., Gallo E., Quercia M., Maule M., Mostert M., Decembrino L., Magaldi R., Mosca F., Vagnarelli F., Memo L., 2016 - *Clinical benefits of lactoferrin for infants and children*, J. Pediatr., vol. 173, S43–S52.
119. Martin S.W., Schwabe C.W., Franti C.E., 1975a - *Dairy calf mortality rate: characteristics of calf mortality rates in Tulare County, California*, American Journal of Veterinary Research, vol. 36, p. 1099– 1104.
120. Martin S.W., Schwabe C.W., Franti C.E., 1975b - *Dairy calf mortality rate: influence of management and housing factors on calf mortality rate in Tulare County, California*, American Journal of Veterinary Research, vol. 36, p. 1111– 1114.
121. Martin S.W., Schwabe C.W., Franti C.E., 1975c - *Dairy calf mortality rate: influence of meteorologic factors on calf mortality rate in Tulare County, California*. American Journal of Veterinary Research, vol. 36, p.1105– 1109.
122. Martin S.W., Bateman K.G., Shewen P.E., Rosendal S., Bohac J.E., 1989 - *The frequency, distribution and effects of antibodies, to 7 putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario*, Can J Vet Res, vol. 53, p. 355–362.
123. Martin M., Tesouro M.A., Gonz Am. N., Pi A., Lampreave F., 2005 - *Major plasma proteins in pig serum during postnatal development*, Reprod Ferti Dev, vol.17, p. 439.
124. Masson P. L., Heremans J. F., 1971 - *Lactoferrin in milk from different species*, Comparative Biochemistry and Physiology, vol.1, p.119-129.
125. Mayasari N., Vries Reilingh G., Nieuwland M.G.B., Rummelink G.J., Parmentier H.K., Kemp B., ATM van Kneegsel, 2015 - *Effect of maternal dry period length on*

- colostrum immunoglobulin content and on natural and specific antibody titers in calves*, Journal of Dairy Science, vol. 98(6), p. 3969-79.
126. Mayer B., Doleschall M., Bender B., Bartyik J., Bosze Z., Frenyo L.V., Kacskovics I., 2005 - *Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland*, J. Dairy Res, vol. 72(Special Issue), p.107–112.
 127. Mânzat Radu Moga, 2001 - *Bolile infecțioase ale animalelor- bacterioze*, Editura Brumar, Timișoara.
 128. Mânzat Radu Moga, 2005 - *Boli virotice și prionice ale animalelor*, Editura Brumar, Timișoara.
 129. McGuirk S. M., Collins M., 2004 - *Managing the production, storage and delivery of colostrum*, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., vol. 20, p.593–603.
 130. McMartin S., Godden S., Metzger L., Feirtag J., Bey R., Stabel J., Goyal S., Fetrow J., Wells S., Chester-Jones H., 2006 - *Heat treatment of bovine colostrum. I: Effects of temperature on viscosity and Immunoglobulin G level*, Journal of Dairy Science, vol. 89 (6), p. 2110-2118.
 131. McNulty M.S., Logan E.F., 1987 - *Effect of vaccination of the dam on rotavirus infection in young calves*, Journal of Veterinary Record, vol. 120, p. 250–252.
 132. Mcvicker J.K., Rouse G.C., Fowler M.A., Perry B.H., Miller B.L., Johnson T.E., 2002 - *Evaluation of a lateral-flow immunoassay for use in monitoring passive transfer of immunoglobulins in calves*, American Journal of Veterinary Research, vol. 63, p. 247–250.
 133. Mee J.F., 2008 - *Newborn dairy calf management*, Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice, vol. 24, p. 1– 17.
 134. Meganck Vanessa, Hoflack G., Piepers S., Opsomer G., 2014-2015 - *Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds*, Preventive Veterinary Medicine.
 135. Meganck Vanessa, Opsomer G., Piepers S., et al., 2016 - *Maternal colostral leukocytes appear to enhance cell-mediated recall response, but inhibit humoral recall response in prime-boost vaccinated calves*, J Reprod Immunol, vol.113, p. 68.
 136. Meyer D.J., Harvey J.W., editors, 2004 - *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis*, Ed. St. Louis: Saunders, p. 156–168.
 137. Miles M., 2004 - *Investigation of lopopolysaccharide-binding protein in the bovine mammary gland*, MS Thesis, The University of Waikato, Hamilton, New Zealand.
 138. Millemann Y., 2009 - *Diagnosis of neonatal calf diarrhoea*, 4ème “Dairy Solutions Symposium.
 139. Mohri M., Sharifi K, Eidi S., 2007 - *Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults*, Res Vet Sci, vol. 83, p. 30–39.

140. Moore M., Tyler J. W., Chigerwe M., Dawes M. E., Middleton J. R., 2005 - *Effect of delayed colostrum collection on colostrum IgG concentration in dairy cows*, J. Am. Journal of Veterinary Medicine Assoc., vol. 226, p.1375–1377.
141. Moore D.A., Taylor J., Hartman M.L., Sisco W.M., 2009 - *Quality assessments of waste milk at a calf ranch*, Journal of Dairy Science, vol. 92, p. 3503–3509.
142. Morarie-Kane Susan E., Natalia P. Smirnova, Thomas R. Hansen , Jessica Mediger , Lyle Braun, Christopher Chase, 2018 - *Fetal Hepatic Response to Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Utero*, Pathogens.
143. Morrill K., Tyler H., 2012 - *Two methods to determine IgG concentration in calf serum*. AS Leaflet 2012, R2708.
144. Morin D.E., McCoy G.C., Hurley W.L., 1997 - *Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves*, Journal of Dairy Science, vol. 80, p. 747–53.
145. Morin D.E., Stephanie V. Nelson, Eric D. Reid, Dusty W. Nagy, Geoffrey E. Dahl, Peter D. Constable, 2010 - *Effect of colostrum volume, interval between calving and first milking, and photoperiod on colostrum IgG concentrations in dairy cows*, J Am Vet Med Assoc, vol. 237 (4), p. 420-8.
146. Motegi Y., Kita H., 1998 - *Interaction with secretory component stimulates effector functions of human eosinophils but not of neutrophils*, J. Immun., vol. 161, p. 4340.
147. Murata H., Shimada N., Yoshioka M., 2004 - *Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview*, The Veterinary Journal, vol. 168, p. 28-40.
148. Murray C.F., Leslie K.E., 2013 - *Newborn calf vitality: risk factors, characteristics, assessment, resulting outcomes and strategies for improvement*, The Veterinary Journal, vol. 198(2), p. 322-8.
149. National Animal Health Monitoring System, 2007 - *Heifer Calf Health and Management Practices on U.S. Dairy Operations*.
150. National Animal Health Monitoring System, 2008 - *Colostrum Feeding and Management on U.S. Dairy Operations, 1991-2007*.
151. National Animal Health Monitoring System, 2010 - *Passive Transfer Status of Heifer Calves on U.S. Dairies, 1991–2007*.
152. Nia E.F., Nikkhan ., Rahmani H.R., Alikhani M., Alipour M.M., Ghorbani G.R., 2010 - *Increased colostrum somatic cell counts reduce pre-weaning calf immunity, health and growth*, J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), vol. 94(5), p. 628-34.
153. Norrman J., David C.W., Sauter S.N., Hammon H.M., Blum J.W., 2003 - *Effects of dexamethasone on lymphoid tissue in the gut and thymus of neonatal calves fed with colostrum or milk replacer*, J. Anim. Sci., vol. 81, p. 2322-2332.

154. Novo S.M.F., dos Reis Costa J.F., Baccili C.C., et al., 2017 - *Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves*, Research in Veterinary Science, vol.112, p. 97–104.
155. Ochoa T. J., Chea-Woo E., Baiocchi N., Pecho I., Campos M., Prada A., Valdiviezo G., Lluque A., Lai D., Cleary T. G., 2013 - *Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children*, J. Pediatr., vol. 162, p. 349–356.
156. Orro T., Jacobsen S., Lepage J.P., et al., 2008 - *Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves*, Vet. J., vol.176, p.182-187.
157. Pammi M., Abrams S. A., 2015 - *Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants*, Cochrane Database Syst. Rev. 2:CD007137.
158. Phalipon A., Cardona A., Kraehenbuhl J. P., Edelman L., Sansonetti P. J., Cothesy B., 2002 - *Secretory component: A new role in secretory IgA-mediated immune expulsion in vivo*, Immunity, vol. 17, p.107–115.
159. Paul I., 2005 - *Etiomorfopatologia bacteriozelor la animale*, Editura Pim, Iași.
160. Pîrvu G. H., ș.a., 1999 - *Tratat de nutriția animalelor*, București.
161. Perianu T. ș.a., 2011 - *Tratat de boli infecțioase, Vol. I – Bacterioze*, Editura Universitas XXI, Iași.
162. Perianu T. ș.a., 2012 - *Tratat de boli infecțioase, Vol. II - Viroze și boli prionice*, Editura Universitas XXI, Iași.
163. Perianu T., Ștefan N., Carp-Cărare M., Velescu Elena., Alexandru N., Țuc I. C. – *Boli infecțioase ale animalelor. Bacterioze, Volumul I*, Editura Venus, Iași, 2003.
164. Perrier C., Sprenger N., Corthésy B., 2006 - *Glycans on secretory component participate in innate protection against mucosal pathogens*, J. Biol. Chem. vol. 281, p. 14280–14287.
165. Piccione G., Casella S., Giannetto C., Vazzana I., Niutta P.P., Giudice A., 2009 - *Influence of age on profile of serum proteins in the calf*, Acta Vet., vol. 59, p. 413–422.
166. Pritchett L.C., Gay C.C., Besser T.E., Hancock D.D., 1991 - *Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows*, Journal of Dairy Science, vol. 74, p. 2336–2341.
167. Puddu P., Valenti P., Gessani S., 2009 - *Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells*, Biochimie, vol. 91, p. 11–18.

168. Quigley J.D., Kost C.J., Wolfe T.M., 2002 - *Absorption of protein and IgG in calves fed to colostrum supplement or replacer*, Journal of Dairy Science, vol. 85, p.1243–1248.
169. Ragsdale A. C., Brody S., 1923 - *The colostrum problem and its solution*. Journal of Dairy Science, vol. 6, p. 137–144.
170. Rastani R.R., Grummer R.R., Bertics S.J., Gümen A., Wiltbank M.C., Mashek D.G., Schwab M.C., 2005 - *Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: Milk production, energy balance, and metabolic profiles*, Journal of Dairy Science, vol. 88, p.1004-1014
171. Razzaque M.A., Al-Mutawa T., Abbas S., Bedair M., 2009 - *Performance of pre-weaned dairy calves under hot arid environment: effects of immunoglobulins and age on diseases and mortality*, American Journal of Applied Sciences, vol. 6, p. 1885–1891.
172. Reber A.J., Hippen A.R., Hurley D.J., 2005 - *Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures*, American Journal of Veterinary Research, vol. 66, p. 1854–60.
173. Risalde M.A., Gómez-Villamandos J.C., Pedrera M., Molina V., Cerón J.J., Martínez-Subiela S., Sánchez-Cordón P.J., 2011 - *Hepatic immune response in calves during acute subclinical infection with bovine viral diarrhoea virus type 1*, Vet. J., vol. 190, p.110-116.
174. Robblee E. D., Erickson P. S., Whitehouse N. L., McLaughlin A. M., Schwab C. G., Rejman J. J., Rompala R. E., 2003 - *Supplemental lactoferrin improves health and growth of Holstein calves during the preweaning phase*, Journal of Dairy Science, vol. 86, p. 1458–1464.
175. Robinson M.W., Harmon C., O’Farrelly C., 2016 - *Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis*, Cell. Mol. Immunol., vol. 13, p. 267–276.
176. Sadri H., Getachew B., Morteza H. Ghaffari, 2020 - *Short communication: Plasma concentration and tissue mRNA expression of haptoglobin in neonatal calves*, Journal of Dairy Science, vol. 103, p. 6684-6691.
177. Sanchez L., Lujan L., Oria R., Castillo H., Perez D., Ena J. M., Calvo M., 1992 - *Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep*, Journal of Dairy Science, vol. 75, p.1257–1262.
178. Sato S., 1997 - *Shitsugikoudoutokachikunofukushi [unnatural behavior and domestic animal welfare]*, K Mimura (ed.), Kachikukoudougaku, pp. 98– 121. Yokendo Ltd., Tokyo. (In Japanese)
179. Schmidt Nadine, Barth A. Stefanie, Frahm Jana, Meyer M., Dänicke S., Geue L., Menge1 C., 2018 - *Decreased STEC shedding by cattle following passive and active*

- vaccination based on recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids, *Veterinary Research*, vol. 49, p. 28.
180. Schnulle P. M., Hurley W. L., 2003 - *Sequence and expression of the FCRn in the porcine mammary gland*, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 91, p. 227–231.
 181. Schroedl W., Jaekel L., Krueger M., 2003 - *C-reactive protein and antibacterial activity in blood plasma of colostrum-fed calves and the effect of lactulose*, *Journal of Dairy Science*, vol. 86, p. 3313–3320.
 182. Senogles D.R., Muscoplat C.C., Paul P.S., et al, 1978 - *Ontogeny of circulating B lymphocytes in neonatal calves*, *Research in Veterinary Science*, vol. 25, p. 34–36.
 183. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J., 2002 - *A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development*, *Nature*, vol. 417, p. 552–555.
 184. Sharifi K., Grunberg W., Soroori S., Mohri M., AhrariKhafi M. S., 2009 - *Assessment of the acetaminophen absorption test as a diagnostic tool for the evaluation of the reticular groove reflex in lambs*, *Am. J. Vet. Res.*, vol. 70, p. 820–825.
 185. Shivley C.B., Lombard J.E., Urie N.J., et al., 2018 - *Preweaned heifer management on US dairy operations: Part II. Factors associated with colostrum quality and passive transfer status of dairy heifer calves*, *Journal of Dairy Science*, vol. 101, p. 9168–84.
 186. Shoshani Ezra S.H, Steven Rosen, Doekes J.J., 2014 - *Effect of a short dry period on milk yield and content, colostrum quality, fertility, and metabolic status of Holstein cows*, *Journal of Dairy Science*, vol. 97(5).
 187. Smirnova N.P., Webb B.T., Bielefeldt-Ohmann H., Van Campen H., Antoniazzi, A.Q., Morarie S.E., Hansen T.R., 2012 - *Development of fetal and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhea virus*, *Virus Res.*, vol.167, p. 329–336.
 188. Smith G.W., Foster D.M., 2007 - *Short Communication: Absorption of protein and immunoglobulin G in calves fed a colostrum replacer*, *Journal of Dairy Science*; vol. 90(6), p. 2905–2908.
 189. Smolenski G., Haines S., Kwan F. Y., Bond J., Farr V., Davis S. R., Stelwagen K., Wheeler T. T., 2007 - *Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomics approach*, *J. Proteome Res.*, vol. 6, p. 207–215.
 190. Sobczuk-Szul M., Wielgosz-Groth Z., Wroński M., Rzemieniewski A., 2013 - *Changes in the bioactive protein concentrations in the bovine colostrum of Jersey and Polish Holstein-Friesian cows*, *Turk J Vet Anim Sci.*, vol. 37, p. 43–49.
 191. Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T. T., 2009 - *Immune components of bovine colostrum and milk*, *Journal of Animal Science*, vol. 87, p. 3–9.

192. Staley T.E., Corles C.D., Bush L.J., et al., 1972 - *The ultrastructure of neonatal calf intestine and absorption of heterologous proteins*, Anat Rec, vol.172, p. 559–79.
193. Svensson C., Linder A., Olsson S.O., 2006 - *Mortality in Swedish dairy calves and replacement heifers*, Journal of Dairy Science, vol. 89(12), p. 4769-77.
194. Swanson K., Gorodetsky S., Good L., Davis S., Musgrave D., Stelwagen K., V., 2004 - *Expression of a β -defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced with mastitis*, Infection and Immunity, vol. 72, p. 7311–7314.
195. Szewczuk M., Czerniawska-Piątkowska E., Palewski S., 2011 - *The effect of colostrum supplement on the serum protein fractions, health status and growth of calves*, Archiv Tierzucht, vol. 54, p.115–126.
196. Talukder M.J., Takeuchi T., Harada E., 2003 - *Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches*, J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, vol. 50, p. 123-31.
197. Talukder MJ, Harada E., 2006 - *Binding characteristics and distribution of lactoferrin receptors in the gut and choroid plexus in newborn calves*, Indian J Exp Biol., vol. 44(10), p. 783–790.
198. Taniguchi K., Urasawa T., Kobayashi N., Ahmed M.U., Adachi N., Chiba S., Urasawa S., 1991 - *Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination*, J Clin Microbiol, vol. 29(3), p. 483-487.
199. Tizard I., 2013 - *Veterinary Immunology: An Introduction*, 9th Editura Philadelphia, PA, WB Saunders, vol. Immunity in the fetus and newborn, p. 225–39.
200. Thomas J.S., 2000 - *Overview of plasma proteins and protein electrophoresis*, Feldman BF, Zinkl JG, Jain JC, editors: Schalm's veterinary haematology 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, p. 891–904.
201. Tóthová Csilla, Nagy O., Kováč G., 2011 - *The Use of Acute Phase Proteins as Biomarkers of Diseases in Cattle and Swine*, IntechOpen, Edited by Sabina Janciauskiene.
202. Tóthová Csilla, Nagy Oskar, Nagyová Veronika, Kováč Gabriel, 2015 - *Changes in the concentrations of acute phase proteins in calves during the first month of life*, Acta Veterinaria-Beograd, vol. 65 (2), p. 260-270.
203. Tsuji S., Hirata Y., Mukai F., 1990 - *Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds*, Journal of Dairy Science, vol. 73, p. 125–128
204. Tyler J.W., Hancock D.D., Thorne J.G., 1999 - *Partitioning the mortality risk associated with inadequate passive transfer of colostrum Ig in dairy calves*, J Vet Inter Med, vol. 13, p. 335–337.

205. Uetake Katsuji, 2013 - *Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates*, Animal Science Journal, vol. 84, p. 101–105.
206. Vaden S.L., Knoll J.S., Smith S.W.K., Tilley L.P., 2009 - *Protein electrophoresis. In: Blackwell's five minute veterinary consult: laboratory tests and diagnostic procedures*, Ames (IA): Wiley-Blackwell; p. 501–503.
207. Velescu Elena – *Patologia bolilor infecțioase la animale*, Editura Terra Nostra, Iași, 2002.
208. Velescu Elena, 1999 – *Diagnosticul bolilor infecțioase- Manual practic*, Ed. Vasiliana 98, Iași.
209. Velescu Elena, Perianu T., Tănase Irina – Oana (2004) – *Răspunsul imun în infecțiile gripale la animale*, USAMV Iași – Lucrări științifice, vol 47 (6), pag. 679-684, ISSN 1454-7406.
210. Virtala Anna-Maija, et al., 1999 - *The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life*, Preventive Veterinary Medicine, vol. 39(1), p. 25-37.
211. Waltner-Toews D., Martin S.W., Meek A.H., 1985 - *A field trial to evaluate the efficacy of a combined rotavirus-coronavirus/Escherichia coli vaccine in dairy cattle*, Canadian Journal of Comparative Medicine, vol. 49, p. 1– 9.
212. Weaver D.M., Tyler J.W., VanMetre D.C., Hostetler D.E., Barrington G.M., 2000 - *Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves*, Journal of Veterinary Internal Medicine, vol. 14(6), p. 569-77.
213. Wells S., Dargatz D., Ott S., 1996 - *Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States*, Prev. Journal of Veterinary Medicine, vol. 29, p. 9–19.
214. Wheeler T. T., Hodgkinson A. J., Prosser C. G., Davis S. R., 2007 - *Immune components of colostrum and milk—A historical perspective*, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, vol. 12, p. 237–247.
215. Wilde D., 2009 - *Nutrition and immunity in the newborn calf: new advances from yeast based technologies*. Revue de Medecine Veterinaire, vol. 160, p. 425– 428.
216. Wilson E., Butcher C. E., 2004 - *CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate*, J. Exp. Med., vol. 200, p. 805–809.
217. Windeyer M.C., Leslie K.E., Godden Sandra M., Hodgins D.C., Lissemore K.D., LeBlanc S.J., 2014 - *Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age*, Preventive Veterinary Medicine, vol. 113, p. 231–240.
218. Xue W., Ellis J., Mattick D., Smith L., Brady R., Trigo E., 2010 - *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 calves*, Vaccine, vol. 28, p. 3784-3792.
219. Yang F.M., Haile D.J., Berger F.G., Herbert D.C., Van Beveren E., Ghio A.J., 2003 - *Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood*, American Journal of Physiology and Lung Cell Molecular Physiology, vol. 284, p. L402-L409.
220. Yilmaz Necat, Esin Eren, Cemile Oz, 2020 - *COVID-19 and Lactoferrin, Presentation*, DOI: 10.13140/RG.2.2.36178.99526.
221. Yoshida S., Wei Z., Shinmura Y., Fukunaga N., 2000 - *Separation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum*, Journal of Dairy Science, vol. 83, p. 2211–2215.

LISTA DE FIGURI

1. Fig. 6.1 Boxă de fătare (original)
2. Fig. 6.2 Cuști individuale pentru vițeii nou-născuți (original)
3. Fig. 6.3 Administrarea laptelui la viței cu MilkTaxi (original)
4. Fig. 6.4 Boxe comune de cazare a vițeilor (original)
5. Fig. 6.5 Numărul de viței cu afecțiuni digestive și respiratorii
6. Fig. 6.6 Evoluția indicilor de morbiditate, mortalitate și letalitate
7. Fig. 6.7 Vițeii cu afecțiuni respiratorii pe categorii de vârstă
8. Fig. 6.8 Vițeii cu afecțiuni digestive pe categorii de vârstă
9. Fig. 6.9 Distribuția afecțiunilor pe sezoane climatice
10. Fig. 6.10 Distribuția afecțiunilor pe luni
11. Fig. 6.11 Cauzele morții vițeilor
12. Fig. 6.12 Vițel cu diaree - A; vițel cu timpanism ruminal acut - B (original)
13. Fig. 6.13 Vițel cu timpanism ruminal și semne de colică (original)
14. Fig. 6.14 Congestie intestinală - A; ficat mărit în volum, congestie hepatică - B (original)
15. Fig. 6.15 Epiforă, apatie, jetaj - A; tuse - B (original)
16. Fig. 6.16 Congestie pulmonară - A; dilatație cardiacă - B (original)
17. Fig. 7.1 Kit de diagnostic rapid Rainbow Calf Scour: diluare probă - A; probe negative - B (original)
18. Fig. 7.2 Kit de diagnostic rapid Huve Check Calf Scours - probă pozitivă pentru *Cryptosporidium parvum* și *Clostridium perfringens* - A; Kit de diagnostic rapid Rainbow Calf Scour - probă pozitivă pentru *E. coli* (original)
19. Fig. 7.3 Buletin analiză – Profil respirator bovin, metoda PCR (original)
20. Fig. 7.4 Prevalența agenților infecțioși identificați în fecalele vițeilor
21. Fig. 7.5 Prevalența infecțiilor digestive la viței în prima lună de viață
22. Fig. 7.6 Prevalența agenților patogeni în fecalele vițeilor în prima lună de viață
23. Fig. 7.7 Prevalența agenților infecțioși identificați în lavajul bronhoalveolar la vițeii cu vârsta de 2-3 luni
24. Fig. 8.1 Proteine serice umane - electropherogramă capilară (Cecile Gay-Bellile ș.a., 2003)
25. Fig. 8.2 Modificările concentrațiilor proteinelor serice totale și albuminei la viței în primele 7 zile de viață (g/l)
26. Fig. 8.3 Mediile concentrațiilor relative ale albuminei serice la viței în primele 7 zile de viață (%)
27. Fig. 8.4 Modificările raportului albumină / globulină (A/G) la viței în primele 7 zile de viață
28. Fig. 8.5 Modificările concentrațiilor serice ale alfa-globulinelor la viței în primele 7 zile de viață (g/l)
29. Fig. 8.6 Modificările concentrațiilor serice ale beta-globulinelor la viței în primele 7 zile de viață (g/l)
30. Fig. 8.7 Modificările concentrațiilor serice ale albuminei și fracțiilor proteice gamma la viței în primele 7 zile de viață (g/l)

31. Fig. 9.1 - Concentrația de lactoferină în laptele vacilor sănătoase (nr. = 189) într-un efectiv de vaci de lapte din Noua Zeelandă în timpul lactației timpurii (57 de zile de lactație; K. Stelwagen, 2009)
32. Fig. 9.2 Kit ELISA pentru evaluarea cantitativă a lactoferinei (original)
33. Fig. 9.3 Diluții probe de colostru - A; diluții probe de ser - B (original)
34. Fig. 9.4 Aspect placă după adăugarea soluției STOP (original)
35. Fig. 9.5 Curba standard de calibrare pentru calculul concentrațiilor de lactoferină
36. Fig. 9.6 Concentrațiile de lactoferină din probele de colostru (mg/ml)
37. Fig. 9.7 Concentrațiile de lactoferină din probele de ser
38. Fig. 9.8 Valorile concentrațiilor lactoferinei serice la viței în urma consumului de colostru
39. Fig. 9.9 Valorile concentrațiilor lactoferinei serice la viței în raport cu valorile concentrațiilor de lactoferină colostrală
40. Fig. 10.1 Kit ELISA pentru evaluarea haptoglobinei (original)
41. Fig. 10.2 Distribuția conjugatului enzimatic (original)
42. Fig. 10.3 Aspect placă după adăugarea substratului cromogen - A; aspect placă după stopare reacție - B (original)
43. Fig. 10.4 Spectrofotometru Stat Fax 3200 Awarness Technology (original)
44. Fig. 10.5 Curba standard de calibrare pentru calculul concentrațiilor de haptoglobină
45. Fig. 10.6 Valorile concentrațiilor serice de haptoglobină în urma consumului de colostru la viței nou-născuți
46. Fig. 10.7 Dinamica concentrațiilor de haptoglobină după administrarea colostrului
47. Fig. 10.8 Concentrațiile de haptoglobină (medie) în serul vițelor cu diaree și vițelor care s-au vindecat de diaree. O diferență cu o valoare P mai mică de 0,05 conform testului T a fost considerată semnificativă ($p < 0,001$)
48. Fig. 11.1 Probe de ser - A; probe de colostru - B (original)
49. Fig. 11.2 Kit ELISA de competiție Bovine Rotavirus BIO-X Diagnostics (original)
50. Fig. 11.3 Aspect placă după adăugarea substratului cromogen - A; aspect placă după stopare reacție - B (original)
51. Fig. 11.4 Kit ELISA de competiție Bovine Coronavirus BIO-X Diagnostics (original)
52. Fig. 11.5 Diluții probe de colostru - A; repartizare probe în placă - B (original)
53. Fig. 11.6 Kit ELISA blocking E. coli F5 (K99) BIO-X Diagnostics (original)
54. Fig. 11.7 Spălarea automată a plăcilor (original)
55. Fig. 11.8 Valori densități optice (DO) probe de ser și colostru (original)
56. Fig. 11.9 Graficul valorilor medii ale anticorpilor anti-rotavirus bovin (BoRV), exprimat în procente de inhibiție % măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițelor
57. Fig. 11.10 Graficul valorilor medii ale anticorpilor anti-coronavirus bovin (BoCV), exprimat în procente de inhibiție măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițelor
58. Fig. 11.11 Graficul valorilor medii ale anticorpilor anti-E.coli F5 (K99), exprimat în procente de inhibiție măsurate cu ELISA blocking din serurile vacilor gestante și serurile vițelor

59. Fig. 12.1 Distribuția pe teritoriul României a celor 30 de ferme luate în studiu (A) și mărimea efectivelor de animale (B)
60. Fig. 12.2 Refractometru Atago, scară de citire (original)
61. Fig. 12.3 Exprimarea serului în proba de sânge și examinarea acestuia cu refractometrul (original)
62. Fig. 12.4 Probă de colostru gata pentru examinare (original)
63. Fig. 12.5 Refractometru ColoQuick, scară de citire, schema pentru interpretarea rezultatelor (original)
64. Fig. 12.6 Vaca și vițelul imediat după fătare (original)
65. Fig. 12.7 Tub esofagian și rezervă ColoQuick de 4 litri pentru administrarea colostrului (original)
66. Fig. 12.8 Administrarea laptelui cu biberonul (original)
67. Fig. 12.9 Administrarea colostrului – metode, doze și intervale de administrare
68. Fig. 12.10 Cantitățile de colostru administrate în primele 24 de ore de viață
69. Fig. 12.11 Testarea colostrului și a serului sangvin
70. Fig. 12.12 Stocarea și pasteurizarea colostrului
71. Fig. 12.13 Kit ColoQuick de stocare și pasteurizare a colostrului (original)
72. Fig. 12.14 Reușita transferului pasiv în cele 3 loturi de viței
73. Fig. 12.15 Rata morbidității și mortalității în funcție de reușita transferului pasiv

LISTA DE TABELE

1. Tabel 2.1 Principalii constituenți din colostru și laptele de vacă (Godden 2019)
2. Tabel 3.1 Receptivitatea vițelilor la diareea neonatală în funcție de vârstă și agentul patogen cauzal (Perianu T., 2011, 2012)
3. Tabel 6.1 Numărul de vițeli cu afecțiuni digestive și respiratorii
4. Tabel 6.2 Evoluția indicilor de morbiditate, mortalitate și letalitate
5. Tabel 6.3 Vițeli cu afecțiuni digestive și respiratorii pe categorii de vârstă
6. Tabel 6.4 Semne clinice și leziuni anatomopatologice în afecțiunile digestive
7. Tabel 6.5 Semne clinice și leziuni anatomopatologice în afecțiunile respiratorii
8. Tabel 7.1 Prevalența agenților patogeni în fecalele vițelilor
9. Tabel 7.2 Prevalența agenților patogeni în fecalele vițelilor în prima lună de viață
10. Tabel 7.3 Prevalența agenților infecțioși identificați în lavajul bronhoalveolar la vițeli cu vârstă de 2-3 luni
11. Tabel 8.1 Modificările concentrațiilor proteinelor serice totale, a fracțiilor proteice și ale raportului albumină/globulină (A/G) la vițeli în primele 7 zile de viață
12. Tabel 9.1 Diluții standard pentru curba etalon
13. Tabel 9.2 Valorile concentrațiilor serice de lactoferină în urma consumului de colostru la vițelii nou-născuți
14. Tabel 9.3 Valorile concentrațiilor lactoferinei serice la vițeli în raport cu valorile concentrațiilor de lactoferină colostrală
15. Tabel 9.4 Corelația aportului de lactoferină colostrală și diareea neonatală în primele 14 de zile de viață
16. Tabel 10.1 Valorile concentrațiilor serice de haptoglobină în urma consumului de colostru la vițelii nou-născuți
17. Tabel 11.1 Valorile anticorpilor anti-rotavirus bovin (BoRV), exprimat în procente de inhibiție (%), măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițelilor
18. Tabel 11.2 Valorile anticorpilor anti-coronavirus bovin (BoCV), exprimat în procente de inhibiție %, măsurate cu ELISA competitiv din serurile vacilor gestante, colostru și serurile vițelilor
19. Tabel 11.3 Valorile anticorpilor anti- E. coli F5 (K99), exprimat în procente de inhibiție % măsurate cu ELISA blocking din serurile vacilor gestante și serurile vițelilor
20. Tabel 11.4 Valorile anticorpilor din serul vițelilor înainte și după administrarea colostrului, exprimate în procente de inhibiție % măsurate cu ELISA
21. Tabel 11.5 Evaluarea cazurilor de diaree clinică din loturile de vițeli în primele 28 de zile de viață
22. Tabel 12.1 Valorile serice ale IgG în urma consumului de colostru în primele 24 de ore de viață
23. Tabel 12.2 Rata morbidității, letalității și mortalității în loturile experimentale

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE

PRIM-AUTOR

LUCRĂRI INDEXATE BDI

1. **Ioana Minea (Pipirig)**, Elena Velescu, Oana Tănase, Florentina Daraban, Iuliana Mihai, *Colostrum management practices in some Romanian dairy farms*. International Congress: Life Sciences today for tomorrow, 16-18 octombrie, 2019, **Iași**, Lucrări științifice, Medicină veterinară, Volumul 62, partea a 2-a, 2019, pag. 121-125.
2. **Ioana Minea (Pipirig)**, Elena Velescu, Cristina Horhoge, *Passive immunity stimulated by vaccination of dry cows with a trivalent vaccine against neonatal calf diarrhea*. International Congress: Life Sciences Today For Tomorrow, 22-23 octombrie, 2020, **Iași**, Lucrări științifice, Medicină veterinară, Volumul 63, partea 1, 2020, pag. 39-42.
3. **Ioana Minea (Pipirig)**, Elena Velescu, Cristina Horhoge, *The influence of colostrum consumption on serum lactoferrin in newborn calves*. International Congress: Life Sciences Today For Tomorrow, 22-23 octombrie, 2020, **Iași**, Lucrări științifice, Medicină veterinară, Volumul 63, partea 1, 2020, pag. 43-46.