

## Suplementación con selenio en vaquillas: Efecto sobre la respuesta inmune a las vacunas *Brucella abortus* cepa RB51 y toxoide tetánico<sup>#</sup>

Selenium supplementation in heifers: Effect on the immune response to *Brucella abortus* strain RB51 and tetanus toxoid vaccines

V Leyán<sup>1\*</sup>, D Pesutic<sup>1</sup>, G Schurig<sup>2</sup>, F Wittwer<sup>3</sup>, P A Contreras<sup>3</sup>, J Kruze<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

<sup>2</sup> Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine Virginia Tech, USA.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

<sup>4</sup> Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile.

### SUMMARY

The effect of selenium (Se) supplementation on the immune response to tetanus toxoid and *Brucella abortus* strain RB51 vaccines was studied in heifers with a normal Se status (GSH-Px activity > 130 U/g Hb). Frisian heifers (n=32), 18 to 24 months old were randomly allocated into two groups of 16 animals each. Animals from one group were supplemented (Se-S) with one dose of barium selenate (1 mg/Se/kg. s.c.) on day 0; animals from the other group remained as a control without supplementation (No-S). The heifers grazed during 9 months (April to January) a pasture that contained 0.04 ppm/DM of Se. All animals were vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 (day 60) and tetanus toxoid (days 120 and 150). Blood samples were obtained before supplementation and each 15 days until the end of the experiment. The Se status was assessed by determination of the blood GSH-Px activity. The specific antibodies to antigens were determined by ELISA technique and the cellular immune response to *Brucella abortus* antigen was determined by intradermic reaction test. Selenium administration produced an increase ( $P < 0,05$ ) in blood GSH-Px activity to between 339 and 579 U/g Hb during the immune response experimental period. Selenium administration did not affect the humoral immune response to RB51 vaccine and tetanus toxoid ( $P > 0,05$ ). However, the cellular immune response to RB51 in Se-S heifers was decreased ( $P < 0,05$ ). It is concluded that Se supplementation in heifers with a normal Se status kept under farm conditions does not affect the humoral immune response to RB51 vaccine and tetanus toxoid, but reduces the cellular immune response to RB51 vaccine.

*Palabras clave:* respuesta inmune, selenio, glutatión peroxidasa, toxoide tetánico, *Brucella abortus*.

*Key words:* immune response, selenium, glutathione peroxidase, tetanus toxoid, *Brucella abortus*.

### INTRODUCCION

El selenio (Se) es un componente esencial de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) que se encarga de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno, protegiendo la célula del daño causado por el estrés oxidativo (Castillo y col 2001). El estrés oxidativo generado por la deficiencia de Se en rumiantes se ha asociado con alteraciones musculares, reproductivas, tumorales, del crecimiento, de la función tiroidea y del sistema inmune (López-Alonso y col 1997).

Los requerimientos de Se en bovinos fluctúan entre 0,1 y 0,3 ppm (NRC 2001). Dietas con concentraciones menores de 0,03 ppm se asocian con alteraciones de la

salud y la producción (Underwood y Suttle 1999). En el sur de Chile, los sistemas de producción bovina son principalmente extensivos, por lo tanto, la principal fuente de Se proviene de la alimentación con pradera natural y forrajes conservados, que en un alto porcentaje son deficientes de este microelemento (Ceballos y col 1998).

Para evitar los trastornos provocados por el bajo contenido de Se de la alimentación del ganado, es común suplementarlos administrando Se con la ración, mezclas minerales o por vía parenteral; esta práctica muchas veces va asociada con la administración de vacunas contra las enfermedades prevalentes en la región y, en particular, a la vacuna antibrucelócica RB51, utilizada en el plan nacional de control y erradicación de la brucelosis bovina en Chile y en otros países.

Los estudios con relación al efecto del Se sobre la respuesta inmune a las vacunas, en particular sobre la vacuna contra brucelosis, son escasos; al respecto, sólo se señala que la suplementación con Se en vaquillas no afecta los títulos de anticuerpos a la vacuna antibrucelócica Cepa

Aceptado: 15.03.2005

# Financiado por Proyecto Fondecyt N° 119-0993.

\* Correspondencia: E-mail: vleyan@uach.cl - Casilla N° 567, Valdivia, Chile.

19 (Nemec y col 1990). Otros estudios, realizados con diferentes estímulos antigénicos y distintas condiciones experimentales, muestran resultados variables y algunas veces contradictorios, ya que, en algunos casos, el Se se asocia con un aumento y, en otros, con una disminución de la respuesta inmune humoral y celular (Finch y Turner 1996; Swecker 1997).

Debido a la importancia que tiene la integridad y el normal funcionamiento del sistema inmune, tanto para los mecanismos de defensa como para la inmunoprofilaxis mediante vacunas, se planteó la necesidad de estudiar el efecto de la suplementación con Se sobre la respuesta inmune inducida por la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 y la vacuna Toxoide tetánico en un grupo de vaquillas en pastoreo.

## MATERIAL Y METODOS

**Animales.** Se utilizaron 32 vaquillas Frisón Negro, preencaste, entre 18 y 24 meses de edad, de 300 a 350 kg de peso vivo y provenientes de un predio libre de tuberculosis, leucosis y brucelosis. Los animales se asignaron al azar en dos grupos de 16 vaquillas cada uno, un grupo suplementado con Se (Se-S) y otro control no suplementado (No-S). Todos los animales habían recibido la vacuna antibrucelosis RB51 entre los 6 y 8 meses de edad, como parte del programa de vacunación del predio. Los animales fueron mantenidos durante 9 meses (abril a enero), en pradera natural con un contenido de Se en la pradera de 0,04 µg/g base materia seca (determinado en el Hill Laboratories. Hamilton, NZ) en muestras de forraje obtenidas antes y después del periodo experimental.

**Suplementación con selenio.** El grupo Se-S fue suplementado con 1 mg de Se/ kg/pv en forma de selenato de bario<sup>1</sup> en dosis única de 1 ml/50 kg/pv. subcutáneo. De cada vaquilla se tomaron simultáneamente dos muestras de sangre (con y sin heparina), por venopunción coccígea previo a la suplementación (día 0), y luego cada 15 días durante 270 días. El suero obtenido fue guardado a -20 °C hasta su posterior análisis.

**Evaluación de la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px).** El balance nutricional de Se se evaluó en ambos grupos de animales mediante la actividad sanguínea de GSH-Px en un hemolizado de las muestras de sangre con heparina, empleando reactivos comerciales<sup>2</sup>, basados en una técnica cinética compuesta NADPH-dependiente, según la modificación del método descrito por Paglia y Valentine en 1967 (Ceballos y col 1998). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi 4020<sup>3</sup>.

La actividad de GSH-Px fue expresada en U/g Hb e interpretada según Ceballos y Wittwer (1996), quienes señalan que valores menores a 60 U/g Hb son considerados deficientes y sobre 130 U/g Hb son considerados apropiados.

**Inmunización con la vacuna RB51.** Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune humoral y celular a la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51<sup>4</sup>, todos los animales fueron inmunizados con una dosis completa (1-3,4 x 10<sup>10</sup>), 60 días posteriores a la administración de Se.

**Preparación antigénica del extracto total de RB51.** *Brucella abortus* cepa RB51 se cultivó en caldo TSB<sup>5</sup> a 37 °C bajo agitación continua por 5 días hasta obtener un cultivo saturado con bacterias. Se centrifugó a 12.000 r.p.m. por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet de bacterias se suspendió en agua destilada en un volumen equivalente a 10% del volumen original del caldo saturado y se incubó bajo agitación continua en baño María a 65 °C por 30 minutos. Luego se le agregó SDS<sup>6</sup> para alcanzar una concentración final de 0,5% y se incubó en un baño hirviendo por 10 minutos. La preparación se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se utilizó como antígeno. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford<sup>7</sup>.

**Determinación de la respuesta inmune a la vacuna RB51.** La respuesta humoral se determinó por el método de ELISA indirecto en muestras de suero (1: 2000) cada 15 días durante 90 días. En resumen, la placa de poliestireno se sensibilizó con 0,5 µg de proteína del extracto total de RB51 por pocillo y fue incubada con el suero a 4 °C durante 18 horas. Para detectar los anticuerpos específicos se utilizaron anticuerpos anti IgG de bovino unidos a peroxidasa<sup>8</sup>. La reacción fue revelada con o-Phenylene-diamine<sup>9</sup> y peróxido de hidrógeno como sustrato.

La respuesta inmune celular se evaluó mediante pruebas de intradermorreacción en los dos grupos de animales previamente sensibilizados con la vacuna RB51. La determinación de la respuesta se obtuvo mediante inyección intradérmica del extracto de *Brucella abortus* RB51 en dosis de 16 µg, 175 días después de la vacunación y la lectura se realizó a las 72 horas postinoculación. Como control de la reacción en los mismos animales se utilizó tuberculina (PPD) y, como control del antígeno, la prueba intradérmica se les aplicó a terneras no inmunizadas con RB51.

**Inmunización con toxoide tetánico.** Con el fin de inducir y evaluar la respuesta inmune humoral, tanto primaria

<sup>1</sup> Deposel®, Young Animal Health Ltd., NZ.

<sup>2</sup> RANSEL®. Laboratorios Randox, Crumlin, UK.

<sup>3</sup> Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

<sup>4</sup> Professional Biological Company, Denver, Co, USA.

<sup>5</sup> Sigma, St. Louis, MO.

<sup>6</sup> Sigma, St. Louis, MO.

<sup>7</sup> Bio-Rad, Hercules CA.

<sup>8</sup> Capel, ICN Pharmaceuticals, Inc. USA.

<sup>9</sup> Sigma, USA.

como secundaria, todos los animales recibieron una doble inmunización con toxoide tetánico adsorbido con hidróxido de aluminio<sup>10</sup> en dosis de 2,5 ml vía s.c. (300 Lf/ml). La primera inmunización se realizó 120 días post-suplementación con Se y la segunda inmunización, 30 días después.

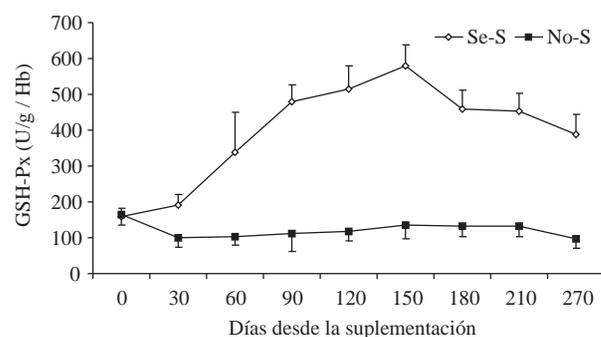
**Determinación de la respuesta inmune a la vacuna Toxoide tetánico.** La respuesta humoral se determinó por el método de ELISA indirecto en muestras de suero (1:4000) cada 15 días durante 75 días, utilizando el mismo protocolo que para determinar la respuesta a la vacuna RB51. En este caso las placas fueron sensibilizadas con 1 µg de toxoide tetánico por pocillo, cuya concentración fue determinada por espectrofotometría, mediante un kit comercial de proteínas totales<sup>11</sup>.

**Análisis estadístico.** Establecida la normalidad de la distribución de los datos, mediante la prueba de Kolmogorov y Smirnov, se calcularon los promedios y desviación estándar para cada grupo y día de muestreo. La significancia de las diferencias dentro del grupo se evaluó mediante análisis de varianza y cuando éstas fueron significativas se identificaron con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba “t” de Student (Zar 1996). Los análisis se realizaron con el programa Graph-Pad-Prism (versión 3) usándose un valor de significancia de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Al comienzo del estudio, previo a la suplementación, los animales de ambos grupos se encontraban con niveles adecuados de GSH-Px. El grupo No-S presentó una leve disminución ( $P > 0,05$ ) en la actividad de GSH-Px, pero manteniéndose sobre los valores considerados como deficientes durante todo el estudio (figura 1). La suplementación con Se aumentó ( $P < 0,05$ ) la actividad GSH-Px desde los 30 días a valores que fluctuaron entre 192 y 579 U/g Hb para llegar al final del periodo experimental con 389 U/g Hb (figura 1).

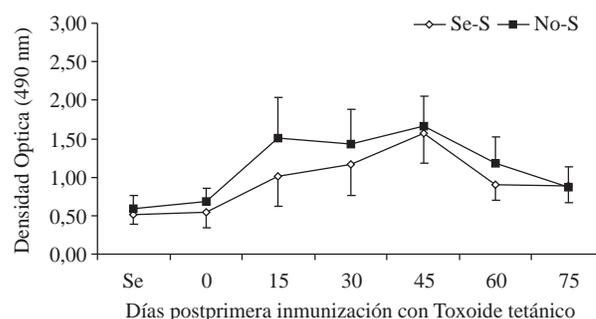
La cinética de la respuesta inmune humoral a la doble administración de toxoide tetánico fue similar en ambos grupos (figura 2). La respuesta humoral primaria produjo un incremento ( $P < 0,05$ ) en la concentración sérica de anticuerpos entre el día 0 y 15, la segunda inmunización (día 30) elevó ( $P > 0,05$ ) levemente los títulos del día 15 en ambos grupos. No se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre los animales Se-S y No-S.



Día 0: Suplementación con selenio.  
Día 60: Inmunización con RB-51.  
Día 120: Primera Inmunización con toxoide tetánico.  
Día 150: Segunda Inmunización con toxoide tetánico.  
 $P < 0,05$  entre grupos.

**Figura 1.** Actividad sanguínea de GSH-Px (promedio  $\pm$  DE) en vaquillas suplementadas (Se-S, n = 16) y no suplementadas (No-S, n = 16) con selenato de bario.

Blood GSH-Px activity (mean  $\pm$  SD) in heifers with (Se-S, n = 16) and without (No-S, n = 16) supplementation with barium selenate.



Se: Suplementación con selenio.  
Día 0: Primera inmunización con toxoide tetánico, 120 días posterior a la suplementación con Se.  
Día 30: Segunda inmunización con toxoide tetánico.  
 $P > 0,05$  entre grupos.

**Figura 2.** Cinética de la producción de anticuerpos (promedio  $\pm$  DE) contra toxoide tetánico, en vaquillas suplementadas con selenato de bario (Se-S) y no suplementadas (No-S) y vacunadas 120 y 150 días postsuplementación con selenio.

Kinetics (mean  $\pm$  SD) of the production of antibodies against tetanus toxoid antigen in heifers supplemented (Se-S) and not supplemented (No-S) with barium selenate, vaccinated 120 and 150 days after the supplementation.

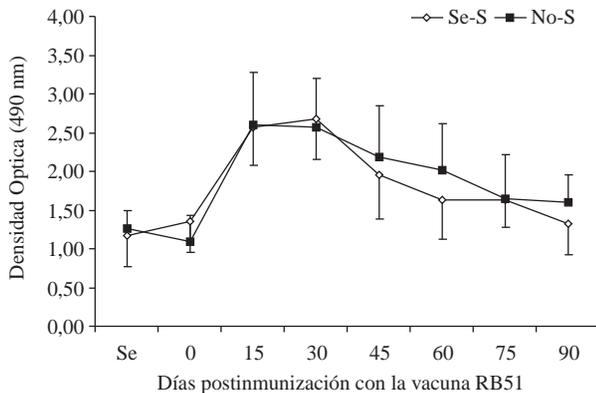
La administración de la vacuna RB51 desarrolló similar cinética de producción de anticuerpos en ambos grupos de animales, observándose un aumento ( $P < 0,05$ ) entre el día 0 y 15 postinmunización (figura 3). No se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) en la producción de anticuerpos entre los animales Se-S y No-S.

A las 72 horas de iniciada la prueba de intradermorreacción a las proteínas de *Brucella abortus* se

<sup>10</sup> Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile.

<sup>11</sup> Sentinel Diagnostics, Milano, Italy.

observó aumento de volumen e induración local en ambos grupos de animales. El aumento de volumen entre la hora 0 y la hora 72 fue de  $0,32 \pm 0,26$  cm para el grupo Se-S y de  $0,64 \pm 0,36$  cm en el grupo No-S ( $P < 0,05$ ). Las pruebas de intradermorreacción realizadas con tuberculina en los mismos animales y las realizadas con extracto de RB51 en terneras no vacunadas contra brucelosis fueron negativas.



Se: Suplementación con selenio.

Día 0: Inmunización con RB-51, 60 días posterior a la suplementación con Se.

$P > 0,05$  entre grupos.

**Figura 3.** Cinética de la producción de anticuerpos (promedio  $\pm$  DE) contra proteína total de RB51, en vaquillas suplementadas con selenato de bario (Se-S) y no suplementadas (No-S) y vacunadas 60 días después de la suplementación con selenio.

Kinetics (mean  $\pm$  SD) of the production of antibodies against total protein of strain RB51 antigen in heifers supplemented (Se-S) and not supplemented (No-S), with barium selenate vaccinated 120 and 150 days after the supplementation.

## DISCUSION

La concentración de Se en el forraje utilizado para alimentar bovinos a pastoreo debe tener sobre  $0,03 \mu\text{g/g}$  base materia seca, ya que dietas con concentraciones menores se asocian con alteraciones en la salud y la producción del ganado (Underwood y Suttle 1999). Aun cuando el predio en que se realizó el estudio tenía un contenido de Se en el forraje sólo levemente sobre dichos valores, los animales utilizados en la investigación mantenían una actividad de GSH-Px adecuada antes de la suplementación. Esta condición sugiere que se encontraban con un adecuado balance metabólico de Se, ya que la actividad de esta enzima es un buen indicador de su estatus en rumiantes (Stowe y Herdt 1992). Si bien es cierto que factores estacionales determinan fluctuaciones en la actividad de GSH-Px sanguínea (Ceballos y col 1998), es importante señalar que coincidente con el descenso en la actividad de GSH-Px el día 270 postsuplementación, las vaquillas se encontraban en el primer tercio de la gesta-

ción, condición que guarda relación con mayores requerimientos de nutrientes y minerales (NRC 2001).

La suplementación con selenato de bario tiene la ventaja que una dosis es capaz de mantener los niveles de Se durante varios meses (Lee y col 1999) y ha sido utilizada exitosamente en bovinos a pastoreo del sur de Chile (Wittwer y col 2002). En nuestro estudio, la administración de selenato de bario provocó un aumento de la actividad de GSH-Px desde el día 30, alcanzando valores entre 339 a 579 U/g Hb durante el período de estudio de la respuesta inmune. Bajo estas condiciones, la ausencia de diferencias en la respuesta inmune humoral al toxoide tetánico contrasta con lo señalado por Larsen y col (1988a), quienes describen aumento de la respuesta inmune humoral en ovinos suplementados con Se.

Por otra parte, el aumento observado en los títulos de anticuerpos contra RB51 entre el día 0 y 15, en ambos grupos de animales, corresponde a la respuesta secundaria, ya que las vaquillas habían sido vacunadas con RB51 entre los 6 y 8 meses edad, de acuerdo al programa nacional de control de brucelosis. La ausencia de diferencias entre ambos grupos a lo largo del período de estudio sugiere que la concentración de anticuerpos no se ve afectada por la suplementación con Se, similar a lo señalado por Nemeč y col (1990) en un estudio realizado en vaquillas suplementadas con Se vía oral y estimuladas con la vacuna antibrucelosis Cepa 19. En este mismo sentido, diversos autores, utilizando estímulos antigénicos distintos a los de *Brucella abortus*, señalan que la suplementación con Se en animales Se-deficientes no produce efecto sobre la respuesta mediada por anticuerpos (Finch y Turner 1986; Blodgett y col 1986; McDonald y col 1989; Nicholson y col 1993). No obstante, bajo distintas condiciones experimentales, también se ha señalado que la deficiencia de Se en terneros en algunos casos no afecta (Reffet y col 1986) y en otros disminuye la respuesta inmune humoral (Reffet y col 1988).

La mayoría de los estudios realizados, tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar el efecto del Se sobre la inmunidad celular, se basan en el efecto de la suplementación con Se o la deficiencia de este mineral, generalmente midiendo la reacción a mitógenos o la producción de linfocinas (Finch y Turner 1996). Las distintas condiciones experimentales en que se realizaron estos estudios hacen que los resultados se presenten contradictorios y difícilmente comparables. Por una parte, se señala que la suplementación con Se no influye en la respuesta celular (Segerson y Spears 1985; Blodgett y col 1986; Turner y col 1985), que la suplementación mejora esta respuesta (Turner y col 1985; Stabel y col 1990) y también la disminuye (Larsen y col 1988b). Por otra parte, otros estudios señalan que la deficiencia de Se no afecta la inmunidad celular (Aziz y Klesius 1985; Wuryastuti y col 1993) y otros señalan que la disminuye (Turner y col 1984). En nuestro estudio, llama la atención el efecto negativo de la suplementación con Se so-

bre la respuesta inmune celular, medida a través de la reacción dérmica. Esta observación es de particular importancia, ya que la respuesta celular es responsable de la protección contra la infección natural por *Brucella abortus* (Oliveira y col 2002; Wyckoff 2002). Con relación a este paradójico efecto, en rumiantes se ha visto que bajas dosis de Se son efectivas para aumentar las respuestas linfocíticas *in vitro*, pero altas dosis del mismo inhiben estas respuestas e incluso pueden tener un efecto tóxico sobre las células (Finch y Turner 1989; Stabel y col 1990). Esto podría explicar en parte los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que la suplementación con Se se efectuó en animales con un balance normal del mineral.

La asociación entre la deficiencia de Se y diversas patologías se encuentra bien establecida y ampliamente documentada (López-Alonso y col 1997). Sin embargo, los efectos sobre la inmunidad son más difíciles de correlacionar e interpretar. Aun así, de acuerdo a la discusión previa es posible plantear como hipótesis que un exceso en el aporte de Se o una dosis adecuada administrada en animales con un balance normal de Se, podría afectar negativamente los mecanismos reguladores de la respuesta inmune celular. Resolver esta hipótesis es de importancia relevante en los animales domésticos, ya que la suplementación normalmente se realiza asociada a esquemas de vacunación, particularmente el usado para el control de la brucelosis bovina. Además, esta respuesta juega un rol significativo en la defensa contra la infección natural por patógenos intracelulares.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la suplementación con Se en vaquillas en pastoreo y con niveles adecuados de este mineral en el organismo, no afecta la respuesta inmune humoral al toxoide tetánico ni a la vacuna RB51, sin embargo, disminuye la respuesta inmune celular a la vacuna RB51. Debido a las implicaciones clínicas que podría tener este hecho, es aconsejable realizar nuevos estudios orientados a determinar el rango en el cual el aporte de Se modula la respuesta inmune.

## RESUMEN

El trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto de una suplementación con selenio (Se) sobre la respuesta inmune a las vacunas Toxoide tetánico y *Brucella abortus* cepa RB51 en vaquillas con un adecuado balance metabólico de selenio (GSH-Px >130 U/g Hb). Para ello se empearon 32 vaquillas Friesian de 18 a 24 meses de edad, asignadas al azar a dos grupos de 16 animales; uno suplementado (Se-S) el día 0 con una dosis de selenato de bario (1 mg Se/kg, s.c.), permaneciendo el otro como control no suplementado (No-S). Todas las vaquillas fueron mantenidas durante 9 meses (abril a enero) a pastoreo sobre una pradera naturalizada con un contenido de Se de 0,04 ppm/MS.

Los animales fueron inmunizados con vacuna RB51 el día 60 y posteriormente con Toxoide tetánico los días 120 y 150.

Muestras de sangre fueron obtenidas previo a la suplementación y cada 15 días hasta el término del experimento. El balance metabólico de selenio fue evaluado mediante la actividad sanguínea de Glutatión peroxidasa (GSH-Px). La respuesta inmune humoral se evaluó determinando los anticuerpos séricos específicos para ambos antígenos mediante ELISA y la respuesta inmune celular mediante pruebas de intradermorreacción a antígenos de *Brucella abortus*.

La administración de Se aumentó ( $P < 0,05$ ) la actividad de GSH-Px, alcanzando valores entre 339 a 579 U/g Hb durante el período de estudio de la respuesta inmune. La respuesta humoral a la vacuna RB51 y al toxoide tetánico fue similar ( $P > 0,05$ ) en ambos grupos experimentales, mientras que la respuesta celular a la vacuna RB51 fue menor ( $P < 0,05$ ) en el grupo Se-S.

Los resultados permiten concluir que la suplementación con Se en vaquillas con un adecuado balance nutricional de Se y en condiciones de campo, no afecta la respuesta inmune humoral a la vacuna RB51 ni al toxoide tetánico; sin embargo, disminuye la respuesta inmune celular a la vacuna RB51.

## REFERENCIAS

- Aziz CS, PH. Klesius. 1985. Effect of selenium deficiency in goats on lymphocyte production of leukocyte migration inhibition factor. *Vet Immunol Immunopathol* 10, 381-390.
- Blodgett DJ, GG Shuri, ET Kornega. 1986. Immunomodulation in weaning swine with dietary selenium. *Am J Vet Res* 47: 1517-1519.
- Castillo C, JL Benedito, M López-Alonso, M Miranda, J Hernández 2001. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: su relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch Med Vet* 23, 5-20.
- Ceballos A, F Wittwer. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 28 (2), 5-18.
- Ceballos A, F Wittwer, PA Contreras, H Bohmwald. 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch Med Vet* 30, 13-22.
- Finch JM, RJ Turner. 1986. Selenium supplementation in lambs: effects on antibody responses to a salmonella vaccine. *Vet Rec* 119, 430-431.
- Finch JM, RJ Turner. 1989. Enhancement of ovine lymphocyte responses: a comparison of selenium and vitamin E supplementation. *Vet Immunol Immunopathol* 23, 245-256.
- Finch JM, RJ Turner. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Res Vet Sci* 60, 97-106.
- Larsen HJ, Moksnes K, Overnes G. 1988a. Influence of selenium on antibody production in sheep. *Res Vet Sci* 45: 4-10.
- Larsen HJ, G Overnes, K Moksnes. 1988b. Influence of selenium on sheep lymphocyte responses to mitogens. *Res Vet Sci* 45, 11-15.
- López-Alonso M, M Miranda, J Hernández, C Castillo, JL Benedito. 1997. Glutatión peroxidasa en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch Med Vet* 29(2), 171-179.
- Lee J, DG Masters, CL White, ND Grace, GJ Judson. 1999. Current issues in trace element nutrition of grazing livestock in Australia and New Zealand. *Aust J Agric Res* 50, 1341-1364.

- McDonald JW, DJ Overend, DI Paynter. 1989. Influence of selenium status in merino weaners on resistance to trichostrongylid infection. *Res Vet Sci* 47, 319-322.
- Nemec M, M Hidroglu, K Nielsen, J Prolux. 1990. Effect of vitamin E and selenium supplementation on some immune parameters following vaccination against brucellosis in cattle. *J Anim Sci* 68, 4303-4309.
- Nicholson JWG, RS Bush, JG Allen. 1993. Antibody responses of growing beef cattle fed silage diets with and without selenium supplementation. *Can J Anim Sci* 73, 355-365.
- NRC, National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7<sup>th</sup> ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Oliveira SC, N Soeurt, G Splitter. 2002. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 90, 417-24.
- Reffet JK, JW Spears, JW Hatch, TT Brown. 1986. Influence of selenium and zinc on performance, blood constituents, and immune response in stressed calves. *Biol Trace Elem Res* 9, 139-149.
- Reffet JK, JW Spears, TT Brown. 1988. Effect of dietary selenium on the primary and secondary response in calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Nutr* 118, 229-235.
- Segerson EC, JW Spears. 1985. Selenium status and phytohaemagglutinin-stimulated T lymphocytes from beef calves. *Biol Trace Elem Res* 8, 173-180.
- Stowe HD, TH Herdt. 1992. Clinical assessment of selenium status of livestock. *J Anim Sci* 70, 3928-3933.
- Stabel JR, BJ Nonnecke, TA Reinhardt. 1990. Effect of *in vitro* selenium supplementation on bovine lymphocytes proliferation. *Nutr Res* 10, 1053-1059.
- Swecker W. 1997. Selenium and immune function in cattle. *Comp Cont. Ed Pract Vet* October, 248-254.
- Turner R.J, LE Wheatly, NFG Beck. 1984. Impaired mitogen responses in lambs with white muscle disease. *Res Vet Sci* 37, 357-358.
- Turner RJ, Wheatly LE, Beck NFG. 1985. Stimulatory effects of selenium on mitogen responses in lambs. *Vet Immunol Immunopathol* 8, 119-124.
- Underwood EJ, NF Suttle. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3<sup>rd</sup> ed. Pp 343-373. CAB International, Wallingford, Oxford, UK.
- Wittwer F, O Araya, P. Contreras. 2002. Strategic procedure for important herd problems of heifers. In: *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine*. Edited by: Kaske M., Scholz, H., Höltershinken. Keynote Lectures, XXII World Buiatric Congress. Hannover, Germany.
- Wuryastuti H, HD Stowe, RW Bull, ER Miller. 1993. Effects of vitamin E and selenium on immune response of peripheral blood, and milk leukocytes of sows. *J Anim Sci* 71, 2464-2472.
- Wyckoff JH. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 90(1-4), 395-415.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. Prentice Hall. New Jersey. USA.