



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFICACIA DE UNA VACUNA SUBUNITARIA POLIVALENTE
CONTRA MASTITIS CAUSADA POR *ESCHERICHIA COLI*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y *STREPTOCOCCUS UBERIS* EN
VACAS LECHERAS DE LA ZONA CENTRAL**

Maite Mirentxu Díaz Arteta

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: MARIO LUCIANO DUCHENS ARANCIBIA
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Financiamiento: FONDEF IT15110006

SANTIAGO, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFICACIA DE UNA VACUNA SUBUNITARIA POLIVALENTE
CONTRA MASTITIS CAUSADA POR *ESCHERICHIA COLI*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y *STREPTOCOCCUS UBERIS* EN
VACAS LECHERAS DE LA ZONA CENTRAL**

Maite Mirentxu Díaz Arteta

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

Nota Final:

Firma

Profesor Guía: Mario Duchens Arancibia

Profesor Corrector: Patricio Perez Melendez

Profesor Corrector: Leonardo Sáenz Iturriaga

SANTIAGO, CHILE
2019

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta memoria a todos quienes acompañaron y apoyaron mi proceso de aprendizaje y crecimiento, tanto educacional como emocional. A quienes me dieron un consejo, una palabra de aliento o simplemente con quienes compartí una risa.

Agradezco a mi familia por darme herramientas para enfrentar la vida, preocupándose de que pudiera optar a un título profesional. Pero no cualquier profesión, sino una que me llenara el corazón. Por sobre todo les agradezco por haberme entregado valores y principios. A mi madre le agradezco por enseñarme a seguir con una sonrisa, hasta poder conseguir mis objetivos, así sea muy difícil, gracias por enseñarme a no rendirme. A mi Tata por enseñarme que todo lo que uno se propone es posible, que a veces el camino será más liviano y otras veces costara más, pero finalmente siempre es posible lograrlo. A mi tía por estar incondicionalmente.

Al Dr. Duchens le agradezco la oportunidad que me brindó, por guiarme, responder mis constantes dudas, compartir sus conocimientos y tiempo. Porque a pesar de los obstáculos e imprevistos en el camino siempre estuvo dispuesto a encontrar una solución para que pudiéramos seguir trabajando juntos.

A mis profesores correctores Dr. Saenz y Dr. Perez, por siempre estar dispuestos a responder mis dudas y guiarme en esta memoria de título. De igual forma agradecer a la Dra. Valeria Rojas, por su disposición y apoyo en la parte estadística. También, a la señora Norma San Martín, quien me guio y apoyo en la parte administrativa de mi memoria.

Quisiera agradecer al Dr. Nuñez quien creyó en mis capacidades y depositó plenamente su confianza en mí, para poder desarrollarme como ayudante en el área de rumiantes, en el Departamento de Ciencias Clínicas.

Finalmente, gracias a mis amigas/os por estar presentes en este arduo proceso. En especial a Viviana Bugeño y Andrea Valdés, por compartir entre risas esos largos días en la Universidad, por los consejos y los momentos de dispersión.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Protocolo experimental	11
Variables productivas sanitarias	11
Procesamiento de datos y análisis de la información	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Incidencia de mastitis	15
Duración de los casos de mastitis clínica	17
Producción de leche acumulada	18
Recuento de células somáticas	23
Agente causal de los casos de mastitis clínica	26
Animales eliminados por mastitis clínica	28
DISCUSIÓN GENERAL	29
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

La mastitis es la enfermedad más costosa en el rebaño lechero, esto dada su alta incidencia, la disminución que genera en la producción láctea, el costo de los tratamientos y el aumento en la tasa de eliminación. Para la prevención se plantean como medidas; un adecuado manejo ambiental, una correcta rutina de ordeña y mantención del equipo, y buen manejo en el periodo de transición. Además, y complementaria a lo anterior se plantea la vacunación.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia de una vacuna subunitaria polivalente contra mastitis causada por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis*, en vacas Holstein de alta producción a través de indicadores de salud mamaria, calidad de la leche y niveles productivos. El estudio se realizó en una lechería ubicada en la provincia de Melipilla, Región Metropolitana, utilizándose 240 animales, divididos en 4 grupos, de los cuales 3 recibieron una vacuna subunitaria polivalente de diferentes líneas productivas y un cuarto grupo recibió un placebo. La selección y distribución de los animales se realizó semanal y aleatoriamente. Se aplicaron 3 dosis, la primera en los días 39-45 previo a la fecha estimada del parto, la segunda dosis en los días 13-19 previo a la fecha estimada de parto, mientras que la tercera dosis se aplicó a los 40-46 días posterior al parto.

Se recopiló información desde el programa DairyComp 305, de informes mensuales realizados por Cooprinsem y VetPoint. El análisis estadístico de las variables incidencia, agente causal y la proporción de animales muertos o eliminados por mastitis clínica se realizó mediante pruebas de chi-cuadrado. La duración de los casos y la producción de leche se evaluaron a través de análisis de varianza. El recuento de células somáticas se analizó a través de análisis de varianza para medidas repetidas. Se realizaron los análisis comparando los 4 grupos entre sí, y posteriormente se comparó el grupo placebo versus los 3 grupos tratados.

Las incidencias de mastitis clínica no fueron estadísticamente diferentes entre los cuatro grupos. Tampoco existió diferencia entre el grupo placebo y los 3 grupos tratados, observándose una tendencia ($p=0,21$) a una menor incidencia en los grupos vacunados (3,1%) que en el grupo placebo (4,4%). La severidad no se logró evaluar. La duración de los casos de mastitis clínica en los cuatro grupos no fue diferente ($p=0,56$). Al comparar el grupo placebo ($5,44 \pm 1,4$ días) y los grupos tratados ($5,46 \pm 0,8$ días) tampoco hubo diferencias ($p=0,46$). La producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia no fue diferente entre

grupos ($p=0,71$), observándose una tendencia a una mayor producción por parte del grupo placebo (4457 Lts.) por sobre los grupos tratados (4784 Lts.). El score de células somáticas de los animales vacunados tendió a ser menor ($p=0,06$) al del grupo placebo. El agente causal de los casos de mastitis clínica se analizó de forma descriptiva. Se registraron dos animales muertos o eliminados por causa de mastitis clínica, ambos de grupos tratados.

Se plantea que dado el bajo desafío sanitario presente en el campo la vacuna no mostró una ventaja significativa en las variables estudiadas. Sin embargo, se observó que en vacas inmunizadas disminuyó el nivel de infección, el recuento de células somáticas y aumentó la producción de leche, observándose el mayor efecto en vacas con mayor número de lactancia, que son las que tienen un nivel más alto de desafío y una mayor producción de leche.

En conclusión, la vacuna subunitaria polivalente no mostró un nivel de protección estadísticamente significativa bajo las condiciones descritas en este estudio respecto a las variables analizadas, pero se observó tendencia a un mejor efecto en vacas de mayor edad.

Palabras claves: vacuna subunitaria polivalente, salud mamaria, mastitis clínica.

ABSTRACT

Mastitis is the most expensive disease in the dairy herd, given the decrease it generates in milk production, the cost of treatments and the increase in the culling rate. For prevention the proposed measures are; adequate environmental management, proper milking routine and maintenance of the equipment, and good management during the transition period. In addition, and complementary to the above, vaccination is proposed. This study aims to evaluate the efficacy of a polyvalent subunit vaccine against mastitis caused by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*, in high-yielding Holstein cows through indicators of udder health, milk quality and milk production. The study was carried out in a dairy located in the province of Melipilla, Metropolitan Region, using 240 animals, divided into 4 groups, of which 3 received a polyvalent subunit vaccine from different production lines and a fourth group received a placebo. The selection and distribution of the animals was done weekly and randomly. Three doses were applied, the first one on days 39-45 prior to the estimated calving date, the second dose on days 13-19 before the estimated calving date, while the third dose was applied at 40-46 days calving.

Information was collected from the DairyComp 305 program, and from monthly reports made by Cooprinsem and VetPoint. The statistical analysis of the variables incidence, causative agent and the proportion of animals dead or culled by clinical mastitis was performed using chi-square tests. The duration of cases and milk production were evaluated through analysis of variance. The somatic cell count was analyzed through analysis of variance for repeated measures. The analyzes were performed comparing the 4 groups with each other, and then the placebo group was compared against the 3 treated groups.

The incidences of clinical mastitis were not statistically different between the four groups. There was also no difference between the placebo group and the 3 treated groups, with a trend ($p = 0.21$) showing a lower incidence in the vaccinated groups (3.1%) than in the placebo group (4.4%). Severity could not be assessed. The duration of cases of clinical mastitis in the four groups was not different ($p = 0.56$). When comparing the placebo group (5.44 ± 1.4 days) and the treated groups (5.46 ± 0.8 days) there were also no differences ($p = 0.46$). Cumulative milk production at 100 days of lactation was not different between groups ($p = 0.71$), showing a tendency to higher production in the placebo group (4457 Lts.)

compared to the treated groups (4784 Lts.) The somatic cell score of vaccinated animals tended to be lower ($p = 0.06$) than the placebo group. The causative agent of clinical mastitis cases was analyzed descriptively. Two dead or culled animals were registered due to clinical mastitis, both from treated groups.

It is proposed that given the low sanitary challenge present in the field, the vaccine did not show a significant advantage in the variables studied. However, it is detected that in immunized cows the level of infection, somatic cell count and milk production decreased, observing the greatest effect in cows with the highest number of lactation, which are those that have a higher level of challenge and higher milk production.

In conclusion, the polyvalent subunit vaccine does not show a statistically significant level of protection under the conditions described in this study with respect to the variables analyzed, but the tendency to a better effect in older cows is determined.

Keywords: polyvalent subunit vaccine, dug health, clinical mastitis.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas económicos en los sistemas de producción lecheros es la mastitis bovina, enfermedad definida como la inflamación de la glándula mamaria, que afecta tanto la composición como la cantidad de leche producida (Zhao y Lacasse, 2008). Con el fin de disminuir los importantes costos económicos es que se busca la prevención mediante diversas estrategias; entre ellos se encuentran manejos ambientales, de bienestar animal, manejos en la rutina de ordeña y manejos inmunitarios.

La mastitis se clasifica en ambiental y contagiosa. Dentro de los agentes causales de mastitis ambiental se encuentran *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*. Por otro lado, *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causantes de mastitis contagiosa (Pacha, 2015).

Las estrategias de prevención utilizadas buscan disminuir la exposición del pezón a los agentes. Se destacan por una parte el manejo ambiental de camas y corrales, correcta rutina de ordeña con una adecuada capacitación al ordeñador, y por otra parte la inmunización del animal.

En la actualidad existen vacunas en el mercado. La única disponible en Chile es la vacuna J5 (Enviracor®, Zoetis Inc.) que está formulada a base de una cepa rugosa de *Escherichia coli* O111:B. Recientemente se ha desarrollado una vacuna subunitaria altamente inmunogénica, a base de nanovesículas de fragmentos bacterianos, de pared y membrana celular y liposomas de *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Sáenz y Lapierre, 2014). Permite utilizar todos los antígenos de superficie bacteriana y proteínas de membrana, peptidoglicanos, ADN, entre otros elementos moleculares intracelulares que potencian significativamente la respuesta inmune. La formulación utilizada permite obtener antígenos intactos, lo que permitiría mejorar la efectividad y duración de la respuesta inmune en el animal.

Considerando que solo existen estudios preliminares respecto a esta vacuna subunitaria, es que se propone realizar un estudio de campo considerando variables sanitarias y productivas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La mastitis se encuentra dentro de las enfermedades más prevalentes en vacas lecheras, considerada como una de las patologías más costosas que afecta mundialmente a los rebaños. Ocasiona importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción láctea, además del costo monetario que implica el tratamiento de la enfermedad y eventualmente el aumento de la eliminación de animales (Wellenberg *et al.*, 2002). Estudios en lecherías de alto rendimiento en EE.UU han determinado que el costo promedio fue de USD 179 por cada caso de mastitis clínica (Bar *et al.*, 2008). En Chile, para la zona central, se determinó que la prevalencia de mastitis fue de un 88,49% presentando un 81,1% mastitis subclínica y un 7,39% mastitis clínica. Por otro lado, se estimó que la incidencia anual de mastitis clínica en la Región Metropolitana fue de un 48,7% anual (Azócar, 2001).

Se produce mastitis cuando ingresan bacterias patógenas al canal del pezón. Se define mastitis como la inflamación del epitelio glandular producido principalmente por bacterias que ingresan por el conducto del pezón, invaden y proliferan en dicho tejido desencadenando una reacción inflamatoria lo que implica un aumento en las células somáticas, principalmente polimorfonucleares neutrófilos. Esta inflamación se ve reflejada en la alteración de la cantidad y composición láctea pudiendo afectar uno o más cuartos (Zhao y Lacasse, 2008).

Se han definido diferentes grados de severidad de la mastitis clínica, lo que ayuda a tomar una decisión en cuanto al tratamiento para cada uno de estos grados. La severidad se asigna según signos de inflamación local de la ubre, firmeza, hinchazón y dolor del cuarto afectado además de las características de la secreción láctea y el compromiso sistémico que pueda presentar el animal, tales como fiebre, deshidratación y la actitud basada en signos de depresión (Roberson, 2012).

En relación con la causa, las mastitis se clasifican como de origen ambiental y de origen contagioso. Dentro de los patógenos que producen mastitis hay bacterias de origen intestinal como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* (Oliver y Murinda, 2012) y su principal fuente de infección es ambiental. Por otro lado, en las mastitis de origen contagioso la glándula mamaria es la principal fuente de infección. En estos casos los principales agentes son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp* (Zhao y Lacasse, 2008). En Chile el principal agente causante de mastitis

es el patógeno ambiental *E. coli*. Se ha observado en la región de Valparaíso y en la región Metropolitana un predominio de bacterias gran negativas (45,2%), principalmente *E. coli* (40,8%) (San Martín *et al.*, 2002).

Entre los factores que predisponen a la presentación de mastitis se encuentra el periodo de transición fisiológica en donde el ganado lechero es más susceptible a sufrir enfermedades infecciosas y metabólicas, definido como los últimos días de gestación hasta el inicio de la lactancia. En este periodo ocurren cambios fisiológicos y metabólicos que impactan en gran medida el balance energético y la función inmunológica del animal (Raphael y Sordillo, 2013). Otro de los periodos críticos son el fin de la lactancia y el inicio del periodo seco.

En el periodo de transición ocurre un aumento repentino de los requerimientos nutricionales para la producción láctea en un momento en que la ingesta de materia seca es baja. Como consecuencia de esto, se produce la movilización de reservas corporales. Por lo tanto, las vacas entran en un estado de equilibrio energético negativo (Grummer *et al.*, 2004; Ingvarlsen, 2006). La movilización intensa de lípidos de las reservas de tejidos da como resultado una liberación significativa de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en la corriente sanguínea. Mientras que estos ácidos grasos son fuentes importantes de energía durante los tiempos de mayores demandas metabólicas, las concentraciones elevadas de NEFA alteran varias funciones inmunitarias e inflamatorias (Contreras y Sordillo, 2011). Adicionalmente, los cambios endocrinos asociados al parto y el estrés metabólico relacionado con la lactogénesis incrementan el deterioro en la respuesta inmune (Kimura *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2014), Esto podría deberse por una parte a la disminución brusca de progesterona plasmática y por otro lado al aumento transitorio de estrógenos y glucocorticoides al momento del parto (Ingvarlsen, 2006).

Para la ocurrencia de mastitis clínica debe haber proliferación y transgresión de bacterias a través del canal del pezón hacia la glándula mamaria. Por ello, la principal medida de control de la mastitis es la prevención. Dentro de las medidas propuestas, una de las más importantes es el manejo ambiental, con el objetivo de disminuir el contacto de bacterias con el pezón (Hogan y Smith, 2012).

Entre de los manejos recomendados para evitar la presentación de mastitis se considera por un lado el manejo ambiental asegurando un ambiente limpio, lugar seco y confortable para el animal. Uno de los puntos clave es el material de las camas donde se debe utilizar un material inorgánico, ya que presenta baja humedad y bajos sustratos para la proliferación bacteriana (Hogan y Smith, 2012). Otro punto imprescindible es una correcta rutina de ordeño incluyendo la mantención y uso apropiado del equipo de ordeño (NMC, s.f). Por otro lado, otra de las medidas de manejo va enfocada a incrementar la resistencia del animal frente a la infección; esto se logra mediante manejos alimentarios que buscan aumentar la ingesta de materia seca para así disminuir al mínimo posible el balance energético negativo y obtener una correcta función inmunológica (Erskine, 2012).

Por otra parte, dentro de las estrategias de prevención de mastitis se encuentra la vacunación. En la actualidad la vacuna más utilizada para la prevención de mastitis es una bacterina de *Escherichia coli* de la cepa mutante J5 (Enviracor®; Zoetis Inc), por tanto, está enfocada a mastitis por coliformes. También existe la vacuna Startvac® (Hipra, S.A.) que es una vacuna inactivada polivalente que contiene *Escherichia coli* (J5) y *Staphylococcus aureus* (CP8) cepa SP 140, y provee inmunidad desde 13 días posterior a la primera dosis hasta aproximadamente 78 días después de la tercera dosis (Hipra, S.A.). Dicha vacuna ha demostrado aumentar la concentración de anticuerpos específicos y disminuir la caída en la producción láctea y el recuento de células somáticas luego de su inoculación (Piepers *et al.*, 2017).

Las vacunas actuales contra mastitis en el mercado son inactivadas, por tanto, en el proceso de inactivación mediante agentes químicos o físicos se altera el antígeno proteico. Esto supone una alteración en la presentación antigénica y consecuentemente redonda en una menor respuesta inmunológica (Sáenz y Lapierre, 2014). Por otra parte, las vacunas subunitarias utilizan partículas purificadas no infectantes, pudiendo seleccionar proteínas únicas con alta capacidad antigénica que estimulan más específicamente al sistema inmune, generando así una respuesta más específica, como el caso de la selección de los pilis enterotoxigénicos de *E. coli*. (Francis, 1993), otros estudios indican la alta efectividad en la

inducción de anticuerpos neutralizantes por parte de vacunas subunitarias contra el virus de la leucemia felina. Así, la vacuna Leukocel-2® es una vacuna subunitaria que contiene antígenos virales de cierta línea linfoide, los que estimulan la producción de anticuerpos específicos. (Berríos, 2001; Zoetis Inc). Por otra parte, vacunas virales subunitarias son utilizadas en la población humana como vacunas contra la influenza y hepatitis B siendo incluso de uso obligatorio para la población inmuno comprometida (MINSAL, 2010).

Recientemente se ha desarrollado una vacuna contra mastitis altamente inmunogénica. Esta vacuna es en base a vesículas de fragmentos de pared y membrana bacteriana, liposomas originados de la membrana celular de los patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*, además de otros elementos como proteínas de membrana, lipopolisacáridos, peptidoglicano y ADN, entre otros. Esta vacuna subunitaria polivalente contiene antígenos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*. Dicha formulación y técnica genera una mayor respuesta inmune, ya que tiene una mejor presentación antigénica debido a que las proteínas antigénicas no se desnaturalizan. Esto produce una respuesta inmune de mayor intensidad y duración. Además de generar inmunoglobulinas altamente específicas, esta vacuna tiene la capacidad de estimular la inmunidad local en mucosas, protegiendo así al animal por la vía de ingreso de patógenos más común, y en el caso de la mastitis, la principal. Esta vacuna ha sido evaluada preliminarmente en un total de 30 vacas, primíparas y multíparas, donde la mitad de ellas fue inmunizada y al resto se le administro un placebo. Se observó una reducción en el recuento de células somáticas en la leche, además un aumento en los títulos de anticuerpos específicos (IgG) contra antígenos de interés 30 días post inmunización y una reducción en la presentación de mastitis de un 40 % en vacas primíparas y 14% en vacas multíparas respecto a hembras no vacunadas (Sáenz y Lapierre, 2014).

Considerando los resultados de este ensayo preliminar, se realizó un estudio de campo con la misma vacuna involucrando un mayor número de animales y considerando variables sanitarias y productivas.

HIPÓTESIS

La vacuna polivalente subunitaria contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* es eficaz en la prevención de la presentación de mastitis en vacas lecheras

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de una vacuna subunitaria contra mastitis causada por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* en vacas lecheras confinadas de la zona central, a través del estado de la salud mamaria, producción de leche e índices de sanidad de la misma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de utilizar una vacuna polivalente sobre la incidencia, duración y severidad de los casos de mastitis clínica en vacas lecheras.
2. Evaluar el efecto de vacunar con una vacuna subunitaria polivalente sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas en vacas lecheras.
3. Evaluar el efecto del uso de una vacuna subunitaria polivalente contra mastitis sobre el agente causal de mastitis en vacas lecheras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en una lechería ubicada en la comuna de Melipilla, región Metropolitana. El plantel cuenta con 450 vacas totales de las cuales 380 están en ordeña con un promedio de producción de 42 Lt/vaca/día y 3 ordeñas diarias. Las vacas están alojadas en corrales techados con piso de cemento y con cubículos individuales con cama de arena.

Protocolo experimental

Se utilizó un total de 240 hembras las cuales fueron seleccionadas semanalmente a medida que cumplían entre 39 y 45 días antes de la fecha estimada de parto hasta completar la cantidad de ejemplares requeridos. Los animales se asignaron semanalmente a uno de cuatro grupos hasta completar aproximadamente 60 vacas por grupo. Las vacas fueron vacunadas en 3 ocasiones, la primera dosis fue ingresando al estudio, es decir entre los días 39-45 previo a la fecha estimada de parto, la segunda dosis se aplicó entre los días 13-19 previo a la fecha estimada de parto y la tercera dosis se aplicó entre los días 40-46 después del parto. A cada grupo se les administró aleatoriamente 2 mL vía subcutánea de uno de los cuatro tratamientos. Tres de los grupos recibieron la vacuna subunitaria proveniente de tres lotes diferentes, mientras que un grupo fue el grupo control, cuyas vacas recibieron 2 mL de una solución placebo. Los frascos son iguales, numerados del 1 al 4, donde el operador no tuvo conocimiento de su contenido.

Variables productivas sanitarias

La producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia se obtuvo desde los registros del programa DairyComp 305 (Valley Agricultural Software; Tulare, CA, USA). El recuento de células somáticas se obtuvo desde el control lechero oficial de COOPRINSEM. Además, se recopiló la información relevante hasta los 180 días de lactancia.

Iniciado el estudio, al momento del secado se tomó una muestra de leche de los cuatro cuartos, la que fue enviada a laboratorio (VetPoint, Santiago) con el objetivo de determinar la existencia de infección intramamaria antes de la vacunación. Durante la lactancia, se examinaba la leche al inicio de la ordeña mediante la inspección de la leche para determinar la presencia de mastitis clínica. El grado de severidad de la mastitis se define de acuerdo con el protocolo propuesto por la International Dairy Federation (IDF, 1999) clasificándola como mastitis leve, moderada y severa. El tratamiento se realiza de acuerdo con un protocolo

previamente elaborado. Antes de tratar se toma una muestra de leche para análisis microbiológico.

Procesamiento de datos y análisis de la información

Los resultados microbiológicos de las muestras de leche tomadas al iniciado del estudio se relacionaron con los resultados de los cultivos microbiológicos realizados a las muestras de leche obtenidas de vacas que presentaron mastitis clínica durante el estudio.

Adicionalmente, se calculó la incidencia de casos clínicos de mastitis y por agente causal, incluyendo la severidad y duración de los casos. También se recopiló información sobre recuento de células somáticas, y el número de animales muertos o eliminados por mastitis. La información se analizó usando el programa estadístico IBM SPSS Statistics v.22

1. Para comparar la incidencia de mastitis clínica por grupo se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2).

2. La severidad de los casos de mastitis clínica se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Esta variable discreta se evaluó en cada grupo, los casos van a ser categorizados en leves, moderados y severos.

3. La duración de los casos de mastitis clínica y la producción de leche acumulada a los 100 días se analizó mediante análisis de varianza, considerando los efectos del tratamiento, número de lactancia y de las interacciones importantes entre las variables para lo cual se utilizó el siguiente modelo en el caso de la duración de los casos de mastitis clínica:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + L_j + (T*L)_{ij} + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} = Duración de los casos de mastitis clínica

T_i = El efecto del i-ésimo tratamiento

L_j = El efecto del j-ésimo número de lactancia (1, 2, ≥ 3)

$(T*L)_{ij}$ = El efecto de la interacción tratamiento por número de lactancia

e_{ij} = Error

Además de este modelo para la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + L_j + (T*L)_{ij} + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia.

T_i = El efecto del i-ésimo tratamiento

L_j = El efecto del j-ésimo número de lactancia (1, 2, ≥ 3)

$(T*L)_{ij}$ = El efecto de la interacción tratamiento por número de lactancia

e_{ij} = Error

4. El recuento de células somáticas (RCS) mensuales en leche fueron previamente convertidos a puntajes lineales (PCS) y en base a la siguiente fórmula (Dabdoub y Shook, 1984):

$$PCS = \log_2(RCS/100) + 3$$

Los PCS fueron analizados a través de un análisis de varianza para medidas repetidas. Se consideraron los efectos de tratamiento, número de lactancia, el número de control y de las interacciones importantes entre las variables. Lo anterior expresado en el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + V(T_i)_j + L_k + (T*L)_{ik} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Puntaje lineal de células somáticas

T_i = El efecto del i-ésimo tratamiento

$V(T_i)_j$ = Efecto de la j-ésima vaca anidada dentro de tratamiento

L_k = El efecto del k-ésimo número de lactancia

$(T*L)_{ij}$ = El efecto de la interacción tratamiento por número de lactancia

e_{ijk} = Error

5. Para evaluar el efecto de la vacuna sobre el agente causal de los cuadros de mastitis clínica, se realizó un cultivo bacteriológico y en base a los resultados de este fueron clasificados como patógenos ambientales y patógenos contagiosos. El análisis de esta variable discreta se hizo a través de la prueba de Chi cuadrado.

6. La proporción de animales muertos o eliminados en cada grupo por causa de mastitis clínica hasta el día 180 de lactancia fueron comparados a partir de una prueba de comparación de proporciones (χ^2).

Se analizaron los cuatro grupos de forma independientes, en donde el grupo 1 recibió un placebo y los restantes grupos recibieron 3 *batches* de la vacuna. Como resultado no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de las variables estudiadas. Dado lo anterior, se realizó un nuevo análisis agrupando los datos en un grupo vacunado (grupo 2, 3 y 4) y comparando este nuevo grupo con el grupo placebo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia de mastitis

El grupo control que recibió el placebo y contra el cual se realizaron las comparaciones, es el grupo 1.

La incidencia de mastitis clínica se muestra en la figura 1, donde los grupos que recibieron la vacuna subunitaria polivalente presentaron valores de incidencia de mastitis clínica muy similares entre ellos, que varían entre un 2,7% y un 3,3%. El grupo 1 (placebo), presentó una mayor incidencia de mastitis.

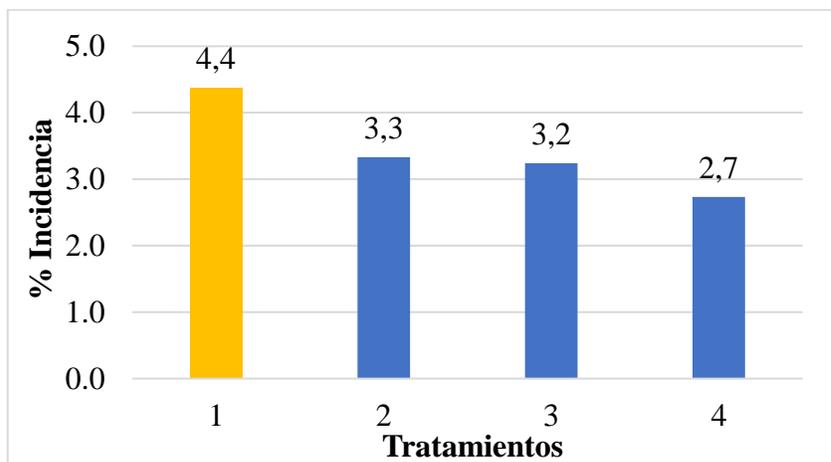


Figura 1. Incidencia mensual de casos de mastitis clínica por grupo de tratamiento durante 180 días, en vacas Holstein vacunadas contra mastitis clínica con 3 *batches* de la vacuna (grupos 2, 3, 4) y un grupo de vacas no tratadas (grupo 1).

Al comparar la incidencia de mastitis clínica de los grupos, no se observó que existiera una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. La mayor diferencia se presenta entre los grupos 1 y 4 ($p=0,19$), mientras que los grupos 2 y 3 presentan una menor diferencia ($p\geq 0,99$) (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de significancia (p) de la diferencia entre grupos al realizar la prueba de comparación de proporciones (χ^2) considerando la incidencia de mastitis clínica. Grupo 1; placebo, grupo 2, 3 y 4; tratados.

χ^2	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1	0,53	0,40	0,19
Grupo 2	----	$\geq 0,99$	0,65
Grupo 3	----	----	0,66

Al realizar la agrupación de los datos, se mantiene la tendencia a una menor incidencia de mastitis clínica en los grupos que recibieron el tratamiento versus el grupo placebo (Figura 2). Si bien no se observan diferencias significativas entre los grupos, el nivel de significancia disminuyó ($p=0,21$).

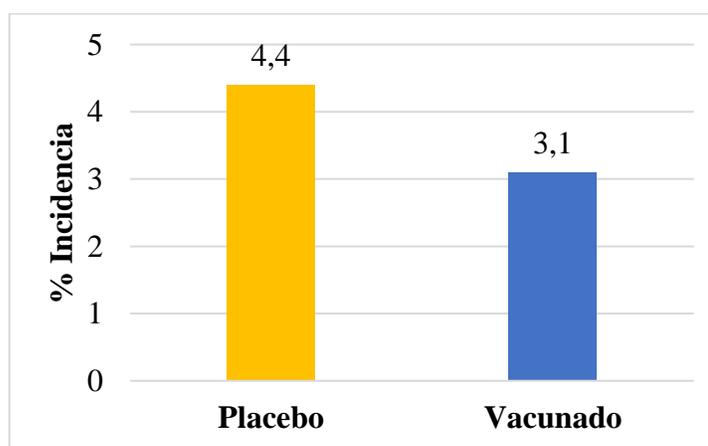


Figura 2. Incidencia mensual de casos de mastitis clínica por grupo de tratamiento durante 180 días, en un grupo de vacas Holstein no tratadas (placebo) y un grupo vacunado contra mastitis clínica agrupando datos de 3 lotes de vacas con 3 *batches* de la vacuna.

Esta tendencia a una menor incidencia de mastitis clínica en vacas vacunadas puede estar dada por una respuesta inmune temprana producida por la vacunación, generando una detección y respuesta precoz contra el patógeno y una respuesta más intensa frente a la infección (Erskine, 2012). Las vacas del grupo vacunado que presentaron colonización

bacteriana pudieron resolver la infección, ya que el sistema inmune de las vacas tratadas pudo responder de mejor manera y en un tiempo más corto, por lo tanto, no se alcanzaron a desarrollar dichas infecciones como para generar una mastitis clínica.

Duración de los casos de mastitis clínica

El promedio de duración de los casos de mastitis clínicas para los cuatro grupos fue de 5 a 6 días (Figura 3), no observándose diferencias significativas entre los grupos ($p=0,56$).

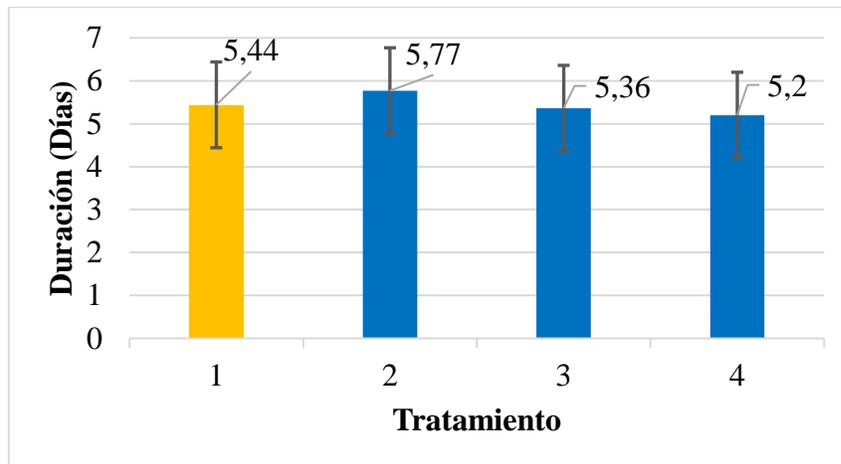


Figura 3. Promedio de la duración de los casos de mastitis clínica por grupo, en vacas Holstein vacunadas contra mastitis clínica con 3 *batches* de la vacuna (grupo 2, 3, 4) y un grupo de vacas no tratadas (grupo 1).

El análisis de varianza mostró que no existe un efecto significativo por parte de la variable grupo para la duración de los casos de mastitis clínica ($p=0,56$), tampoco se observó un efecto para la variable número de lactancia ($p=0,67$) ni para la interacción entre grupo y número de lactancia ($p=0,28$).

Al analizar los datos agrupados se observó un efecto similar. Se sigue observando que no existe un efecto de las fuentes de variación incluidas en el modelo sobre la variable estudiada (Tabla 2). En cuanto a la duración de los casos de mastitis clínica se observó un promedio de $5,44 \pm 1,4$ días para el grupo placebo y $5,46 \pm 0,8$ días para el grupo vacunado.

Tabla 2. Efecto de las fuentes de variación (grupo, número de lactancia e interacción entre ambos) incluidas en el modelo análisis de la varianza para la duración de los casos de mastitis. $R^2=0,07$.

Fuente de variación	P
Grupo	0,46
Número de lactancia	0,68
Grupo * número de lactancia	0,21

Los resultados obtenidos en relación con la duración de los casos de mastitis clínica son concordantes con lo descrito por Smith *et al.* (1999) quienes indican que al inocular convencionalmente con la bacterina *Escherichia coli* J5 no existe una diferencia significativa para la duración de los casos de mastitis clínica.

Producción de leche acumulada

El análisis de varianza mostró que no existe un efecto del grupo ($p=0,71$) ni de la interacción entre los efectos grupo y número de lactancia ($p=0,69$) sobre la producción de leche acumulada a los 100 días. Por otro lado, hay un efecto altamente significativo del número de lactancia sobre la variable ($p<0,01$) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las fuentes de variación (grupo, número de lactancia e interacción entre ambos) incluidas en el modelo de análisis de la varianza para la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia. $R^2=0,42$.

Fuente de variación	P
Grupo	0,71
Número de lactancia	<0,01
Grupo * número de lactancia	0,69

Estas mismas tendencias se observan al realizar el análisis con los datos agrupados, donde hay un efecto altamente significativo del número de lactancia ($p=0,01$). No hay un efecto significativo del grupo ($p=0,27$) ni tampoco de la interacción entre ambos efectos ($p=0,23$).

Si bien no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para la producción de leche, se observó una tendencia, por parte de los grupos tratados (grupo 2, 3 y 4), a una mayor producción, con una diferencia de aproximadamente 300 litros entre los grupos que recibieron la vacuna subunitaria polivalente y el placebo (Figura 4).

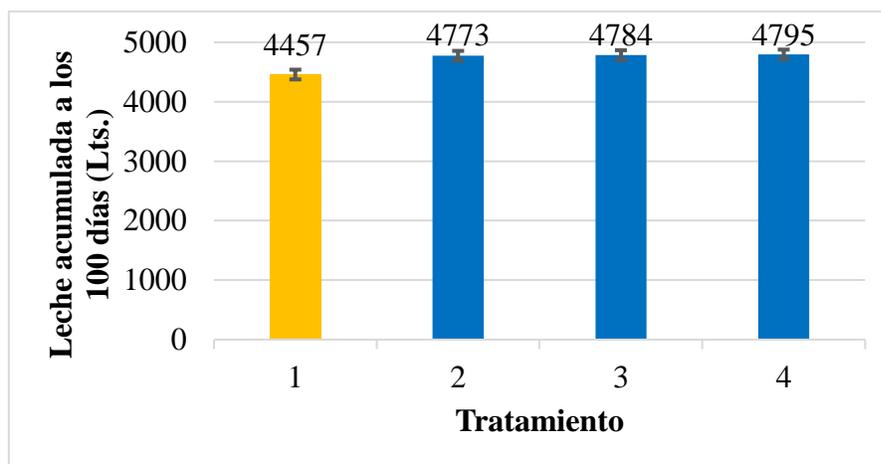


Figura 4. Promedio de la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia por grupo tratamiento, en vacas Holstein vacunadas contra mastitis clínica con 3 *batches* (grupo 2, 3, 4) y un grupo de vacas no tratadas (grupo 1).

Esta diferencia entre los grupos se amplía aún más al realizar el análisis con los datos agrupados (Figura 5), donde el nivel de significancia disminuye de un $p=0,71$ a un $p=0,27$, aun cuando la diferencia no es estadísticamente significativa.

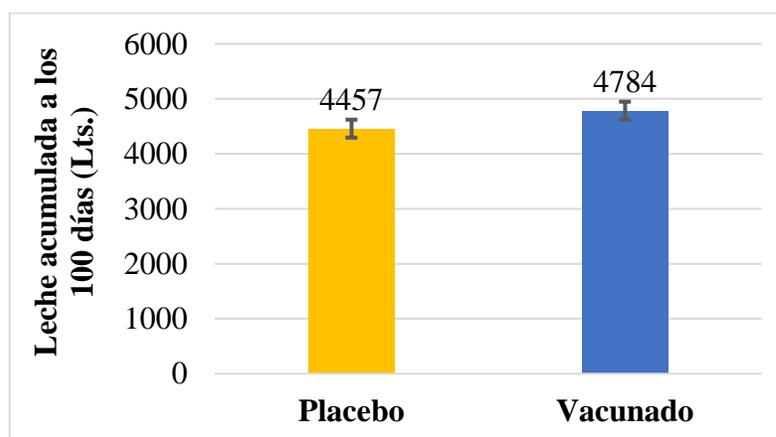


Figura 5. Promedio de la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia por grupo tratamiento, en un grupo de vacas Holstein no tratadas (placebo) y un grupo vacunado contra mastitis clínica agrupando datos de 3 lotes de vacas con 3 *batches* de la vacuna.

Al evaluar el efecto del número de lactancia se observa que a medida que aumenta el número de lactancia mayor es la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia. Además, existe diferencia estadística en la producción de leche entre vacas en su primera lactancia, vacas de segunda lactancia y vacas con tres o más lactancias (Figura 6).

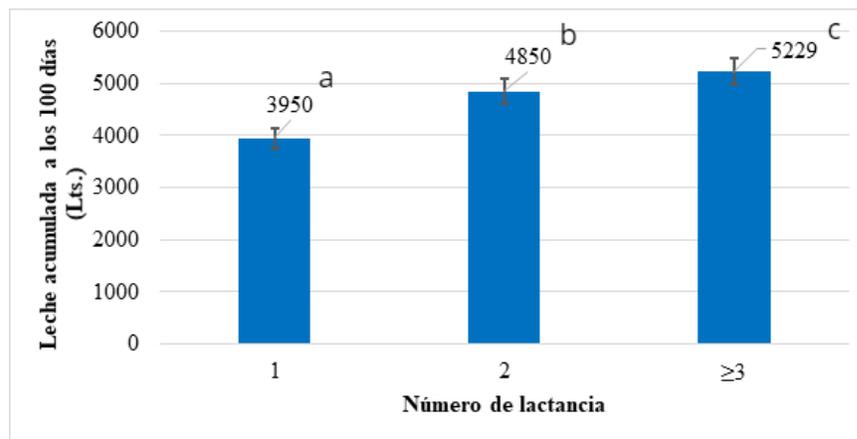


Figura 6. Promedio de la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia por número de lactancia, en vacas Holstein de los grupos vacunados contra mastitis clínica y el grupo no tratado. $P < 0,01$. *a, b, c: Promedios con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

En la figura 7 se muestra el efecto del grupo dentro del número de lactancia. Por una parte, se observa que a mayor número de lactancia mayor es la producción de leche acumulada a los 100 días. Además, existe una diferencia entre vacas que recibieron la vacuna subunitaria polivalente y el grupo placebo donde en general los grupos tratados presentaron una mayor producción. Si bien la diferencia entre los grupos para la producción de leche no es significativa ($p = 0,71$), ésta se observa más marcada desde la tercera o más lactancias.

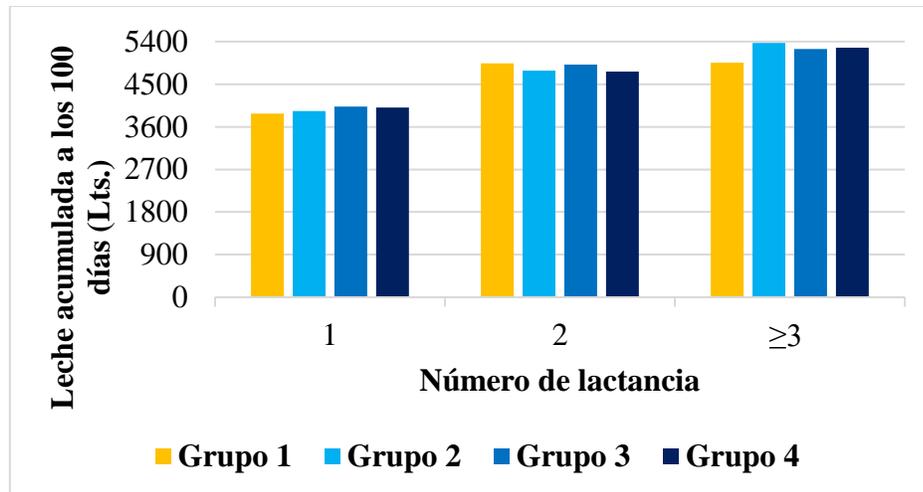


Figura 7. Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia por grupo y número de lactancia, en vacas Holstein vacunadas contra mastitis clínica con 3 *batches* de la vacuna (grupo 2, 3, 4) y un grupo de vacas no tratadas (grupo 1).

Esta misma tendencia se observa cuando se hace la agrupación de los datos, en donde se observa una mayor producción de leche acumulada a los 100 días en vacas vacunadas. De igual forma existe una diferencia significativa en la producción de leche de acuerdo con el número de lactancia ($p \leq 0,01$), donde se observa una diferencia entre vacas de primera lactancia y vacas de segunda o más lactancia (figura 8).

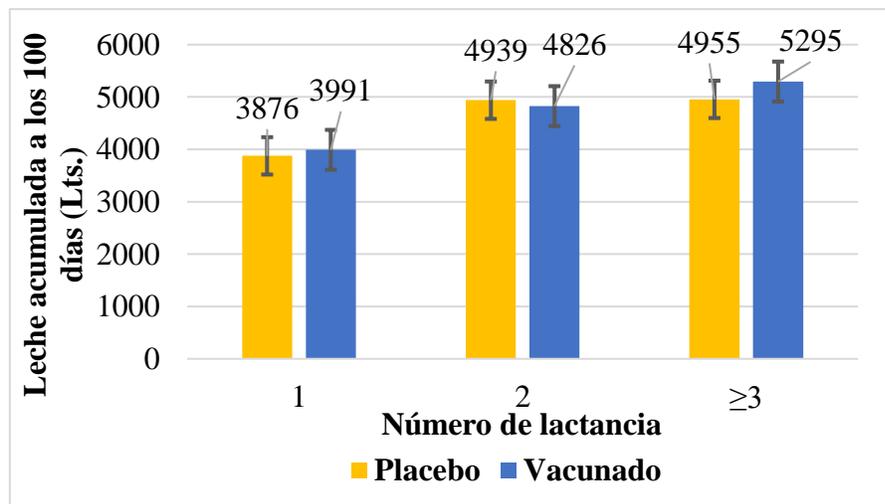


Figura 8. Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia por grupo y número de lactancia en un grupo de vacas Holstein no tratadas (placebo) y un grupo vacunado contra mastitis clínica agrupando datos de 3 lotes de vacas con 3 *batches* de la vacuna.

Se observa que dentro de cada número de lactancia existe una diferencia en los litros de leche producida entre los grupos. En la primera lactancia se observa una diferencia entre el grupo vacunado y el grupo placebo de un 2,9%. En la segunda lactancia existe una diferencia de 2,3 % entre los grupos. La mayor diferencia en cuanto a la producción de leche se obtuvo en la tercera lactancia, en donde se observa que el grupo que recibió la vacuna subunitaria polivalente produjo 6,4% más que vacas del grupo placebo, equivalente a 340 litros (Figura 8).

A diferencia de lo reportado en este ensayo para la producción de leche, la mayoría de los estudios citados muestran una mejor producción de leche en animales vacunados. Es así como un estudio realizado en Israel, muestra que existe una mayor producción de leche en animales vacunados con fragmentos de *Staphylococcus aureus* (Leitner *et al.*, 2003). Similarmente, estudios realizados por el laboratorio HIPRA, en Cataluña, indican que al administrar la vacuna de su mismo laboratorio Startvac® existe una disminución significativa ($p \leq 0,01$) en los tratamientos farmacológicos, siendo menor el número y tiempo de tratamiento de los casos de mastitis clínica en vacas que recibieron la vacuna. Por ende, el grupo vacunado requiere de un menor tiempo y número de tratamientos. El menor uso de tratamientos farmacológicos genera un menor descarte de leche y en consecuencia más litros de leche por vaca. En cuanto a la vacuna J5, contra el agente *Escherichia coli*, se describe que se reducen las pérdidas de leche atribuida a casos de mastitis clínica en grupos tratados versus vacas no vacunadas (Hogan *et al.*, 1992b).

Esta diferencia puede estar explicada ya que los estudios descritos en la literatura no consideran vacunas de tipo subunitaria, ni polivalentes. Además, las condiciones de campo son diferentes entre los ensayos y pudiendo encontrarse expuestas las vacas a diferentes agentes y condiciones ambientales.

Por otro lado, en los grupos vacunados, el aumento en la producción de leche acumulada es concordante con la tendencia a una menor incidencia de casos de mastitis clínica en los

mismos grupos. No obstante, este aumento en la producción de leche acumulada no es significativo ya que no se observó una diferencia en la duración de los casos entre las vacas vacunadas y el grupo placebo.

Recuento de células somáticas

Al realizar el análisis de varianza de medidas repetidas se observó una diferencia significativa entre los grupos ($p=0,03$), donde existe una diferencia significativa en el SRCS de 0,5 puntos entre el grupo placebo y uno de los grupos tratados. Para los grupos 2, 3, 4 no se observó una diferencia significativa. Se observó además que el número de lactancia influye significativamente en el recuento de células somáticas ($p=0,002$). En relación con el número del control lechero, a medida que va transcurriendo la lactancia, no se observó una diferencia significativa entre ellos dentro de los grupos ($p=0,25$). Al observar la interacción entre el número de lactancia y el grupo no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,08$).

En la figura 9 se pueden observar los promedios de los recuentos de células somáticas por grupo y número de control, donde el grupo no vacunado (placebo) presenta una tendencia a un mayor score de recuento de células somáticas.

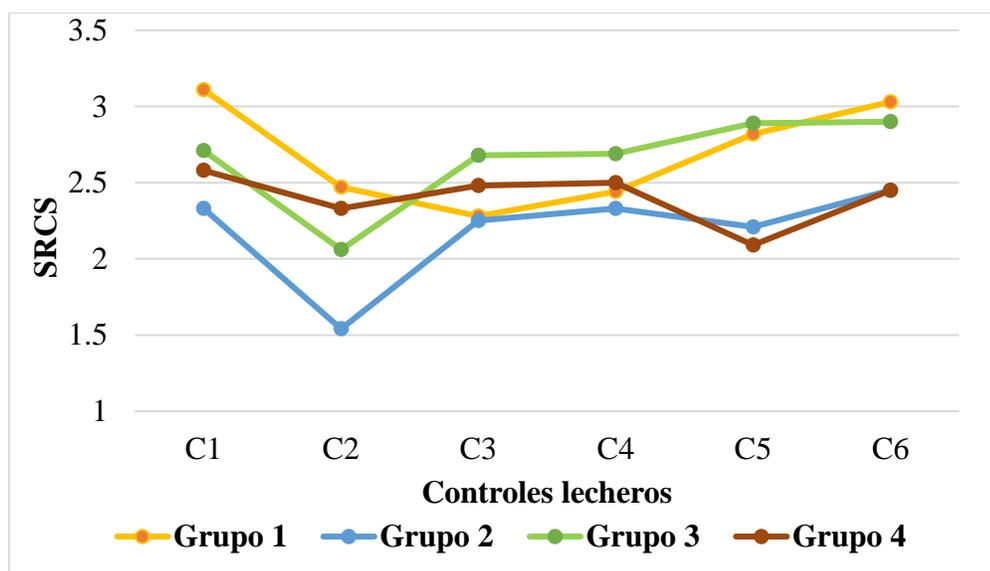


Figura 9. Promedios de mínimos cuadrados del score de recuento de células somáticas (SRCS) según controles lecheros por grupo. En un grupo de vacas Holstein no tratadas (Grupo 1; placebo) y un grupo vacunado contra mastitis clínica agrupando datos de 3 lotes de vacas con

3 *batches* de la vacuna (Grupo 2, 3 y 4; grupos tratados). *No existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre grupos dentro de cada control.

Al realizar el análisis con los datos agrupados, no existe una diferencia significativa en el SRCS entre los grupos ($p = 0,06$) pero sí se observa una tendencia a un menor score de células somáticas para el grupo vacunado. Se mantiene la diferencia significativa entre el número de lactancia, esta diferencia se observa en vacas con tres o más lactancias quienes presentan un mayor SRCS. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el control 2, que se realiza alrededor de los 45 a 50 días en lactancia, y los demás controles lecheros. No obstante, no se observó una diferencia significativa ($p < 0,01$) entre los controles lecheros dentro de cada grupo. Para la interacción entre el grupo y el número de lactancia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,99$) (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de fuentes de variación (grupo, número de lactancia, control e interacción estos) incluidos en el modelo análisis de la varianza para el recuento de células somáticas. $R^2 = 0,7$.

Fuente de variación	P
Grupo	0,06
Número de lactancia	<0,01
Control lechero	<0,01
Grupo * número de lactancia	>0,99
Grupo (Control)	<0,01

Al agrupar los datos, se observa una tendencia a un mayor recuento de células somáticas en el grupo que no recibió la vacuna subunitaria polivalente. No obstante, no se encontró una diferencia estadística significativa entre los grupos ($p = 0,06$) al momento de agrupar los datos. Al inicio de la lactancia, en el primer control lechero, se presenta la mayor diferencia con un delta de 0,5 puntos (Figura 12).

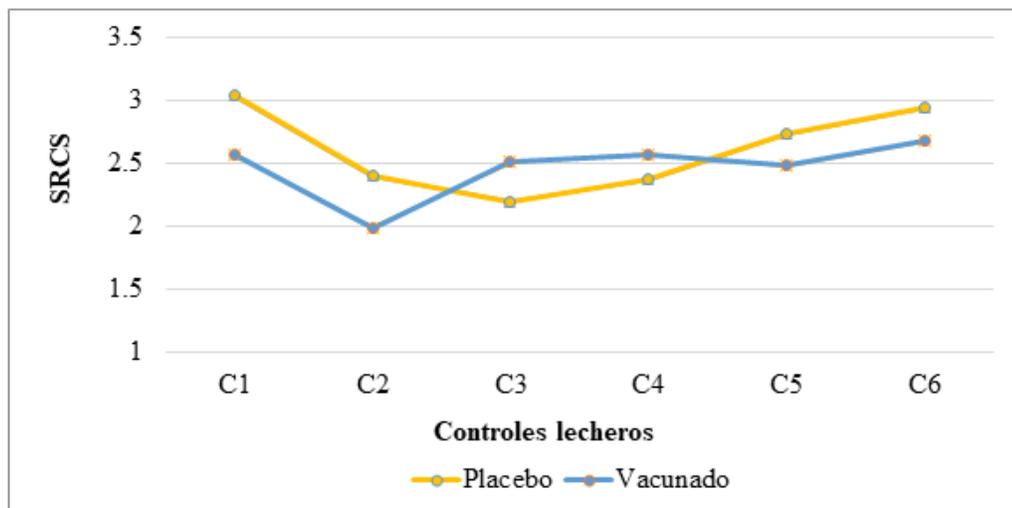


Figura 12. Promedios de mínimos cuadrados del score de recuento de células somáticas (SRCS) según controles lecheros por grupo placebo y grupos tratados. *No existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre grupos dentro de cada control.

Los resultados observados en este estudio difieren con lo descrito en la literatura, en donde un estudio de la vacuna Starvac revelan que, al inocular a los animales, el score del recuento de células somáticas disminuye significativamente ($p = 0,01$). Al realizar la comparación numérica se observó una disminución de 581.000 a 324.000 células somáticas aproximadamente (Hipra S.A, s.f.). Esta diferencia puede estar dada ya que la inoculación de la vacuna Starvac fue realizada en un plantel con un nivel de desafío sanitario muy alto, en donde las vacas presentaban muy altos niveles de células somáticas.

El menor recuento de células somáticas se observa alrededor del segundo control lechero lo cual coincide con la tercera dosis de la vacuna subunitaria que se administró al día 45 post parto, posteriormente a esto se ve que a medida que transcurre la lactancia el SRCS va en aumento. Lo anterior es concordante con lo descrito por el laboratorio Hipra (Hipra S.A., s.f.) que indica que la vacuna Starvac provee inmunidad hasta 78 días post inoculación de la tercera dosis. De igual forma la vacuna la inmunidad conferida al inocular con Enviracor se ve disminuida a medida que aumenta la lactancia, hasta desaparecer a los 75 días de lactancia (Wilson *et al.*, 2009).

Agente causal de los casos de mastitis clínica

En una primera instancia se realizaría una prueba de proporciones comparadas (χ^2) entre grupos para agentes ambientales y contagiosos. Dada la baja cantidad de muestras y que como resultado de los análisis microbiológicos solo se obtuvieron agentes ambientales se realizó un análisis descriptivo.

Si bien al momento del secado ninguna vaca presentó mastitis clínica algunas de las muestras tomadas presentaron crecimiento bacteriano. Los resultados microbiológicos mostraron que el agente más prevalente en los cultivos con un 47% fue *Klebsiella spp*. Además, en menor medida se encontraron *Streptococcus uberis*, *Nocardia spp*, *Proteus spp*, *Staphylococcus coagulasa negativo*. Por otra parte, entre un 40% de las muestras no presentaron crecimiento.

Por otro lado, en relación con las vacas que presentaron mastitis clínica, los agentes encontrados en las muestras de leche provenientes de estas, son similares a los obtenidos en las muestras al momento del secado. En relación con el grupo 1, el cual recibió el placebo, se observa que el principal agente que creció fue *Klebsiella spp*, al igual que en los demás grupos que fueron vacunados. Como segundo patógeno principal, independiente del grupo, se encontró *Streptococcus uberis* con excepción del grupo 3 en el cual no se detectó dicho agente. *Nocardia spp* se presentó en menor medida y solo en grupos que fueron tratados con la vacuna subunitaria polivalente (Figura 13).

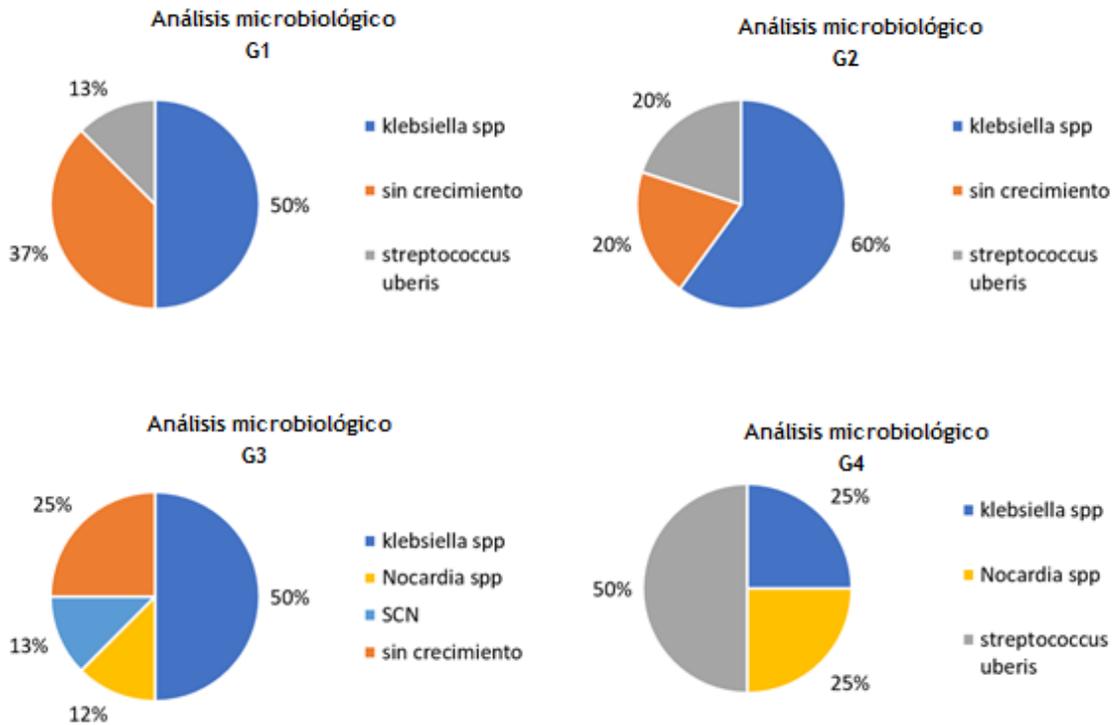


Figura 13. Análisis microbiológico de muestras de leche proveniente de vacas con mastitis clínica, por grupo de tratamiento. G1; grupo placebo, G1, G2, G3; grupos tratados con vacuna subunitaria polivalente.

Al igual que en los demás análisis, se agruparon los datos por vacas tratadas y vacas del grupo placebo. Como resultado de las muestras obtenidas de vacas que presentaron mastitis clínica se obtuvo que en las vacas placebo y en vacas tratadas el principal agente observado es *Klebsiella spp* y como segundo agente más predominante *Streptococcus uberis*. Además, en el grupo tratado se observaron muestras con *Nocardia spp* y *streptococcus coagulasa negativo* (Figura 14).

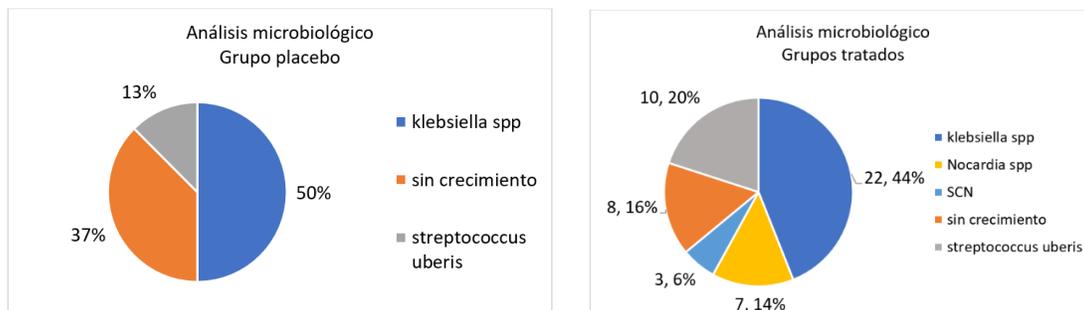


Figura 14. Resultado del análisis microbiológico de muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica por grupo, en un grupo de vacas Holstein no tratadas (placebo) y un grupo vacunado contra mastitis clínica agrupando datos de 3 lotes de vacas Holstein vacunado con 3 *batches*.

Como resultado de los cultivos microbiológicos de las muestras de mastitis clínica, no se obtuvo ningún cultivo positivo a *E.coli* y en mayor medida se presentó el agente *Klebsiella spp*, lo que discrepa de lo descrito en la literatura que indica que el agente de mayor presencia en las lecherías de la zona central de Chile sería *E. coli* (Donoso, 1997). Esta diferencia observada con la literatura puede estar dado por la similitud del crecimiento de las colonias en el medio de cultivo (Puerta-García y Mateos-Rodriguez, 2010).

Animales eliminados por mastitis clínica

El análisis de sobrevida mostró que 41 vacas abandonaron el estudio, sin embargo, sólo 2 de ellas lo hicieron a causa de mastitis clínica, existiendo una muy baja tasa de eliminación en el periodo del estudio, el que duró hasta los 180 días de lactancia, atribuida a casos de mastitis. Las vacas eliminadas correspondían al grupo 3 con 185 días en leche y al grupo 4 con 157 días de lactancia, correspondientes a un 1,38 % y un 1,64 %, respectivamente. La principal razón del bajo porcentaje de eliminación por causa de mastitis clínica en el periodo de estudio fue por la baja incidencia de mastitis clínica y además por el buen *estatus* sanitario del plantel.

DISCUSIÓN GENERAL

A modo general y en base a los resultados observados la vacuna subunitaria polivalente no tendría un efecto estadísticamente significativo en la incidencia y duración de los casos de mastitis clínica. También se observó que vacunar con dicha vacuna no tendría un efecto significativo sobre la producción de leche ni el recuento de células somáticas. Se observó una tendencia a que vacas vacunadas presentaron una menor incidencia de mastitis clínica, una mayor producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia y un menor recuento de células somáticas, pero estas diferencias no fueron significativas.

En ambos, grupos tratado y placebo se observó una baja incidencia de mastitis clínica en el periodo en que se realizó el estudio, lo que es consistente con la situación histórica del campo, que tiene baja incidencia de mastitis (2,6% mensual). Si bien los factores de riesgo para mastitis son mayores en sistemas en confinamiento, en consecuencia, se esperaría una mayor incidencia de mastitis clínica (Constable *et al.*, 2017), sin embargo, el adecuado manejo del sistema es determinante. Esta baja incidencia se debe al buen *estatus* sanitario y bajo nivel de desafío del plantel. Sin embargo, se observó una tendencia a una menor incidencia de mastitis clínica en el grupo tratado.

Al igual que lo reportado en el presente estudio, Smith *et al.* (1999) indican que no existe una diferencia significativa para la duración de los casos de mastitis clínica entre vacunar o no con bacterina *E. coli* J5. Sin embargo, existen otros estudios que difieren de lo anterior. Hogan *et al.* (2005) plantea que al inmunizar con *E. coli* J5 los casos de mastitis duran menos (47-56 horas), en relación con las que no reciben vacuna (85 horas). Dado la diferencia presentada en los diferentes estudios, es que consideraría realizar más estudios para poder analizar esta variable.

Si bien en la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia no se presentó una diferencia significativa, se observa una tendencia a una mayor producción en las vacas vacunadas. Esta diferencia se ve más marcada en vacas de tres o más lactancia que recibieron la vacuna versus la que no se vacunaron. Lo anterior puede estar dado, ya que a mayor número de lactancias la producción aumenta y sufren un mayor nivel de estrés productivo, esto deja a las vacas más expuestas a infecciones. Al aumentar su producción son vacas más expuestas a contraer mastitis clínica dado que sus niveles de estrés son mayores y su sistema inmune se ve mayormente deprimido (Kimura *et al.*, 2014). Es por lo anterior que se presenta una tendencia a

una mayor incidencia de mastitis clínica a medida que aumenta el número ordinal de partos, lo que coincide con la tendencia descrita a una mayor producción en vacas de tres o más lactancias.

Las vacas tratadas presentaron una fuerte tendencia a un menor recuento de células somáticas que en el grupo placebo. Por otro lado, la mayor diferencia numérica de células somáticas entre vacas tratadas y no tratadas se presenta al momento del segundo control lechero, lo cual se podría relacionar con la inmunidad otorgada por la tercera dosis, ya que los anticuerpos empiezan a elevarse desde 15-30 días post parto (Sáenz y Lapierre, 2014). Posteriormente, a medida que transcurre la lactancia, el recuento de células somáticas va en aumento ya que la inmunidad conferida disminuye; es por lo que en un futuro estudio se puede considerar la administración de más dosis a lo largo de la lactancia.

En relación con los resultados de los cultivos microbiológicos provenientes de muestras de leche de vacas con mastitis, ellos son concordantes con lo descrito en la literatura, ya que en la zona central de Chile en mayor medida los casos de mastitis clínica son causados por agentes ambientales (Donoso, 1997), donde en particular se encuentra *E. coli* (San Martín *et al.*, 2002). Si bien el principal agente aislado que se describe en la zona es *Escherichia coli*, en este estudio no se logró identificar. Sin embargo, esto puede estar dado ya que el principal agente detectado fue *Klebsiella spp*, agente gram negativo, que se puede confundir al momento del análisis microbiológico. Ambos agentes provenientes del grupo de las enterobacterias presentan un crecimiento muy similar en el cultivo microbiológico. En el medio de cultivo Mac ConKey crecen con una coloración rosada, ya que tanto *Escherichia coli* como *Klebsiella spp* fermentan la lactosa presente en el medio (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010). Por tanto, los resultados obtenidos pueden eventualmente deberse a una mala identificación de estas. Otra hipótesis que se plantea es que, dentro de las muestras sin crecimiento, en las cuales no se desarrollaron bacterias o eventualmente estaban contaminadas, en estas últimas el agente bacteriano *Escherichia coli* puede haberse encubierto. Finalmente, otro punto a considerar es el tipo de mecanismo de acción del patógeno. Si bien son diversas las cepas de *E. coli* y el mecanismo mediante el cual producen mastitis clínica, existen algunas cepas que colonizan, liberan sus factores de virulencia y toxicidad, para posteriormente dejar el huésped mientras el sistema inmune de éste responde a la infección con algunos signos clínicos (Lehtolainen, 2014; Le Bouguenec, 2005). Por

ende y según lo anterior la tercera hipostasis que se puede barajar es que, al momento de tomar las muestras, el patógeno ya había abandonado el huésped. Si bien la vacuna es contra *Escherichia coli* y no contra *Klebsiella spp*, estudios revelan inmunidad cruzada, brindando cierta protección para mastitis causadas por *Klebsiella spp*, por parte de vacunas contra *E. coli*, vacuna J5 (Wilson *et al.*, 2007).

Se planteó en primera instancia, analizar la severidad de los casos de mastitis clínica mediante un análisis estadístico, pero esto no se pudo realizar dada la inconsistencia en los datos de severidad para los casos de mastitis clínica. Algunos estudios revelan que existe una tendencia a una menor severidad en los casos de mastitis clínica en vacas vacunadas. Hogan *et al.* (1995) observaron que al vacunar con una bacterina de *E. coli* J5 disminuía la intensidad de los síntomas de los casos de Mastitis clínica. Al igual que el estudio anterior, Deluyker *et al.* (2005) observaron en un estudio de campo, que existía una diferencia significativa para la severidad de los casos de mastitis clínica, existiendo menos casos de mastitis tóxicas sistémicas en el grupo vacunado contra *E. coli*. Por otra parte, se ha observado que al inmunizar con la vacuna J5 los signos clínicos son menos severos que en vacas no inmunizadas, pero esta diferencia observada no fue significativa (Hogan *et al.*, 1993). Wilson *et al.* (2009) observaron que no existió un efecto significativo de inmunizar con la vacuna J5 sobre la severidad de los casos de mastitis clínica. En consecuencia, con lo descrito en la literatura, la severidad de los casos de mastitis clínica es una variable importante a considerar, puesto que entrega información sobre la eficiencia de vacunar.

Los resultados obtenidos pueden estar explicados por el buen *estatus* sanitario del predio, el cual confiere un nivel de desafío bajo. Si bien para las variables consideradas en este estudio la vacuna no tiene un efecto estadísticamente significativo, no se puede afirmar que la vacuna no tiene un efecto. Si bien la vacuna subunitaria polivalente baja el nivel de infección, disminuyendo el recuento de células somáticas y a su vez aumentando la producción de leche, el efecto de la vacuna es marginal. Se debe considerar que en el campo que se realizó el presente estudio tiene un promedio de 170.000 células somáticas. A diferencia de estudios de la vacuna Starvac donde existe un mayor desafío en donde los niveles de células somáticas se ven reducidos de 581.000 a 324.000 células somáticas. Es altamente probable que en

campos con un mayor desafío sanitario se pueda observar un mayor efecto de la vacuna sobre la incidencia, duración, producción de leche acumulada y recuento de células somáticas.

Uno de los parámetros para poder evaluar la eficiencia de inmunizar con esta vacuna subunitaria polivalente es medir las concentraciones séricas de inmunoglobulinas, esperando elevar los títulos de anticuerpos al vacunar. En la literatura se describe que al inmunizar con la vacuna J5, el grupo tratado presentó mayores concentraciones de inmunoglobulinas que el grupo control, alcanzando una diferencia significativa. Se observó una diferencia en los títulos de anticuerpos hasta el día 45 post parto (Tomita *et al.*, 2000).

Paralelo a este estudio se midieron los títulos de anticuerpos (IgE) en donde se observó que al inocular la vacuna subunitaria polivalente los animales elevaron títulos de anticuerpo (L. Sáenz, comunicación personal, 2019). Por tanto, si bien al momento de realizar el análisis estadístico, la diferencia entre grupo tratado y grupo placebo no alcanzo significancia, sí se observó que la vacuna estimula la inmunidad, elevando los títulos de anticuerpos (IgE). Es por lo anterior que se plantea realizar nuevos estudios considerando medir títulos de anticuerpos (IgE).

Otro parámetro que se debe considerar es la medición de la severidad de los casos de mastitis clínica, para poder determinar la eficiencia de vacunar con esta vacuna subunitaria polivalente. Los resultados presentes en este estudio fueron considerados en un plantel con un alto *estatus* sanitario; por ende, se postula realizar estudios en un plantel con un mayor desafío sanitario. Además, se plantea considerar vacas de tres o más lactancias en donde podrían ser más beneficiadas, dado que es en estas en donde se observó una mayor diferencia en vacas vacunadas para la producción de leche.

CONCLUSIONES

Se observó una tendencia a una menor incidencia de mastitis clínicas en vacas vacunadas en comparación con vacas que no recibieron la vacuna subunitaria polivalente.

No existió diferencia significativa en la duración de los casos de mastitis clínica entre vacas vacunadas versus el placebo.

En relación con la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre vacas vacunadas y vacas que recibieron el placebo. Sin embargo, se observó una diferencia numérica en la producción láctea, en vacas vacunadas versus el grupo placebo. Esta diferencia es más marcada en vacas de tres o más lactancias.

No existió diferencia significativa para el score de células somáticas entre vacas del grupo placebo y vacas tratadas, tampoco se observó una diferencia entre los controles lecheros dentro de cada grupo. No obstante, existió una tendencia a un menor score de células somáticas en vacas vacunadas versus vacas que recibieron el placebo.

Todos los agentes encontrados, en los diferentes cultivos microbiológicos, fueron agentes clasificados como ambientales. Los dos principales agentes encontrados en muestras provenientes de vacas que presentaron mastitis clínica, en vacas vacunadas y vacas sin vacunar, fueron *Klebsiella spp* y *Streptococcus uberis*.

Las vacas eliminadas o muertas por causa de mastitis clínica fueron solo dos, pertenecientes ambas a los grupos que recibieron la vacuna subunitaria polivalente.

BIBLIOGRAFÍA

AZÓCAR, J. 2001. Prevalencia, incidencia, y etiología de mastitis en un centro de acopio lechero, comuna de María Pinto, Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 92p.

BAR D.; TAUER, L.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.; HERTL, J.; SCHUKKEN, Y.; SCHULTE, H.; WELCOME, F.; GROHN, Y. 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *Journal of Animal Science*. 91:2205–2214.

BERRÍOS P. 2001. Vacunas no tradicionales y nuevas tecnologías aplicadas en su preparación. [en línea] Tecno VeT. Vol 7. <http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9504%2526ISID%253D466,00.html> [consulta: 24-04-2018]

CONSTABLE, P.; HINCHCLIFF, K.; STANLEY, D.; GRÜNBERG, W. 2017. Diseases of the mammary gland. **In:** *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. 11th ed. Elsevier. Missouri, Estados Unidos. 1904-1930.

CONTRERAS, G.; SORDILLO, L. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 34: 281-289.

DABDOUB, S.; SHOOK, G. 1984. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count and clinical mastitis. *Journal of Animal Science*. 67: 163-164.

DELUYKER, H.; VAN UFFEL, K.; ELFRING, G.; VAN OYE, S.; DUTTON, C.; NANHJIAN, I. 2005. Efficacy of a J-5 *Escherichia coli* bacterin in clinical coliform mastitis dairy cattle mastitis in dairy production. Ed. H. Hogeveen. N. Wageningen Academic publisher.

DONOSO, M. 1997. Mastitis clínica: determinación de la flora microbiana patógena en vacas de lechería de la Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 67p.

ERSKINE, R. 2012. Vaccination strategies for mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28: 257–270.

FRANCIS, M. J. 1993. Subunit vaccines and vectors. **In:** *Vaccines for Veterinary Applications*. Ed. A.R. Peters. Butterworth Heinemann, Oxford. 31–57

GRUMMER, R.; MASHEK, D.; HAYIRLI, A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 20: 447–470.

HIPRA. s.f. Evaluación de la utilización de la vacuna STARVAC en una explotación lechera afectada por mastitis ambientales [en línea] <<https://es.scribd.com/document/205742086/Star-Vac>> [consulta: 3- 02-2019]

HOGAN, J.S.; CANNON, V.B.; SMITH, K.L.; RINEHART, C.; MILLER, S. 2005. Effects of adjuvants on safety and efficacy of an *Escherichia coli* J5 bacterin. *Journal Dairy Science*. 88: 534-542

HOGAN, J.; SMITH, L. 2012. Managing environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28: 217–224.

HOGAN, J.; WEISS, W.; TODHUNTER, D.; SMITH, K.; SCHOENBERGER, P. 1992a. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *Journal Dairy Science*. 75: 415-422.

HOGAN, J.; SMITH, K.; TODHUNTER, D.; SCHOENBERGER, P. 1992b. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. *J. Dairy Sci.* 75: 78-84.

HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER. 1993. Vitamin E as an adjuvant in an *Escherichia coli* J5 vaccine. *Journal Dairy Science*. 76: 401-407.

HOGAN, J.; WEISS, W.; TODHUNTER, D.; SMITH, K.; SCHOENBERGER, P.; SORDILLO, L. 1994. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *Journal Dairy Science*. 78:285-290.

HOGAN, J.; WEISS, W.; SMITH, K.; TODHUNTER, D.; SCHOENBERGER, P.; SORILLO, L. 1995. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci* 78(2): 285-290.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1999. Suggested interpretation of mastitis terminology. *IDF Bulletin*. 338: 3-20.

INGVARTSEN, K. 2006. Feeding-and management-related diseases in the transition cow: physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science Technology*. 126: 175–213.

KIMURA, K.; GOFF, J.; KEHRLI, M. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *Journal of Animal Science*. 82: 2385–2392.

KIMURA, K.; GOFF, J.; CANNING, P.; WANG, C.; ROTH, J. 2014. Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. *Journal of Animal Science*. 97: 4842–4851.

LE BOUGUENEC, C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 471–478.

LEITNER, G.; LUBASHEVSKY, E.; GLICKMAN, A.; WINKLER, M.; EZRA, E.; CHAFFER, M.; SARAN, A.; TRAININ, Z. 2003. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trials. *Journals veterinary immunology and immunopathology*. 93:151-158.

LEHTOLAINEN, T. 2004. *Escherichia coli* mastitis: Bacterial factors and host response. Doctoral thesis. Helsinki, Finland. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.

MINSAL. MINISTERIO DE SALUD. 2010. Decreto N° 6 exento dispone vacunación obligatoria contra enfermedades inmuno prevenibles de la población del país. 19 abril 2010, Chile.

NMC. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. s.f. Recommended mastitis control program. [en línea] < <http://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/08/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM-International.pdf> > [consulta: 04-08-2018]

- OLIVER, S.; MURINDA, S.** 2012. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28: 165–185.
- PACHA, P.** 2015. Evaluación de la diversidad genética de *Staphylococcus aureus* aislados desde leche de estanque de rebaños lecheros de las provincias de BioBío y Ñuble, región del BioBío. Memoria para optar al grado de magíster en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción.
- PIEPERS S.; PRENAFETA A.; VERBEKE J.; DE VISSCHER A.; MARCH R.; DE VliegHER S.** 2017. Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *Journal of Animal Science*. 100: 769-782.
- PUERTA-GARCÍA, A.; MATEOS-RODRÍGUEZ, F.** 2010. Infecciones por anaerobios y enterobacterias. In: enfermedades infecciosas. *Medicine-programa de formación de médica continuada acreditado*. Albacete, España. 10: 3426-3431.
- RAPHAEL, W.; SORDILLO L.** 2013. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 29: 267-278.
- ROBERSON, J.** 2012. Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28: 271-288.
- SÁENZ, L.; LAPIERRE, L.** 2014. Vacuna subunitaria, polivalente altamente inmunogénica contra mastitis en mamíferos. *The World Intellectual Property Organization* CL 3247-2014
- SAN MARTIN, B., KRUZE, J., MORALES, M. A., AGÜERO, H., LEON, B., ESPINOZA, S., BORIE, C.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, región metropolitana y X región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 34: 221–234.
- SMITH, J.; HOGAN, J.; SMITH, K.** 1999. Efficacy of Intramammary Immunization with an *Escherichia coli* J5 Bacterin. *Journal Dairy Science*. 82: 2582-2588.

TOMITA, G.; RAY, C.; NICKERSON, S.; OWENS, W.; GALLO, G. 2000. A comparison of two commercially available Escherichia coli J5 vaccines against E. coli intramammary challenge. *Journal Dairy Science*. 83: 2276-2281.

WELLENBERG, G.J.; VAN DER POEL, W.H.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 88: 27-45.

WILSON, D.; MALLARD, B.; BURTON, J.; SCHUKKEN, Y.; GROHN, Y. 2007. Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary Escherichia coli challenge for J5 vaccinate and control cows. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14: 693–699.

WILSON, D.; MALLARD, B.; BURTON, J.; SCHUKKEN, Y.; GROHN, Y. 2009. Association of Escherichia coli J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16: 209-217.

ZHAO, X.; LACASSE, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*. 86: 57–65.

ZOETIS. s. f. leukocell-2, felv vaccine with the tumor-specific antigen focma to aid in tumor protection [en línea] <<https://www.zoetis.com/products/cats/leukocell-2.aspx>> [consulta: 3- 07-2019].