



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE LA EFICACIA ALCANZADA
EN LA PROTECCIÓN DE LA SALUD MAMARIA,
POR DOS PROTOCOLOS DE VACUNACIÓN CON UNA
BACTERINA DE CEPA J5 DE ESCHERICHIA COLI,
EN VACAS LECHERAS DE LA ZONA CENTRAL

FELIPE REMENIK LAZCANO

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

PROFESOR GUÍA: MARIO DUCHENS ARANCIBIA

SANTIAGO, CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE LA EFICACIA ALCANZADA EN LA PROTECCIÓN DE LA SALUD MAMARIA, POR DOS PROTOCOLOS DE VACUNACIÓN CON UNA BACTERINA DE CEPA J5 DE ESCHERICHIA COLI, EN VACAS LECHERAS DE LA ZONA CENTRAL

FELIPE REMENIK LAZCANO

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: MARIO DUCHENS ARANCIBIA
PROFESOR CONSEJERO	: HERNÁN AGÜERO EGUILUZ
PROFESOR CONSEJERO	: RICHARD ARANCIBIA BERRIOS

SANTIAGO, CHILE
2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a quienes me han apoyado y dado su amor y comprensión durante toda mi vida... a mis padres, para ellos está dedicada esta memoria.

A Paulina, quien fue la que me inspiro para que esto llegara a buen término, y me ha entregado su amor incondicional y ha iluminado cada uno de mis días desde el momento que la conocí.

A mi profesor guía Dr. Mario Duchens, que me permitió realizar esta tesis, me entregó importantes consejos de vida y me brindó su simpatía, lo aprecio mucho y siempre le estaré muy agradecido.

A mis profesores correctores Dr. Hernán Agüero y Dr. Richard Arancibia, y además a la Dra. Valeria Rojas, que me ayudaron y fueron un gran aporte para poder realizar esta memoria de título.

A las grandes amistades que me ha entregado mi paso por esta facultad, cada uno de ellos es muy importante para mí.

Finalmente, quiero agradecer a Dios por ponerme en este camino.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. La mastitis bovina.....	3
2.1.1. Relevancia.....	3
2.1.2. Presentación de la mastitis.....	5
2.2. Mastitis por coliformes	7
2.2.1. Etiología.....	7
2.2.2. Presentación de la mastitis por coliformes	7
2.2.3. Patogenia.....	9
2.2.3.1. Estructura del lipopolisacárido	10
2.2.4. Factores de riesgo	11
2.2.5. Medidas de prevención	13
2.2.5.1. Disminución del desafío bacteriano.....	13
2.2.5.2. Mejoramiento de la respuesta inmune	14
2.3. La vacuna J5	14
2.3.1. Mecanismo de acción.....	14
2.3.2. Factores que afectan la respuesta a la vacuna J5	18
2.3.3. Efectos de la vacuna J5: salud mamaria, producción de leche y fertilidad	19
2.3.4. Aplicación de dosis adicionales de la vacuna J5	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
4.1. Ubicación y características del rebaño en estudio	24

4.2. Diseño experimental	25
4.3. Obtención de la información.....	26
4.4. Análisis de resultados	29
4.4.1. Salud mamaria	29
4.4.2. Producción de leche.....	32
4.4.3. Fertilidad.....	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. Incidencia de mastitis clínica.....	35
5.2. Severidad de los casos de mastitis clínica	41
5.3. Duración de los casos de mastitis clínica.....	51
5.4. Recuento de células somáticas.....	53
5.5. Agente causal de los casos mastitis	57
5.6. Vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis	59
5.7. Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia.....	61
5.8. Fertilidad.....	64
5.8.1. Tasa de concepción a la primera inseminación	64
5.8.2. Días a la preñez.....	66
6. IMPLICANCIAS	72
7. CONCLUSIONES	75
8. BIBLIOGRAFÍA	76

RESUMEN

La mastitis bovina, en cualquiera de sus formas de presentación, genera importantes pérdidas en los planteles productores de leche. La mastitis clínica ocasionada por bacterias coliformes se hace más importante principalmente en las vacas que se encuentran en sistemas productivos en confinamiento. Una de las vías por la cual se ha logrado aumentar la protección de las vacas frente a este tipo de mastitis, es su inmunización mediante vacunación. La vacuna contra mastitis por coliformes más utilizada y estudiada es la vacuna J5, consistente en una bacterina de *Escherichia coli* de cepa mutante J5. El laboratorio fabricante recomienda que las vacas reciban tres dosis, que se aplican al momento del secado, tres semanas antes del parto y alrededor de una semana después del parto.

Se ha propuesto que la aplicación de dosis adicionales a las tres recomendadas, mejoraría la eficacia de la vacuna y aumentaría la protección frente a la mastitis por coliformes. Consecuentemente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un protocolo alternativo de aplicación de la vacuna J5, donde se agrega una dosis adicional de la vacuna al protocolo tradicional, sobre la salud mamaria, la producción de leche y la fertilidad de vacas lecheras, comparándolo con el protocolo tradicional de vacunación.

Para la realización del estudio se utilizaron 1.062 lactancias de 914 vacas de alta producción, pertenecientes a un plantel lechero en que los animales permanecían en confinamiento permanente, en galpones con cubículos individuales con cama de arena. En 588 casos las vacas recibieron el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5 (grupo control), mientras que en 474 lactancias, las vacas recibieron una dosis adicional de la vacuna entre el día 28 y 35 post parto (grupo tratado). Los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de estudio. Para cada caso de mastitis clínica se registró su duración, grado de severidad (leve, moderada o severa) y agente causal. Se registraron además los recuentos mensuales de células somáticas en leche para cada vaca y la producción de leche diaria de cada vaca. Se registraron las eliminaciones y muertes de vacas hasta el día 200 post parto y sus causas y, finalmente, se calculó la tasa de

concepción a la primera inseminación y los días desde el parto a la preñez para ambos grupos de vacas.

La severidad de los casos de mastitis clínica y la tasa de concepción a la primera inseminación fueron comparadas mediante un análisis de regresión logística binaria; la incidencia de mastitis clínica, la proporción de vacas muertas o eliminadas por mastitis y la proporción de los tipos de agentes aislados de los casos de mastitis clínica fueron analizados a través de la prueba de χ^2 . La producción de leche y recuento de células somáticas fueron analizados utilizando un análisis de varianza, mediante el método GLM. Se realizó un análisis de sobrevivencia para la variable días desde el parto a la preñez, donde las curvas de sobrevivencia generadas fueron comparadas mediante el método del log-rank.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de mastitis clínica, duración de los casos de mastitis clínica, proporción de agentes aislados de los casos de mastitis clínica, proporción de vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis, recuento de células somáticas, producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia, días a la preñez y tasa de concepción a la primera inseminación, entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, en el grupo de vacas tratadas se observó un menor riesgo de que los casos de mastitis clínica, presentados entre el momento de la aplicación de la dosis adicional de la vacuna y el día 171 de lactancia, fueran severos, en comparación al grupo control (OR: 0,61; IC 95%: 0,38 - 0,96; $p = 0,03$). Al realizar el análisis según el número de lactancia de las vacas, se determinó que el efecto depresor en la severidad de los casos de mastitis, fue estadísticamente significativo solamente en las vacas de tres o más lactancias (OR: 0,5; IC 95%: 0,33 - 0,96; $p = 0,04$).

El efecto positivo que la dosis adicional de la vacuna produjo sobre la salud mamaria, no tuvo una magnitud suficiente para mejorar la mayor parte de los parámetros productivos y sanitarios estudiados. El principal efecto beneficioso fue la disminución de la severidad de los casos clínicos de mastitis en las vacas de más de dos lactancias.

ABSTRACT

Bovine mastitis, in any of its forms, produces important losses to the dairy industry. Clinical mastitis caused by coliform bacteria becomes more important mainly in cows housed in confined conditions. One way to increase the protection against this form of mastitis is the immunization of cows through vaccination. The most widely used and studied coliform mastitis vaccine is the J5 vaccine, a bacterin of a J5 mutant strain of *Escherichia coli*. Vaccination schedule recommended by the manufacturer includes three doses given at dry off, three weeks before calving and about one week after calving.

It has been proposed that application of additional doses, beyond the three doses recommended by the manufacturer, would improve vaccine's efficacy and increase protection against coliform mastitis. Consequently, the aim of this study was to evaluate the effect of a modified vaccination schedule of the J5 vaccine, where an additional dose was included, compared to the traditional vaccination protocol on mammary health, milk production and fertility of dairy cows.

One thousand and sixty two lactations from 914 high-producing dairy cows were used. Cows were located at a dairy farm where animals were confined in free stall barns with sand bedding. In 588 lactations, cows received the traditional J5 vaccination schedule (control group), while in 474 lactations, cows received an additional dose of vaccine between days 28 and 35 postpartum (treated group). Cows were randomly allocated to each study groups. Cases of clinical mastitis were recorded, including duration, severity (mild, moderate or severe) and causal agent. Monthly somatic cell counts in milk and daily milk production were also recorded for each cow. Culling and deaths of cows until 200 days post partum and their causes were registered. Finally, conception rate to the first insemination and days from calving to pregnancy were calculated for both groups.

Mastitis severity and conception to first insemination were compared by binary logistic regression; incidence of clinical mastitis, proportion of dead or culled cows and proportion of causative agent isolated from clinical cases were compared by chi-square tests. Milk production and somatic cell scores were analyzed by analysis of variance by the GLM

procedure. A survival analysis was performed to analyze days to conception, where survival curves were compared by log-rank test.

No significant differences were observed in the incidence of clinical mastitis, duration of clinical cases, proportion of agents isolated from clinical cases, proportion of dead or culled cows by mastitis, somatic cell counts, 100-days cumulative milk yield, days to pregnancy, and conception rate at first insemination, between both experimental groups. However, cows from the treated group had a lower risk of clinical mastitis between the application of the additional dose of the vaccine and d-171 of lactation, were severe, compared to the control group (OR: 0.61; 95% CI: 0.38 - 0.96; $p = 0.03$). When analyzed by lactation number, the lower severity of mastitis cases was statistically significant only in cows with three or more lactations (OR: 0.5; 95% CI: 0.33 - 0.96; $p = 0.04$).

The positive effect of the additional dose of J5 vaccine on mammary health did not have a magnitude sufficient to improve most of the productive and health parameters studied. The main beneficial effect was a reduction in the severity of clinical mastitis cases in cows beyond second lactation.

1. INTRODUCCIÓN

Al considerar los problemas sanitarios que afectan a las vacas productoras de leche, aquellos que desafían la salud mamaria son de la mayor importancia. Dentro de éstos, la mastitis por coliformes cada vez toma mayor relevancia, especialmente en planteles en los que las vacas permanecen durante algún período alojadas en confinamiento, sistema que se utiliza con mayor frecuencia en la zona central y centro-sur del país. Ésta, es la clase de mastitis más importante en rebaños bien manejados, que poseen recuentos de células somáticas bajos (Erskine, 2001; Radostits *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 2003).

La mastitis producida por bacterias coliformes genera pérdidas por conceptos de una menor producción, pérdida directa de leche, menor calidad de esta misma, costos en tratamientos y disminución de la eficiencia reproductiva de las vacas. Además, este tipo de mastitis, puede presentarse en forma de cuadros graves que incluso pueden llegar a causar la muerte o eliminación prematura de las vacas afectadas. Todo esto, sumado a que el tratamiento en base a antibióticos no resulta satisfactorio, dan como resultado que para poder producir leche en forma eficiente y de calidad, sea necesario disminuir el riesgo de presentación de este tipo de mastitis, o en su defecto disminuir la severidad de los cuadros clínicos y así mitigar las consecuencias negativas que la mastitis por coliformes pueda generar en un rebaño lechero.

La prevención de la mastitis por coliformes ha seguido básicamente dos estrategias, las cuales no son excluyentes y pueden ser utilizadas en conjunto. La primera se orienta, mediante la implementación de buenas prácticas de manejos higiénicos, a disminuir la exposición de los pezones de las vacas a los agentes patógenos presentes en el ambiente. Mientras que la otra estrategia consiste en reforzar la respuesta inmune de las vacas frente a la infección por coliformes, mediante el uso de vacunas. En la actualidad la vacuna más utilizada y la única disponible comercialmente en Chile para este fin, es la bacterina de *Escherichia coli* de cepa J5, (Enviracor™, Pfizer Inc.). El protocolo propuesto por el laboratorio fabricante para la aplicación de esta vacuna, consistente en tres dosis aplicadas durante el período seco y la lactancia temprana, ha mostrado ser eficaz en la protección

contra este tipo de mastitis, disminuyendo su incidencia, severidad y algunas de sus consecuencias negativas asociadas, lo que ha sido corroborado por diversos estudios. Sin embargo, la incidencia y la gravedad de los casos de mastitis por coliformes en el primer tercio de la lactancia, siguen siendo altas.

Los resultados de algunas investigaciones recientes, sugieren que la administración de dosis adicionales de la vacuna, a las del protocolo tradicional de vacunación, mejoraría y prolongaría la respuesta inmunológica frente a las bacterias coliformes productoras de mastitis (Chaiyotwittayakun *et al.*, 2004; Erskine *et al.*, 2010), además de disminuir el riesgo de producción de cuadros de mastitis clínica severa, en vacas lecheras (Erskine *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque estos resultados son auspiciosos, los protocolos propuestos en la práctica son complejos, por lo que su implementación en los planteles no resulta sencilla. Frente a ello, este estudio propone un protocolo de vacunación más simple que el de dichos protocolos propuestos, pero que a su vez sea capaz de aumentar la protección entregada por el protocolo tradicional de vacunación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La salud mamaria es uno de los aspectos más importantes en un sistema de producción de leche, siendo la mastitis, en cualquiera de sus tipos de presentación, la principal enfermedad que la afecta.

2.1. La mastitis bovina

La mastitis se define como cualquier proceso inflamatorio que se produzca en uno o más cuartos de la glándula mamaria y que casi siempre es producido por microorganismos infecciosos (IDF, 1999). Radostits *et al.* (2002) definen a la mastitis como una enfermedad caracterizada por el aumento significativo del contenido de leucocitos en la leche de la glándula mamaria afectada. Erskine (2001) la define como la inflamación de la glándula mamaria y que principalmente se genera como resultado de la invasión de microorganismos patógenos a través del canal del pezón.

2.1.1. Relevancia

La mastitis es un tema relevante en la industria lechera, afectando a vacas que se encuentran en cualquier tipo de sistema productivo y generando cuantiosas pérdidas a través de todas sus formas de presentación. La mastitis bovina ocasiona descenso en la producción de leche de las vacas afectadas, pérdidas por descarte de leche alterada, penalizaciones por baja calidad de la misma, gastos en tratamiento y pérdidas por muerte y eliminación prematura de vacas. Además, es la enfermedad que, como consecuencia de su tratamiento, aporta mayor cantidad de residuos antimicrobianos a la leche para consumo humano (Erskine, 2001).

Bar *et al.* (2008) estimaron que el costo promedio de cada caso de mastitis clínica alcanzaba 179 US dólares, pudiendo variar ampliamente entre 3 y 403 US dólares, siendo esta variación determinada por factores propios del animal, características del caso de

mastitis u otros factores externos. En un estudio más reciente, Cha *et al.* (2011) calcularon mediante un modelo matemático, que los casos clínicos de mastitis ocasionados por bacterias Gram negativas, eran en promedio los más costosos (aproximadamente 210 US dólares), mientras que cada caso de mastitis ocasionada por bacterias Gram positivas costaba aproximadamente 130 US dólares. Según dicho estudio, los principales costos de la mastitis por bacterias Gram negativas estarían asociados a pérdidas productivas, mientras que en el caso de la mastitis por bacterias Gram positivas, fue mayor la ponderación de los costos por tratamiento. Por lo tanto, el nivel de pérdidas que un caso clínico de mastitis genera en un plantel productivo, determina que la prevención de esta patología sea de vital importancia.

En cuanto a las pérdidas en la producción de leche que puede ocasionar la mastitis clínica, en un estudio en el que se analizó la relación entre la mastitis clínica, la producción láctea y la presencia de otras enfermedades productivas, se observó que las vacas de primera lactancia que sufrieron mastitis clínica, perdieron en promedio 700 kg de leche por lactancia, mientras que en las vacas de dos o más lactancias esta pérdida alcanzó a 1.200 kg en promedio; verificándose además, que la mastitis fue la enfermedad que en forma individual generó las mayores pérdidas productivas por vaca (Wilson *et al.*, 2004). Por su parte, Hagnestam *et al.* (2007) informaron que las vacas de primera lactancia que presentaron mastitis clínica, experimentaron hasta un 9% de pérdidas en la producción de leche y que éstas fueron mayores cuando el cuadro se presentaba durante la sexta semana de lactancia. En el caso de las vacas de dos o más lactancias, la pérdida productiva podía alcanzar hasta un 11% y éstas fueron mayores cuando los casos se presentaron en la tercera semana de lactancia. Además, en ambos estudios se observó que aquellas vacas que tenían un potencial productivo más elevado, presentaron a su vez una mayor susceptibilidad frente a la mastitis clínica.

Además de los gastos que la mastitis genera en forma directa en un plantel lechero, también ésta produce un efecto negativo sobre el rendimiento reproductivo de las vacas afectadas. Este efecto tendría particular importancia en el caso de la mastitis producida por bacterias Gram negativas (Moore *et al.*, 1991). Santos *et al.* (2004) observaron que además de afectar

el nivel productivo, la mastitis generaba un descenso en la tasa de concepción y un aumento en la tasa de abortos y de eliminación del rebaño; siendo estas consecuencias mayores, en las vacas que sufrieron mastitis en el período temprano de lactancia. En un estudio realizado con vacas Jersey, Barker *et al.* (1998) señalan que después de un caso de mastitis clínica, las vacas aumentaban los días al primer servicio, los días abiertos y el número de servicios por concepción.

2.1.2. Presentación de la mastitis

Básicamente, la mastitis bovina puede ser clasificada según las manifestaciones clínicas que produce (o no produce), en mastitis clínica y mastitis subclínica, siendo ambas de importancia para la industria lechera mundial. La mastitis clínica se caracteriza por una inflamación de la glándula mamaria con alteraciones tangibles en la leche y/o cuarto mamario afectado, pudiendo incluso llegar a presentarse sintomatología sistémica. La mastitis subclínica en tanto, corresponde a infecciones intramamarias que producen una inflamación más leve de la glándula y que por lo tanto, hace que se requiera de algún método de diagnóstico de apoyo para su detección, como lo es el recuento de células somáticas en leche. Además, según su curso, la mastitis puede presentarse en forma aguda o crónica, pudiendo esta última tener manifestaciones clínicas o subclínicas (IDF, 1999).

Los agentes causantes de mastitis son numerosos y comúnmente se agrupan en agentes patógenos contagiosos y en agentes patógenos ambientales (IDF, 1999). Los agentes patógenos contagiosos principalmente se transmiten de una glándula mamaria infectada a otra, durante el proceso de ordeño y su reservorio principal es precisamente la glándula mamaria infectada. Entre los principales agentes patógenos contagiosos están *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma bovis* (Radostits *et al.*, 2002). En el caso de los agentes patógenos ambientales, la infección de la glándula mamaria se produce principalmente desde el ambiente. Dos grupos de bacterias son los principales agentes patógenos ambientales, los coliformes (principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*) y los Streptococos ambientales (*Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, principalmente), (Erskine, 2001). Además, existe el grupo de los llamados

patógenos mamarios menores, que normalmente no causan casos clínicos de mastitis. Dentro de los de mayor importancia se describen las especies de *Estafilococos coagulasa negativos* y *Corynebacterium bovis* (IDF, 1999).

La incidencia, prevalencia y proporción de agentes aislados de infecciones intramamarias y casos clínicos de mastitis es variable entre predios lecheros, siendo sus valores determinados principalmente por los factores de riesgo asociados a las características de cada tipo de sistema productivo. En un estudio realizado en la zona central de Chile, se observó una prevalencia de mastitis, en cualquiera de sus formas de presentación, de aproximadamente el 65% de las vacas (Moraga *et al.*, 1994). En otro estudio realizado en la misma zona geográfica del país (Azócar, 2001), se determinó una prevalencia de mastitis, en cualquiera de sus presentaciones, de aproximadamente el 88% de las vacas y una incidencia de mastitis clínica de aproximadamente 49% por año, mostrando mayores niveles en los meses de junio y julio.

En la zona central de Chile, los planteles lecheros son preferentemente de tipo confinados, por esa razón, teóricamente, en éstos tendería a ser más importante la mastitis de tipo ambiental, lo que concuerda con lo informado por Donoso (1997). En ese estudio se observó que el agente que en mayor proporción fue aislado de casos clínicos de mastitis fue *Escherichia coli* (38%), ubicándose en segundo lugar el grupo de los *Staphylococcus coagulasa negativos* (16%), en tanto que el aislamiento de *Staphylococcus aureus* solo alcanzó al 6%. En el estudio de Azócar (2001) en tanto, la mayor proporción de agentes aislados de los casos de mastitis clínica, correspondieron al grupo de los *Estafilococos coagulasa negativos* (25%), seguido por *Staphylococcus aureus* (10%) y dejando en un segundo plano a *Escherichia coli* (5%) y al resto de los otros agentes. Sin embargo, en este estudio, el número de casos de mastitis a los que se les realizó análisis bacteriológico fue menor.

2.2. Mastitis por coliformes

2.2.1. Etiología

Coliforme es un término general para referirse a un grupo de bacterias Gram negativas fermentadoras de lactosa, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Hogan y Smith, 2003). Los géneros de bacterias Gram negativas clasificados como coliformes son: *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Koneman *et al.*, 2006). Otras bacterias Gram negativas son capaces de generar cuadros de mastitis, pero estos cuadros presentan características diferentes a los provocados por los coliformes. Dentro de estas bacterias, se cuentan especies de *Serratia*, *Pseudomonas* y *Proteus*, pero tienen una importancia menor respecto a los coliformes (Hogan y Smith, 2003).

2.2.2. Presentación de la mastitis por coliformes

Los coliformes son bacterias clasificadas como agentes productores de mastitis de tipo ambiental (Radostits *et al.*, 2002). Raramente, cepas serológicamente idénticas de coliformes son aisladas de infecciones intramamarias provenientes de diferentes vacas dentro de un mismo rebaño, lo que apoyaría la naturaleza no contagiosa de esta clase de agentes y que el principal origen de las infecciones intramamarias por coliformes es el mismo ambiente en el que las vacas se encuentran (Erskine, 2001). Los coliformes habitan en gran cantidad de ambientes dentro de los planteles productivos, por lo que las vacas se encuentran en contacto casi permanente con dichos agentes. *Escherichia coli* es un habitante normal del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, por lo que es liberado al ambiente a través de las deposiciones. Las bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*, además de encontrarse en el tracto gastrointestinal de los animales, habitan en el agua, granos y en los suelos. Además de producir mastitis bovina, los coliformes son responsables de una serie de otras enfermedades, afectando los tractos respiratorio y urogenital, pero la transferencia de coliformes desde esas áreas hacia la glándula mamaria, no es significativa (Hogan y Smith, 2003).

Clínicamente, la mastitis por coliformes se puede presentar desde cuadros con sintomatología leve, hasta casos graves que pueden causar la muerte o eliminación prematura de la vaca afectada. Dentro de la sintomatología que se puede encontrar en los casos clínicos de mastitis por coliformes, está la inflamación variable de la glándula afectada, con secreción de consistencia acuosa o serosa y presencia de copos, signos sistémicos como fiebre e hiporexia, pudiendo en los casos graves, aparecer toxemia, decúbito y finalmente la muerte de la vaca afectada (Radostits *et al.*, 2002).

Las infecciones intramamarias producidas por coliformes, generalmente ocasionan cuadros clínicos de mastitis, siendo menos frecuente que causen infecciones subclínicas; por lo tanto contribuyen en menor medida a elevar los recuentos de células somáticas del rebaño (Harmon, 1994; Smith y Hogan, 2008). Entre el 80 a 90% de las infecciones intramamarias originadas por coliformes generan cuadros clínicos de mastitis; de éstos, la mayor proporción de casos son clasificados como moderados o leves, presentándose entre un 10 a un 30% de casos severos de mastitis (que presentan signos sistémicos), (Hogan *et al.*, 1989; Wenz *et al.*, 2001).

Las infecciones por coliformes frecuentemente tienen una corta duración, extendiéndose más de la mitad de éstas por menos de diez días (Smith *et al.*, 1985a). Esto implica que la prevalencia de infecciones por coliformes en los rebaños en general sea baja, excediendo raramente el 2% (Radostits *et al.*, 2002; Smith y Hogan, 2008). Sin embargo, la importancia de los coliformes radica en que estas bacterias pueden aislarse en un 30 a 40% de los casos clínicos de mastitis (Smith *et al.*, 1985a; Hogan *et al.*, 1989; Suriyasathaporn *et al.*, 2000). Además, la mastitis por coliformes, adquiere especial relevancia en rebaños bien manejados que poseen recuentos bajos de células somáticas (Suriyasathaporn *et al.*, 2000; Hogan y Smith, 2003).

Los casos de mastitis recurrentes o crónicos producidos por bacterias coliformes tienen relativamente poca importancia, pero aún así pueden presentarse (Smith *et al.*, 1985a). Dentro de los coliformes, es más probable que algunas cepas de *Klebsiella* spp. puedan

originar cuadros recurrentes de mastitis, que incluso se prolonguen a la lactancia siguiente (Smith y Hogan, 2008).

Los coliformes, en lo referente a la mastitis subclínica, tienen una menor importancia relativa respecto a otros agentes productores de este tipo de mastitis, existiendo una prevalencia de infecciones intramamarias subclínicas por coliformes, menor al 1,2% de los cuartos mamarios (Radostits *et al.*, 2002).

2.2.3. Patogenia

Las bacterias coliformes hacen su ingreso a la glándula mamaria a través del canal del pezón. Éste confiere a la glándula mamaria una barrera física y química frente a la invasión por parte de los agentes infecciosos y por lo tanto, es considerado como la primera línea de defensa en contra de la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002). Los coliformes, habitualmente hacen su ingreso a la glándula mamaria posterior al proceso de ordeña, aunque también esto puede suceder durante dicho proceso (Smith *et al.*, 1985a; Harmon, 1994). La manera como los coliformes atraviesan el canal del pezón actualmente no es completamente conocida, pero al ser estas bacterias agentes infecciosos oportunistas, es probable que lo atraviesen aprovechando momentos en que el canal disminuye su capacidad de barrera (Hogan y Smith, 2003), como lo son el período cercano al parto (Sordillo y Streicher, 2002) o posterior al proceso de ordeña, momento en el cual el canal del pezón puede encontrarse parcialmente abierto por un determinado tiempo (Mein *et al.*, 2001).

Las bacterias coliformes productoras de mastitis pueden poseer una amplia gama de factores de virulencia. Sin embargo, aparentemente, el único prerrequisito para producir un caso de mastitis sería el de tener la habilidad de crecer y multiplicarse en las secreciones de la glándula mamaria. Para esto, las bacterias *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. son capaces de fermentar lactosa y soportar tensiones bajas de oxígeno (Hogan y Smith, 2003). Además, algunas cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de casos de mastitis, poseen alta afinidad con el hierro, pudiendo así contrarrestar los efectos inhibitorios de la lactoferrina, altamente concentrada en la secreción de la glándula mamaria involucionada, durante el período seco

(Todhunter *et al.*, 1990). Los coliformes, aparentemente, no se adhieren a las superficies epiteliales internas de la glándula mamaria y simplemente se multiplican en la secreción mamaria. Este proceso puede ocurrir rápidamente, existiendo una correlación positiva entre el *peak* de coliformes presentes en la secreción de la glándula mamaria y la severidad del cuadro de mastitis (Hogan y Smith, 2003).

Una característica común a todas las bacterias Gram negativas, incluyendo a los coliformes productores de mastitis, es la presencia en la membrana externa de éstas, de lipopolisacáridos, en su conjunto también llamados endotoxina. Esta estructura es considerada como el principal factor de virulencia de los coliformes productores de mastitis (Hogan y Smith, 2003). El lipopolisacárido es una molécula altamente pro inflamatoria que se libera de las bacterias Gram negativas en el momento de su replicación o muerte (Bannerman *et al.*, 2003). Considerando que en menos de 24 horas de iniciada una infección intramamaria por *Escherichia coli*, el número de unidades formadoras de colonias puede alcanzar los 10^8 /mL (Hogan *et al.*, 1992a), la cantidad de lipopolisacárido liberado en el interior de la glándula mamaria sería bastante elevado (Burvenich *et al.*, 2003). Las manifestaciones clínicas de la infección por coliformes son resultado preferentemente de la interacción entre el lipopolisacárido y el sistema inmune del hospedero (Burvenich *et al.*, 2003) y, ya que las moléculas de lipopolisacárido liberadas dentro de la glándula mamaria pueden ser absorbidas al torrente sanguíneo (Dosogne *et al.*, 2002a), éstas pueden producir efectos tanto a nivel local como sistémico.

2.2.3.1. Estructura del lipopolisacárido

En las bacterias Gram negativas, la pared celular está compuesta de péptidoglicano, lipoproteínas, fosfolípidos de la membrana externa y el lipopolisacárido. Estas estructuras en su conjunto entregan protección osmótica a la bacteria Gram negativa (Cullor y Smith, 1996).

El lipopolisacárido de una cepa lisa de una bacteria Gram negativa está compuesto de una porción lipídica (lípidos A) y de un polisacárido, que a su vez está compuesto por una

porción central (antígeno central del lipopolisacárido), altamente conservada entre las diferentes especies y cepas de bacterias Gram negativas y de una unidad terminal (antígeno O), que es el que aporta la variabilidad antigénica entre las diferentes cepas y especies de bacterias Gram negativas (Cullor y Smith, 1996). El lípido A es el principal responsable de las propiedades inmunogénicas de la bacteria, gatillando una potente actividad de los macrófagos y la inducción de una importante producción de citoquinas y de otros mediadores, con múltiples efectos en diferentes órganos y tejidos (Morrison y Ryan, 1987). Por otra parte, las cepas rugosas de bacterias Gram negativas carecen del antígeno O del lipopolisacárido (Cullor y Smith, 1996).

2.2.4. Factores de riesgo

El ambiente en el que habitan las vacas juega un rol importante en la presentación de la mastitis por coliformes. Todos aquellos factores que aumenten la exposición de los pezones de las vacas a los coliformes ambientales, aumentan el riesgo de que ésta se produzca. Es más probable la ocurrencia de mastitis por coliformes en vacas que se encuentran en confinamiento permanente o durante algún período de su ciclo productivo, mientras que en vacas de pastoreo, por el menor nivel de exposición, ésta es mucho menos frecuente (Radostits *et al.*, 2002). En planteles en los que las vacas permanecen confinadas en cubículos, cuando no se realiza un correcto manejo higiénico de las camas, las vacas tienen un mayor riesgo de sufrir mastitis por coliformes. Además, la utilización de material orgánico de cama es un factor de riesgo adicional (Hogan y Smith, 2003) y específicamente las camas compuestas de aserrín o virutas contaminadas, pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de mastitis por *Klebsiella pneumoniae* (Radostits *et al.*, 2002). Los casos de mastitis por coliformes son más habituales en condiciones de alta temperatura y humedad (Hogan y Smith, 2003), por lo que existiría un factor de riesgo estacional y dependiendo de la zona geográfica, la mastitis por coliformes será más o menos frecuente en determinada estación del año.

La susceptibilidad de las vacas frente a la mastitis por coliformes, también se ve influenciada por factores propios del animal y la etapa productiva en la que éste se

encuentre. Además, la severidad de este tipo de mastitis está determinada principalmente por factores propios del animal, en lugar de los factores de virulencia del agente (Burvenich *et al.*, 2003). Las vacas en lactancia temprana tienen un riesgo considerablemente mayor de sufrir mastitis clínica por coliformes, decreciendo éste progresivamente a medida que la lactancia avanza (Smith *et al.*, 1985a). Además, es en aquel período cuando la severidad de los casos de mastitis por coliformes, es mayor (Burvenich *et al.*, 2003). Muchos de los casos clínicos que se desencadenan en la lactancia temprana tienen su origen en infecciones intramamarias que se producen durante el período seco (Hogan y Smith, 2003). Dentro de aquel período, las vacas son particularmente propensas a contraer infecciones intramamarias, particularmente en las dos semanas posteriores al secado y las dos últimas semanas previas al parto, siendo más probable que los casos de mastitis clínica por *Escherichia coli* se originen en las últimas dos semanas del período seco, mientras que en el caso de *Klebsiella* spp. en la primera mitad de este período (Smith *et al.*, 1985b).

En el periparto, las vacas lecheras ven altamente disminuida su capacidad inmunológica. Este fenómeno se produciría por la influencia de diferentes factores que están presentes en aquel período, como el ambiente hormonal dominante, los cambios metabólicos y el balance energético negativo (Burvenich *et al.*, 2003). Probablemente, estos factores influirían en que se desarrolle una respuesta preferentemente Th2 humoral, en desmedro de una respuesta Th1 celular, disminuyendo la capacidad de las células polimorfo nucleares de infiltrar la glándula mamaria y de realizar opsonización de los organismos patógenos, características que son relevantes en la defensa de la glándula mamaria bovina. Aumentado, de esta forma, el riesgo de que se produzca la mastitis (Taylor *et al.*, 1994; Burton y Erskine, 2003).

Además, otros factores como las características anatómicas del pezón, la edad de la vaca y el nivel de células somáticas en la leche, tendrían efecto sobre la susceptibilidad de las vacas a sufrir mastitis. Se ha observado, solo epidemiológicamente, que las vacas con un menor recuento de células somáticas tendrían un mayor riesgo de desarrollar mastitis clínica por coliformes (Suriyasathaporn *et al.*, 2000; Hogan y Smith, 2003).

2.2.5. Medidas de prevención

Actualmente, la prevención de la mastitis por coliformes sigue principalmente dos estrategias, las cuales no son excluyentes y pueden ser usadas en conjunto. Una de ellas se orienta a disminuir el desafío bacteriano al que se encuentran expuestas las vacas y la otra a mejorar la respuesta inmune de las vacas frente a los agentes causantes de mastitis por coliformes (Erskine, 2001).

2.2.5.1. Disminución del desafío bacteriano

La presencia de bacterias coliformes en el ambiente en el que habitan las vacas dentro de un sistema productivo, es normal y actualmente inevitable. Sin embargo, para prevenir la ocurrencia de mastitis por coliformes, es necesario disminuir al máximo la exposición de las vacas a estas bacterias (Radostits, 2002; Smith y Hogan, 2008).

Las medidas tendientes a disminuir la exposición de los pezones a los coliformes ambientales, se encuentran contenidas dentro de los diez puntos para la mantención de la salud mamaria recomendados por el National Mastitis Council (NMC, s.f). Entre éstos, es de gran importancia para la prevención de este tipo de mastitis, la mantención del ambiente en el que habitan las vacas lo más limpio, seco y confortable posible, teniendo especial atención en la cama de las vacas mantenidas en confinamiento. Para esto, en general es recomendable la utilización de materiales de cama inorgánicos y la realización de un correcto manejo de limpieza de ésta. Otra medida importante es la realización de una correcta rutina de ordeño, siendo aconsejable la utilización de productos desinfectantes previo a la ordeña, procedimiento conocido como *predipping*, (Hogan y Smith, 2003). Además, la realización de una correcta terapia de secado, con productos eficaces contra bacterias Gram negativas, aumentaría la protección frente a la mastitis (Bradley y Green, 2001). La utilización de *dipping* de barrera y selladores internos de pezón en el período seco podrían ser de utilidad como prevención de la mastitis por coliformes, pero esto aún no ha sido completamente demostrado.

2.2.5.2. Mejoramiento de la respuesta inmune

Históricamente se ha intentado mejorar la respuesta inmune de las vacas frente a la mastitis por coliformes preferente mediante vacunación. Entre los principales obstáculos que los investigadores han encontrado en el desarrollo de vacunas contra este tipo de bacterias, se incluyen: la disparidad de las diferentes especies y cepas de bacterias coliformes, el conocimiento incompleto de los mecanismos inmunológicos implicados en la defensa de la glándula mamaria bovina y el limitado mantenimiento de niveles adecuados de inmunoglobulinas en leche (Wilson y González, 2003). Aún así, se han logrado desarrollar vacunas que aumentan la resistencia de las vacas frente a la mastitis por coliformes. El desarrollo de estas vacunas ha sido considerado como uno de los grandes avances en el combate a las enfermedades bovinas dentro de los últimos 25 años (LeBlanc *et al.*, 2006). Una de las más estudiadas y utilizadas en la actualidad es la vacuna J5.

2.3. La vacuna J5

Esta vacuna corresponde a una bacterina de una cepa rugosa mutante de *Escherichia coli* del serotipo O111:B4 (González *et al.*, 1989). Es una de las más utilizadas en el mundo y la única disponible en Chile para el control de la mastitis por bacterias coliformes. El protocolo tradicional de vacunación recomendado por el fabricante (Pfizer Inc.), consiste en la aplicación subcutánea de tres dosis de la vacuna; la primera aplicada al momento del secado, la segunda 21 días previo al momento estimado del parto y la tercera, aproximadamente siete días posterior éste.

2.3.1. Mecanismo de acción

Aún cuando la vacuna J5 se ha utilizado con éxito como una herramienta en el combate a la mastitis por coliformes desde hace más de 15 años, los mecanismos mediante los cuales ésta actúa, actualmente no se encuentran completamente establecidos (Dosogne *et al.*, 2002b). Sin embargo, se han efectuado estudios con el objeto de aumentar la comprensión

del funcionamiento de la vacuna y de esta forma poder utilizarla de la mejor manera posible.

Esta bacterina es producida en base a una cepa rugosa mutante de *Escherichia coli* de serotipo O111:B4 (González *et al.*, 1989), la cual carece del antígeno O de la pared celular, dejando expuesto el antígeno central del lipopolisacárido (Elbein y Heath, 1965). Esta molécula, en contraste al antígeno O, se encuentra altamente conservada entre las diferentes especies y cepas de bacterias Gram negativas, lo que confiere la base de la protección cruzada que la vacuna J5 produce (Tyler *et al.*, 1990; Tyler *et al.*, 1992; Chaiyotwittayakun *et al.*, 2004).

La cadena de eventos que teóricamente se suceden en forma posterior a la aplicación de la vacuna J5, pueden aproximarse de modelos realizados en humanos y ratones (Guidry y O'Brien, 1997). Posterior a la aplicación subcutánea de la vacuna, el antígeno central del lipopolisacárido es reconocido por las células presentadoras de antígenos, que pueden ser macrófagos, células dendríticas o linfocitos B activos, el antígeno es procesado y posteriormente expuesto en la superficie celular, junto con las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Las células presentadoras de antígeno migran al los tejidos linfoides, donde se unen a las células T CD4⁺ (células T helper) y T CD8⁺ (células T citotóxicas o supresoras), células dotadas de memoria, mediante la cual es posible que se genere una respuesta más rápida y pronunciada en un segundo o tercer contacto con el antígeno bacteriano.

Las células T CD4⁺ se subdividen en células T helper 1 (Th1) y células T helper 2 (Th2), las cuales cuando se les presenta un antígeno generan distintas respuestas mediadas por diferentes grupos de citoquinas (Tizard, 2004). De esta forma, posterior a la presentación del antígeno en el tejido linfoide, se producen conjuntamente dos tipos de respuestas, una respuesta Th1 y otra Th2. La respuesta Th1 se caracteriza por, mediante la producción de ciertas citoquinas, producir la activación de macrófagos, células polimorfonucleares y promover la diapédesis y opsonización de los organismos patógenos, componentes de la respuesta celular. En la respuesta Th2, las citoquinas dominantes estimulan principalmente la activación de las células B, las que proliferan y se diferencian en células plasmáticas

productoras de anticuerpos, desencadenando una respuesta preferentemente humoral (Guidry y O'Brien, 1997). Numerosos factores influyen sobre el patrón de secreción de citoquinas y el consecuente predominio de una respuesta de base celular o humoral (Meglia y Mata, 2001).

Ambas vías son necesarias para que se produzca una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, la velocidad y la cantidad de células polimorfonucleares que realizan diapédesis hacia la glándula mamaria, promovida principalmente por la respuesta Th1, ejercerían un rol clave en la defensa de la glándula mamaria bovina frente a la mastitis. Por lo tanto, se apoya la tesis de que la respuesta Th1 sería la vía más importante por la cual el sistema inmune confiere protección contra la mastitis. (Kremer *et al.*, 1993; Van Werven *et al.*, 1997). A su vez la inmunoglobulina IgG2 es considerada como la principal opsonina que apoya la capacidad de fagocitosis de las células polimorfonucleares frente a los agentes patógenos (McGuire *et al.*, 1979), por lo que tendría importancia en la defensa de la glándula mamaria.

El mecanismo completo mediante el cual la vacuna J5 entrega protección a la glándula mamaria frente a la mastitis, actualmente no es completamente conocido. Sin embargo, se piensa que la vacuna podría inducir un estado de hiperactividad dentro de la glándula mamaria mediado por células T de memoria locales. Estas células podrían contribuir a la polarización de la respuesta inmune hacia la vía Th1, resultando en una mayor y más eficiente respuesta por parte de las células polimorfonucleares (Dosogne *et al.*, 2002b).

Se han realizado estudios que han evaluado la respuesta inmune inducida en el organismo de las vacas tras la aplicación de la vacuna J5. Hogan *et al.* (1992b) observaron que células polimorfonucleares provenientes de suero de vacas tratadas con el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, presentaron un mayor índice de opsonización *in vitro* contra *Escherichia coli* de cepa 487 (cepa aislada originalmente de casos naturales de mastitis clínica). En el caso de las células polimorfonucleares provenientes del calostro y leche de las vacas tratadas, solo se observó una tendencia de que esto sucediera. Además, dichos autores encontraron mayores concentraciones de inmunoglobulina IgG en el calostro de las

vacas tratadas y de IgM en el calostro y en muestras de leche tomadas a los 21 días post parto, evidenciando una relación positiva entre la concentración de IgM en suero y leche y el índice de opsonización *in vitro*. En otro estudio realizado por Hogan *et al.* (1992a), donde inocularon *Escherichia coli* cepa 487 en un cuarto mamario de vacas lecheras, se comprobó que las vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, en comparación a un grupo control, mostraron mayores títulos de IgG anti *Escherichia coli* J5 en el día 30 del período seco, al momento del desafío bacteriano intramamario (aproximadamente al día 30 post parto) y siete días posterior al desafío. Además, las concentraciones de IgG anti *Escherichia coli* J5 en leche fueron mayores en las vacas tratadas, al momento del desafío bacteriano. A su vez, no se encontraron diferencias en los títulos de inmunoglobulina IgM anti *Escherichia coli* J5 en suero, entre vacas tratadas y el grupo control.

Smith *et al.* (1999) inocularon a los 30 días post parto, *Escherichia coli* cepa 727 (cepa aislada originalmente de infecciones mamarias naturales), en un cuarto mamario de vacas lecheras. Se observó que las vacas a las que se les aplicó la vacuna J5 mediante el protocolo tradicional, presentaron, en comparación a un grupo control, mayores concentraciones de IgG contra *Escherichia coli* J5 en sangre, en el período seco, pero no durante la lactancia. Las concentraciones de IgG en la leche de las vacas tratadas fueron mayores al momento del desafío bacteriano y también siete días posterior a éste. Además, las vacas tratadas presentaron mayores concentraciones de inmunoglobulinas IgG contra *Escherichia coli* de cepa 727 en sangre y leche. En un estudio realizado utilizando vacas de raza Jersey (Tomita *et al.*, 2000), se halló que las vacas que recibieron el protocolo tradicional de la vacuna J5 presentaron, en comparación a vacas control, mayores títulos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 *Escherichia coli* J5, en los días 21 y 45 posterior al secado, al momento del parto y en los días 14, 21, 30 y 45 post parto. En un estudio más reciente, Hogan *et al.* (2005) observaron que las vacas que recibieron la vacuna J5, presentaron mayores títulos de inmunoglobulinas IgG anti *Escherichia coli* J5 en sangre al momento del parto, respecto a un grupo control.

La vacuna J5 no generaría una respuesta inmunogénica que se perpetúe en el tiempo. Erskine *et al.* (2007) observaron que los títulos de inmunoglobulinas IgG2 anti *Escherichia coli* J5 en sangre de vacas tratadas con la vacuna J5, no fueron diferentes en la lactancia siguiente a los de las vacas que no habían recibido la vacuna. Posteriormente, Erskine *et al.* (2010) comprobaron que los títulos de inmunoglobulina IgG1 contra *Escherichia coli* J5 en sangre, eran mayores en vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, respecto a un control, 84 días después de la última vacunación, pero a los 140 días no habrían diferencias. Además observaron que los títulos de inmunoglobulina IgG2 contra *Escherichia coli* J5 en sangre del grupo tratado, solo eran superiores, a los del grupo control, hasta el día 56 posterior a la última dosis aplicada.

2.3.2. Factores que afectan la respuesta a la vacuna J5

Dentro de los factores tratados en literatura, se señala que el estado inmunológico de las vacas lecheras en el período cercano al parto, de la misma manera que produce una respuesta deficiente frente a patógenos mamarios, afecta negativamente la respuesta a la vacuna J5, disminuyendo su efectividad. Esto sería debido a que en forma fisiológica la respuesta inmune de las vacas en el período cercano al parto se encontraría desplazada preferentemente hacia una respuesta Th2 humoral, en desmedro de la respuesta Th1 celular (Dosogne *et al.*, 2002b). La presencia de algunas enfermedades podría afectar negativamente la respuesta a la vacuna. Erskine *et al.* (2011) observaron que vacas positivas al virus de la leucemia bovina, posterior a ser inoculadas con la vacuna J5, presentaron menores títulos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 anti *Escherichia coli* J5 en sangre, respecto a vacas negativas al virus.

Factores propios de la vacuna y su forma de administración, también tendrían efecto sobre la respuesta a esta misma. Hogan *et al.* (2005) observaron que las vacas tratadas con una vacuna J5 que contenía un adyuvante en base a una emulsión de aceite en agua, generaron una mejor respuesta inmune que vacas tratadas con una vacuna J5 con un adyuvante soluble en agua. El sitio de administración también afectaría la respuesta. La administración de la vacuna J5, variando el sitio de aplicación subcutánea de las distintas dosis de un protocolo,

ha mejorado la respuesta a la vacuna (Erskine *et al.*, 2010). Además, la implementación de una aplicación intramamaria de la vacuna entre dos dosis subcutáneas, también ha logrado mejorar la respuesta inmune de las vacas (Hogan *et al.*, 1997).

2.3.3. Efectos de la vacuna J5: salud mamaria, producción de leche y fertilidad

Numerosos estudios han evaluado el efecto de la vacuna J5 sobre la salud mamaria, la producción de leche y la fertilidad de las vacas. Aunque en algunos casos los resultados han sido contradictorios, en general se acepta que la vacuna J5 tiene un efecto benéfico sobre la salud mamaria (Hogan y Smith, 2003; Ruegg, 2005).

González *et al.* (1989) evaluaron el efecto de un protocolo de tres dosis de la vacuna J5, repartidas en el tiempo en forma similar al protocolo de vacunación que actualmente es el más utilizado, encontrando que las vacas inmunizadas presentaron una razón de riesgo de 0,2 de sufrir mastitis clínica por coliformes en los tres primeros meses de lactancia, respecto a un grupo de vacas que no recibieron la vacuna. Hogan *et al.* (1992a) inocularon *Escherichia coli* de cepa 487 en un cuarto mamario de vacas lecheras y observaron que aquellas que recibieron el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, en comparación al grupo control, presentaron la misma incidencia de mastitis clínica, pero mostraron una menor severidad en los casos de mastitis clínica que desarrollaron. En un estudio posterior, se evaluó la incidencia de mastitis clínica contraída en forma natural en un predio productor de leche, observándose que las vacas tratadas con la vacuna J5 presentaban una tasa de cuartos mamaros infectados por bacterias Gram negativas al parto, similar al grupo control, pero en las vacas tratadas, una proporción menor de las infecciones intramamarias al parto se tornaban en casos de mastitis clínica al inicio de la lactancia. Además, en el grupo tratado existió una menor incidencia de mastitis clínica total, durante un año de observación (Hogan *et al.* 1992c). En otro estudio desarrollado por Hogan *et al.* (1995), se inocularon vacas lecheras con *Escherichia coli* de cepa 727, en uno de sus cuartos mamaros, comprobando que en aquellas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, los casos de mastitis clínica tuvieron una duración significativamente menor, respecto a las vacas del grupo control. Además, cuatro días después del desafío bacteriano,

la proporción de vacas tratadas que continuaron diseminando bacterias fue menor y adicionalmente éstas presentaron menores recuentos de células somáticas en leche, siete días después del desafío bacteriano; efecto que los autores no atribuyen a una menor respuesta inflamatoria en las vacas tratadas, sino a que en éstas el cuadro clínico tuvo una menor duración.

En contraposición a lo señalado anteriormente, en un estudio en que se compararon dos vacunas J5 comerciales en vacas raza Jersey, pese a que ambas elevaron considerablemente la concentración sanguínea de anticuerpos anti *Escherichia coli* J5 (IgG1 e IgG2), ninguna de las vacunas logró disminuir la severidad de los signos clínicos de casos de mastitis, inducidos artificialmente tras la inoculación de *Escherichia coli* 727 en un cuarto mamario (Tomita *et al.*, 2000). En otro estudio, las vacas a las que se les aplicaron vacunas J5 elaboradas mediante dos diferentes adyuvantes, desarrollaron sintomatología clínica menos severa, 21 y 72 horas posterior a la inoculación de *Escherichia coli* de cepa 727 en uno de sus cuartos, en comparación al grupo de vacas control, donde la duración de los cuadros clínicos de mastitis fue mayor (Hogan *et al.*, 2005). En un ensayo de campo, las vacas lecheras que recibieron el protocolo tradicional de la vacuna J5, en comparación a un grupo control no vacunado, no disminuyeron la incidencia de mastitis clínica ni la severidad de los casos, y solo se encontró una tendencia de que esto último sucediera. Tampoco la vacuna mejoró la fertilidad de las vacas, pero si se observó que posterior a al desarrollo de mastitis clínica, las vacas tratadas tuvieron una pérdida menor de producción de leche (Wilson *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2008). Pol *et al.* (2008) analizaron el efecto de una vacuna polivalente que contenía *Escherichia coli* J5 y Rotavirus bovino, sobre la incidencia de mastitis clínica. Las vacas que no recibieron la vacuna tuvieron un riesgo mayor de presentar mastitis clínica y una mayor una mayor severidad del cuadro clínico, en comparación a las vacas tratadas con la vacuna polivalente. Además, las vacas tratadas presentaron una menor tasa de eliminación asociada a mastitis.

2.3.4. Aplicación de dosis adicionales de la vacuna J5

Pese a que la implementación de manejos tendientes a disminuir la exposición de la glándula mamaria a los coliformes ambientales y la utilización de la vacuna J5 han resultado de gran utilidad en el control de la mastitis por coliformes, aún este tipo de mastitis sigue generando problemas en los planteles productores de leche. Como respuesta a esto, se han buscado métodos para aumentar la calidad y la duración de la protección que entrega la vacuna J5 frente a este tipo de mastitis. Uno de ellos, es la aplicación de dosis adicionales de la vacuna, con posterioridad a la tercera dosis establecida en el protocolo tradicional de vacunación.

Una primera aproximación a la investigación del efecto de dosis múltiples de la vacuna J5 fue realizado por Chaiyotwittayakun *et al.* (2004), utilizando novillos inoculados con la vacuna J5: en un tiempo 0, luego a los 30 días y posteriormente cada dos semanas en diez ocasiones sucesivas. En general, se observó una relación positiva entre el número de aplicaciones de la vacuna y las concentraciones de inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgM anti *Escherichia coli* J5 en suero. Se detectó que tras dos inmunizaciones, se lograba aumentar los títulos en suero sanguíneo de inmunoglobulinas IgM e IgG1 anti *Escherichia coli* J5, respecto a los niveles previos a la aplicación de la primera dosis, pero fueron necesarias cinco inmunizaciones para lograr aumentos significativos en los títulos de IgG2. Este resultado es importante de considerar, debido al rol clave que jugaría la inmunoglobulina IgG2 en la eficiente opsonización de los patógenos mamarios, por parte de las células polimorfonucleares (McGuire *et al.*, 1979; Burton y Erskine, 2003; Erskine *et al.*, 2007).

El primer estudio de campo en este ámbito fue realizado por Erskine *et al.* (2007), evaluando la respuesta a tres dosis adicionales de la vacuna J5, quienes observaron aumentos significativos en las concentraciones de inmunoglobulina IgG2 anti *Escherichia coli* J5 en las mediciones efectuadas 28 días después de cada dosis adicional de la vacuna, respecto a un grupo control de vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación; en este estudio, no se midieron otros tipos de inmunoglobulinas. Clínicamente, las vacas

tratadas presentaron la misma incidencia de mastitis que el grupo control, pero la probabilidad de sufrir casos de mastitis clínica severa entre los días 43 y 126 de lactancia fue menor en el grupo de vacas tratadas.

Más recientemente, en otro estudio realizado por Erskine *et al.* (2010), se observó que las vacas que recibieron cinco dosis de la vacuna presentaron mayores concentraciones de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 anti *Escherichia coli* J5, que vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación. Adicionalmente, un grupo de vacas que recibió la vacuna en diferentes sitios anatómicos en forma alternada (aplicaciones subcutáneas en la zona izquierda del cuello, derecha del cuello, izquierda del tórax, derecha del tórax y nuevamente en la zona izquierda del cuello), mostraron mayores concentraciones en sangre de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 anti *Escherichia coli* J5 que los otros grupos, 84 días después de la quinta aplicación de la vacuna. En este estudio no se evaluó la respuesta clínica de los animales.

Considerando los resultados alentadores obtenidos por Chaiyotwittayakun *et al.* (2004), Erskine *et al.* (2007) y Erskine *et al.* (2010), en relación al efecto de dosis adicionales de la vacuna J5 sobre la salud mamaria, en esta memoria se propone la implementación y evaluación de un protocolo de vacunación operativamente más simple que los desarrollados por (Erskine *et al.*, 2007; Erskine *et al.*, 2010), pero que podría aumentar protección frente a la mastitis por coliformes entregada por el protocolo tradicional de vacunación. Con dicha finalidad, se realizó un ensayo de campo cuyo propósito fue determinar el efecto de una dosis adicional de la vacuna J5, sobre la salud mamaria y algunas variables productivas y reproductivas de un rebaño lechero, en comparación con el protocolo tradicional de vacunación.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Comparar un protocolo de vacunación con una dosis adicional de la bacterina de *Escherichia coli* cepa J5, frente al protocolo tradicional de aplicación de la vacuna, en términos de protección de la salud mamaria, producción de leche y fertilidad.

3.2. Objetivos específicos

Determinar la eficacia del protocolo de vacunación propuesto, en relación al protocolo tradicional, evaluando para este fin la incidencia de mastitis clínica, la severidad de los casos, su duración, agente causal, el recuento de células somáticas en leche y la frecuencia de vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis.

Evaluar el efecto del protocolo de vacunación propuesto sobre la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia.

Comparar la fertilidad, expresada como tasa de concepción a la primera inseminación y días a la preñez, lograda con ambos protocolos de vacunación

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Ubicación y características del rebaño en estudio

Este estudio fue realizado en un predio lechero comercial ubicado en la Región de Valparaíso (Lat. 33°S), específicamente en la comuna de Casablanca, la cual posee un clima templado cálido con lluvias invernales, estación seca prolongada con nubosidad abundante, temperatura media de 14°C y precipitaciones del orden de 350 mm anuales, concentrándose el 80% de éstas entre los meses de mayo y agosto. (Dirección Meteorológica de Chile, s.f.). Durante el período comprendido entre abril de 2009 y noviembre de 2010, se estudiaron 1.062 lactancias de las 914 vacas que fueron incluidas en el estudio.

El rebaño, al comienzo del estudio, contaba con aproximadamente 710 vacas en ordeña, manejadas mediante un sistema de confinamiento permanente. Las vacas en inicio de lactancia (hasta aproximadamente los 30 días post parto) eran mantenidas en un galpón techado que contaba con cama de aserrín, la que se manejaba mediante el sistema de cama caliente. Posteriormente, las vacas de primera lactancia eran trasladadas a un galpón de características similares, mientras que aquellas de dos o más partos eran trasladadas a un recinto completamente techado, con cubículos individuales, provistos de cama de arena. Existía un grupo más reducido de vacas, correspondiente a los animales positivos a la prueba de tuberculina, que se mantenía en otra sección del predio en un sistema de cubículos individuales parcialmente techados.

El plantel dispone de un sistema computacional de registro y análisis de datos, con el cual se manejaba la información referente a los ítems productivos, reproductivos y sanitarios de las vacas (sistemas Afimilk® y DairyCOMP 305®). De esta forma, la producción de leche era controlada diariamente, cuantificándose la producción de cada ordeña, siendo registrada la producción diaria de las vacas en forma individual. La producción de leche del predio en promedio alcanzaba, al momento de iniciado el estudio, aproximadamente a 12.300 L por lactancia estandarizada.

Las vacas eran alimentadas mediante raciones formuladas por un médico veterinario especialista en alimentación bovina, basadas en los requerimientos del National Research Council (NRC, 2001). Éstas, eran preparadas utilizando insumos como heno y *soiling* de alfalfa, ensilaje de maíz, alimentos concentrados y aditivos. Las raciones, totalmente mezcladas, eran repartidas varias veces al día, mediante un carro forrajero, existiendo diferentes raciones de acuerdo a la etapa productiva en que las vacas se encontraban.

El predio cuenta con dos salas de ordeña, ambas con configuración en espina de pescado y línea media pendular, con 12 unidades de ordeña. Las vacas eran ordeñadas tres veces al día siguiendo la siguiente rutina: aplicación de *predipping*, realización de despunte, secado de pezones, colocación de la unidad de ordeña, retirado automático y aplicación de *dipping*. Al finalizar la lactancia, a todas las vacas se les realizaba terapia de secado y se les aplicaba además un sellador interno de pezones

En cuanto a la sanidad mamaria del rebaño, al momento de iniciado el estudio la incidencia de mastitis clínica era cercana al 6% mensual y el promedio del recuento de células somáticas de la leche del estanque alcanzaba aproximadamente a 250.000 cel/mL.

4.2. Diseño experimental

El estudio consistió en un ensayo de campo, donde las vacas fueron clasificadas en dos grupos experimentales: aquellas que recibieron el protocolo propuesto, formaron el grupo de vacas tratadas o grupo tratamiento; mientras que a las que se les aplicó el protocolo de vacunación tradicional, integraron el grupo control. La asignación de las vacas a cada grupo se realizó semanalmente en forma alternada, según orden de parición. Esto se realizó de tal manera, con el fin de garantizar la aleatoriedad de la asignación de las vacas a los grupos de estudio y distribuir los controles y tratamientos durante el año de la forma más homogénea posible y así disminuir un eventual efecto de la estación del año sobre los resultados del estudio.

La asignación de las vacas a ambos grupos experimentales se llevó a cabo en el momento del examen ginecológico, entre los días 28 a 35 post parto. Momento en el cual, si correspondía a una semana en la que las vacas debían ser asignadas al grupo tratado, dichas vacas recibían la dosis adicional de la vacuna, correspondiente al protocolo propuesto. Mientras que en el caso de corresponder a una semana en la que las vacas se debían asignar al grupo control, éstas no recibían la dosis adicional de vacunación y únicamente quedaban registradas en dicho grupo, para su posterior seguimiento.

Para la inmunización de las vacas se empleó una bacterina de *Escherichia coli* de una cepa mutante J5 (Enviracor®; Pfizer Inc.). La aplicación de la vacuna se realizó según las recomendaciones del laboratorio fabricante, se inocularon 5 mL de la bacterina vía subcutánea en la zona escapular. Las vacas de dos o más lactancias del grupo control fueron inmunizadas siguiendo el protocolo de vacunación recomendado por el laboratorio fabricante, compuesto por tres dosis de la vacuna distribuidas de la siguiente forma: la primera dosis se aplicaba al momento del secado (aproximadamente 60 días antes de la fecha probable de parto), la segunda dosis, se administraba aproximadamente 21 días previo a la fecha probable del parto y la tercera dosis, se aplicaba aproximadamente siete días después del parto. En el caso del grupo tratado, las vacas de dos o más lactancias recibieron las mismas tres dosis que las del grupo control, distribuidas y aplicadas de la misma forma. Además, a estas vacas se les aplicó una dosis adicional de la bacterina, administrada entre los días 28 a 35 post parto. Consecuentemente, y siguiendo las recomendaciones del laboratorio fabricante, en ambos grupos, las vacas de primera lactancia no recibieron la primera dosis de la vacuna. Por lo tanto, las vacas de primera lactancia pertenecientes al grupo tratado recibieron tres dosis de la vacuna, mientras que en el grupo control, a dichas vacas, se les aplicó únicamente dos dosis de la bacterina.

4.3. Obtención de la información

El período de observación, recopilación y registro de datos se extendió hasta el día 200 post parto de cada vaca. Durante dicho período se recolectaron los siguientes datos, para la comparación de éstos entre las vacas tratadas y controles:

- Se registró cada caso de mastitis clínica, incluyendo la identificación de la vaca, cuarto(s) afectado(s), agente causal, severidad, fecha de inicio, fecha de alta y duración del cuadro.
- Se registró la producción diaria de leche de cada vaca, determinada electrónicamente por el sistema Afimilk®.
- Se tomó una muestra mensual de leche de cada vaca, la cual fue enviada a Cooprinsem (Osorno), para realización del recuento de células somáticas; disponiéndose de un máximo de seis muestras por vaca, para el período de estudio.
- Se registraron las eliminaciones y muertes de vacas hasta el día 200 post parto y sus causas.
- Se calculó la tasa de concepción a la primera inseminación y los días a la preñez de las vacas.

Para la detección de los casos de mastitis clínica, el personal encargado realizaba en forma rutinaria, previo al proceso de ordeña, la inspección de la leche con ayuda de un recipiente de fondo oscuro. De esta forma se podía detectar la leche que presentaba alguna anomalía, apartando a la vaca del proceso de ordeña. Posteriormente se realizaba un examen clínico más detallado a las vacas con anomalías en la leche, determinando las características de el(los) cuarto(s) afectado(s), así como también el posible compromiso sistémico de la vaca y estableciendo el tratamiento adecuado para cada caso. Siguiendo las recomendaciones de la International Dairy Federation (IDF, 1999), para la declaración de un nuevo caso de mastitis, se espera que se cumpliera un plazo mínimo de ocho días desde la finalización de los signos clínicos del caso anterior.

La clasificación de la severidad de los casos de mastitis clínica también se realizó según el método recomendado por la International Dairy Federation (IDF, 1999). Mediante el examen clínico efectuado se evaluaron y clasificaron las mastitis en tres grupos:

- Mastitis clínica leve: solo se pueden apreciar anomalías en la leche, pero no existen signos sistémicos ni alteraciones en el cuarto mamario afectado. En la leche se pueden observar: cambios de coloración y consistencia, y presencia de grumos, pus y/o coágulos.
- Mastitis clínica moderada: se aprecian alteraciones en la leche y en el cuarto mamario afectado, sin signos sistémicos. El cuarto mamario manifiesta signos de inflamación, tales como: tumoración difusa, alteración de la temperatura normal (aumento o disminución) y/o induración del tejido mamario
- Mastitis clínica severa: se aprecian alteraciones en la leche, en el cuarto mamario afectado y además se observan signos clínicos sistémicos. Dentro de los cuales están: fiebre, depresión, descenso en el consumo de alimento y en casos más severos decúbito y muerte.

Posterior a la detección de cada caso de mastitis clínica, se procedía a tomar una muestra de leche de el(los) cuarto(s) que se encontraba(n) afectado(s), con el fin de realizar un análisis bacteriológico. Se tomaron muestras en aproximadamente el 50% de los casos de mastitis registrados. La toma de las muestras se efectuó en forma aséptica siguiendo las recomendaciones del National Mastitis Council (NMC, 2004). Primero se realizaba el lavado y secado de los pezones con una toalla desechable, luego se procedía a la eliminación de los primeros chorros de leche y a sumergir el pezón en una solución desinfectante de *predipping*, dejando actuar la solución por al menos 30 segundos, para posteriormente secar el pezón con una toalla desechable. Luego se desinfectaba la punta del pezón y el orificio de entrada del canal del pezón con una solución de alcohol al 70% mediante un algodón individual para cada pezón. Finalmente la muestra era recolectada en tubos estériles.

El análisis de las muestras de leche fue realizado mediante cultivo bacteriológico en placas (Placas Trimastitis®; Laboratorios Linsan, Santiago, Chile). Estas placas contienen tres medios de cultivo y están diseñadas para permitir el desarrollo selectivo de las principales bacterias involucradas en los cuadros de mastitis. Poseen un medio de cultivo a base de agar sangre y esculina, en el que se desarrollan organismos Gram positivos (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp), un medio MacConkey donde se desarrollan microorganismos Gram negativos, diferenciando entre *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. e inhibiendo el desarrollo de organismos Gram positivos. Por último, tienen un medio Manita-Sal específico para el desarrollo de *Staphylococcus aureus*. Las muestras fueron cultivadas en una estufa a 35°C por 24 horas, en un lugar especialmente acondicionado, dentro del mismo predio. De esta manera, se pudo determinar el tipo de agente responsable de los cuadros de mastitis clínica y clasificarlas, para fines de este estudio, en mastitis causadas por bacterias Gram negativas o Gram positivas.

4.4. Análisis de resultados

La información recopilada en el estudio se analizó utilizando el programa estadístico Minitab 15®. Para todos los análisis se utilizó un nivel de significancia de 95%.

Para poder estudiar el efecto del número de lactancias, los animales fueron clasificados en vacas de primera, segunda y de tres o más lactancias.

4.4.1. Salud mamaria

Para el análisis de los resultados referentes a salud mamaria, se utilizaron los siguientes métodos:

- Se calcularon y tabularon las incidencias de mastitis clínica del grupo de vacas tratadas y del grupo control, posteriormente éstas fueron comparadas mediante la prueba de χ^2 .
- Para analizar el efecto del protocolo de vacunación propuesto sobre la severidad de los casos de mastitis clínica, éstos se agruparon en dos categorías: mastitis severas y mastitis no severas, incluyéndose en esta última categoría las mastitis leves y moderadas. Para evaluar la variable respuesta severidad (mastitis severa o mastitis no severa), se realizó un análisis de regresión logística binaria, considerando los efectos del tratamiento (tratadas o control) y del número de lactancia (1, 2 ó 3 ó más lactancias), de acuerdo al siguiente modelo:

$$p = \frac{1}{1 + e^{(-\alpha - \beta_i T_i - \beta_j L_j)}}$$

Donde:

Y = Mastitis severa (0: mastitis no severa; 1: mastitis severa)

p = Probabilidad de que Y = 1

α = Intercepto

β_i = Parámetro de tratamiento

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (i = 0: control; 1: tratamiento)

β_j = Parámetro número de lactancia

L_j = Efecto del j-ésimo número de lactancia (j = 1, 2 ó 3 ó más lactancias)

- La duración de los cuadros de mastitis clínica se estudió a través de análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM, considerando los efectos del tratamiento (tratadas o control), del número de lactancia (1, 2 ó 3 ó más lactancias) y de la interacción entre éstos, de acuerdo al siguiente modelo:

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

Donde:

Y_{ij} = Duración del cuadro de mastitis clínica

T_i = Efecto de i-ésimo tratamiento (i = 0: control; 1: tratamiento)

L_j = Efecto del j-ésimo número de lactancia (j = 1, 2 ó 3 ó más lactancias)

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

e_{ij} = Error

Las comparaciones de las medias entre los diferentes efectos y sus interacciones, se realizaron mediante la prueba de Tukey.

- Para la evaluación de los recuentos de células somáticas en leche (RCS) mensuales. Éstos fueron transformados a puntajes lineales (PCS), con el fin de normalizar sus valores y, de ésta manera, permitir la aplicación de la estadística paramétrica para su análisis. La transformación a PCS se realizó utilizando la siguiente fórmula (Ali y Shook, 1980):

$$PCS = \text{Log}_2 (RCS / 100.000) + 3$$

Posteriormente, las PCS fueron analizadas mediante un análisis de varianza para medidas repetidas, considerando los efectos del tratamiento (tratadas o control), del número de lactancia (1, 2 ó 3 ó más lactancias), del número ordinal del muestreo (primero a sexto) y de sus interacciones biológicamente relevantes, de acuerdo al 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 (PCS)

T_i = Efecto de i-ésimo tratamiento (i = 0: control; 1: tratamiento)

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

L_k = Efecto de la k-ésimo número de lactancia (k = 1, 2 ó 3 ó más lactancias)

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

e_{ijk} = Error

Las comparaciones de las medias entre los diferentes efectos y sus interacciones, se realizaron mediante la prueba de Tukey.

- Para el análisis del efecto del protocolo de vacunación propuesto, sobre el agente causal responsable de las infecciones intramamarias de tipo clínico, según los resultados bacteriológicos, las mastitis fueron clasificadas en mastitis ocasionadas por bacterias Gram negativas y ocasionadas por bacterias Gram positivas. Las proporciones calculadas fueron comparadas mediante la prueba de χ^2 .
- Las proporciones de las vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis, ocurridas en el grupo de vacas tratadas y en el grupo control, fueron comparadas mediante la prueba de χ^2

4.4.2. Producción de leche

Para el análisis de la producción de leche, se calcularon las producciones acumuladas a los 100 días de lactancia y éstas se estudiaron a través de un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM, considerando los efectos del tratamiento (tratadas o control), del número de lactancia (1, 2 ó 3 ó más lactancias), de la presencia de mastitis clínica (PM) en el período comprendido entre el momento de la asignación de las vacas a los grupos experimentales y el día 100 post parto (0: ausencia de mastitis; 1: presencia de mastitis) y de las interacciones biológicamente relevantes entre las variables, de acuerdo al siguiente modelo:

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

Donde:

Y_{ijk} = Producción de leche acumulada a los cien días de lactancia

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (i = 0: control; 1: tratamiento)

L_j = Efecto del j-ésimo número de lactancia (j = 1, 2 ó 3 ó más lactancias)

PM_k = Efecto de la k-ésima presencia de mastitis clínica (k = 0: ausencia de mastitis; 1: presencia de mastitis)

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

$(T*PM)_{ik}$ = Efecto de la interacción tratamiento por presencia de mastitis

e_{ijk} = Error

Las comparaciones de las medias entre los diferentes efectos y sus interacciones se realizaron mediante la prueba de Tukey.

4.4.3. Fertilidad

El análisis de la fertilidad de las vacas del estudio, se llevó a cabo utilizando los siguientes métodos:

- La tasa de concepción a la primera inseminación (vaca queda preñada o no queda preñada en la primera inseminación) se analizó utilizando regresión logística binaria, considerando los efectos del tratamiento (tratadas o control), del número de lactancia (1, 2 ó 3 ó más lactancias), de la producción de leche en el día de la inseminación (variable continua) y de la presencia de mastitis clínica (PM) en el período posterior a la asignación de las vacas a los grupos de estudio (0: ausencia de mastitis; 1: presencia de mastitis), según el siguiente modelo:

$$p = \frac{1}{1 + e^{(-\alpha - \beta_i T_i - \beta_j L_j - \beta_k P_k - \beta_m PM_m)}}$$

Donde:

Y = Concepción a la primera inseminación (0: no queda preñada en la primera inseminación; 1: queda preñada en la primera inseminación)

p = Probabilidad de que Y = 1

α = Intercepto

β_i = Parámetro de tratamiento

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (i = 0: Control; 1: Tratamiento)

β_j = Parámetro número de lactancia

L_j = Efecto del j-ésimo número de lactancia (j = 1, 2 ó 3 ó más lactancias)

β_k = Parámetro de producción al momento de la inseminación

P_k = Efecto de la producción al momento de la inseminación (variable continua)

β_m = Parámetro de presencia de mastitis clínica

PM_m = Efecto de la m-ésima presencia de mastitis clínica (k = 0: ausencia de mastitis; 1: presencia de mastitis)

- Los días a la preñez se analizaron a través del método de las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier. Las curvas generadas se compararon mediante la prueba log-rank.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Incidencia de mastitis clínica

Se registraron los casos de mastitis clínica ocurridos entre el parto, y el día 200 post parto en el grupo de vacas tratadas (n = 474 lactancias) y en el grupo control (n = 588 lactancias). Considerando las 1.062 lactancias estudiadas, se registraron 614 casos de mastitis clínica durante todo el período de observación. Todos los cálculos sobre incidencia de mastitis clínica que se presentan a continuación, fueron realizados en base al número de vacas en riesgo para cada caso y no en base al número de cuartos mamarios en riesgo.

Para el total de las vacas en estudio, durante el período de tiempo comprendido entre el parto y la asignación de las vacas a los grupos de estudio, el cual alcanzó en promedio 31 días, se registraron 93 casos de mastitis clínica, lo que equivale a una incidencia de 8,75%. En la etapa comprendida entre la asignación de las vacas a sus correspondientes grupos de estudio y el final del período de observación (día 200 post parto), se registraron 521 casos de mastitis clínica, equivalentes a una incidencia de 49,05%. Esta etapa se dividió en seis períodos de cuatro semanas (28 días), presentándose en la tabla 1 la incidencia de mastitis clínica correspondiente a cada período. Además, posterior al sexto período, se registraron siete casos adicionales, completando así los 614 casos registrados durante la totalidad del estudio.

En la etapa que se extendía entre el parto y la asignación de las vacas a sus respectivos grupos experimentales, el grupo de vacas tratadas presentó 44 casos de mastitis clínica, lo que corresponde a una incidencia de 9,28%, mientras que en el grupo control se registraron 49 casos, lo que equivale a una incidencia de 8,33%, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0,13$). Esta situación era esperable y deseable, ya que hasta ese momento, las vacas de ambos grupos habían recibido la misma cantidad de dosis de la vacuna, aplicadas y repartidas en el tiempo de la misma forma, por lo que deberían tener el mismo riesgo de presentar mastitis clínica en el período previo a su asignación a los grupos experimentales.

Tabla 1: Frecuencia e incidencia (%) de casos de mastitis clínica (MC), en cada período de cuatro semanas posterior a la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio, para la totalidad de las vacas, independientemente de su grupo de estudio.

Período	Casos de MC	Incidencia
1°	103	9,69%
2°	105	9,87%
3°	86	8,09%
4°	87	8,19%
5°	66	6,21%
6°	67	6,3%

Durante el período comprendido entre el momento de la asignación de las vacas a los grupos de estudio y el día 200 post parto, en el grupo de vacas tratadas se registraron 239 casos de mastitis clínica, equivalente a una incidencia de 50,42%, en tanto que en el grupo control, se produjeron 282 casos de mastitis clínica, lo que corresponde a una incidencia de 47,95%, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las incidencias de mastitis clínica de ambos grupos experimentales ($p = 0,46$).

Se calcularon las incidencias de casos de mastitis clínica, producidos en cada uno de los períodos posteriores a la asignación de las vacas a los grupos de estudio, para el grupo tratado y el control (Figura 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, para las incidencias de mastitis clínica entre ambos grupos, en ninguno de dichos períodos (Tabla 2).

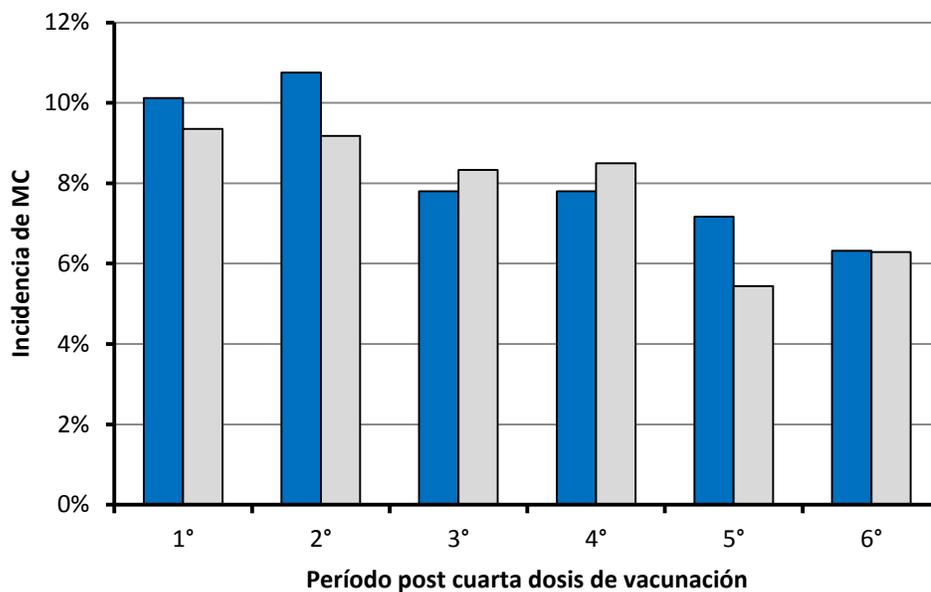


Figura 1: Incidencia de mastitis clínica (MC), para cada período de cuatro semanas posterior a asignación de las vacas a sus correspondientes grupos de estudio. Las barras azules representan al grupo de vacas tratadas (n = 474), mientras que las barras grises al grupo control (n = 588)

Tabla 2: Incidencia de mastitis clínica (%), en cada período de cuatro semanas posteriores al momento de la asignación de las vacas a los grupos experimentales, para el grupo tratado (n = 474) y para el control (n = 588).

Período	Grupo tratado	Grupo control	p (*)
1°	10,12%	9,35%	0,68
2°	10,75%	9,18%	0,41
3°	7,8%	8,33%	0,82
4°	7,8%	8,5%	0,74
5°	7,17%	5,44%	0,25
6°	6,32%	6,29%	> 0,9

(*): Significancia estadística de la comparación entre las incidencias de mastitis clínica de las vacas tratadas y controles, para cada período.

Al realizar el análisis de la incidencia de mastitis clínica, independiente de su grupo de estudio, según el número de lactancia de las vacas (1, 2 ó 3 ó más lactancias), considerando los casos de mastitis clínica ocurridos entre el momento de la asignación de las vacas a sus respectivos grupos y el día 200 post parto, se observó que en el grupo de vacas de primera lactancia (n = 418) hubo 123 casos de mastitis clínica, lo que corresponde a una incidencia de 29,42%; en el grupo de segunda lactancia (n = 273) se produjeron 120 casos, equivalentes a una incidencia de 43,95% para ese grupo; en el caso de las vacas de tres o más lactancias (n = 371) se registraron 278 casos, correspondiendo a una incidencia de 74,93%.

Por otra parte, la comparación entre ambos protocolos de vacunación, no demostró diferencias estadísticamente significativas en las incidencias de mastitis clínica, entre las vacas tratadas y controles, para ninguno de los grupos de número de lactancia ($p = 0,45$; $p = 0,46$ y $p = 0,63$, para el grupo de primera, segunda y de tres o más lactancias, respectivamente), como se muestra en la figura 2.

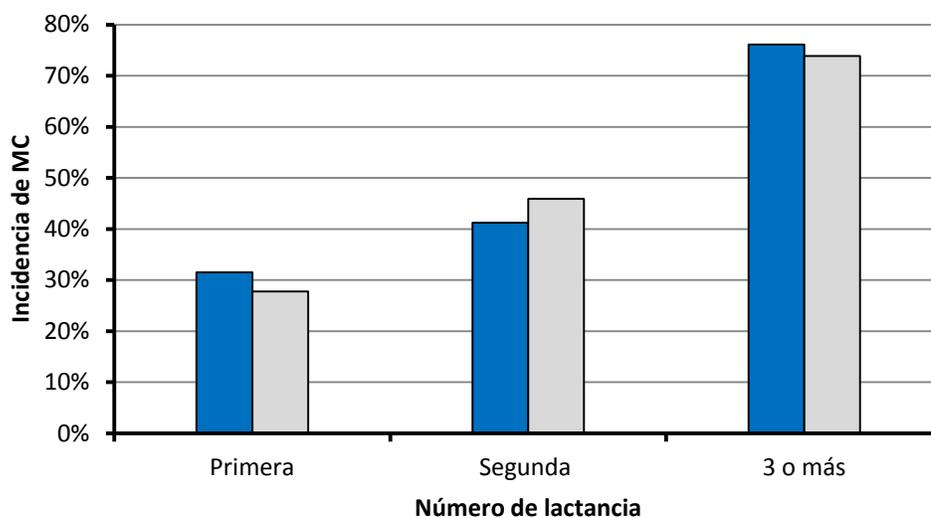


Figura 2: Incidencia de mastitis clínica (MC) por número de lactancia, para los casos ocurridos entre la asignación de las vacas a los grupos de estudio y el día 200 post parto. Las barras azules representan al grupo de vacas tratadas (n = 474), mientras que las barras grises corresponden al grupo control (n = 588).

De las 1.062 lactancias analizadas, durante el período comprendido entre la asignación de las vacas a sus respectivos grupos experimentales y el día 200 post parto, 191 vacas (17,98%) sufrieron mastitis clínica en una ocasión, 120 vacas (11,3%) presentaron más de un caso, mientras que 751 vacas (70,72%) no sufrieron mastitis clínica. En el grupo de vacas tratadas (n = 474), 87 vacas (18,35%) presentaron solo un caso de mastitis clínica, 57 vacas registraron más de un caso (12,03%) y 330 vacas (69,62%) no sufrieron mastitis clínica, en ese período de tiempo. En el caso del grupo control (n = 588), 104 vacas (17,69%) sufrieron un caso de mastitis clínica, 63 vacas (10,71%) presentaron más de un caso, mientras que 421 vacas (71,6%) no sufrieron mastitis clínica, en el mismo período de tiempo. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, para las proporciones previamente señaladas ($p = 0,74$).

Al analizar las recurrencias de casos clínicos de mastitis, considerando las 88 vacas que sufrieron por lo menos un caso de mastitis clínica previo a su asignación a los grupos de estudio, se observó que en el grupo de vacas tratadas (n = 41), 19 de éstas volvieron a sufrir por lo menos un caso de mastitis clínica posterior a la aplicación de la dosis adicional de la vacuna, lo que corresponde a un 46,34% de las vacas. En el caso del grupo control (n = 47), 25 vacas volvieron a sufrir mastitis, correspondiente a un 53,19% de las vacas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas, en la proporción de vacas tratadas que volvieron a sufrir mastitis clínica, posterior a la aplicación de la dosis adicional de la vacuna, en comparación al grupo control ($p = 0,53$).

En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de mastitis clínica entre el grupo de vacas tratadas y el control, observándose los mismos resultados cuando se compararon las incidencias de mastitis clínica entre tratamientos, cuando fueron comparadas dentro de los grupos de primera, segunda y de tres o más lactancias. Tampoco se observó que la dosis adicional de la vacuna, disminuyera la proporción de vacas que sufrieron más de un caso de mastitis clínica ni que protegiera a las que habían sufrido mastitis clínica previo a la aplicación de la dosis adicional de la vacuna, de volver a sufrirla durante la lactancia.

La interpretación de los resultados entregados por este estudio se ve dificultada por la poca información disponible referente a los efectos de dosis adicionales al protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, sobre la salud mamaria. En estudios previos se ha evaluado el efecto del protocolo tradicional de tres dosis de la vacuna sobre la incidencia de mastitis clínica, encontrándose resultados disímiles. González *et al.* (1989) observaron que las vacas a las que no se les aplicó la vacuna J5 tuvieron un riesgo cinco veces mayor de sufrir mastitis clínica por coliformes, en forma natural, durante sus primeros tres meses de lactancia, en comparación a las vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación. En otro estudio en el que se evaluó la incidencia de mastitis clínica contraída en forma natural, se observó que vacas tratadas tenían la misma tasa de cuartos infectados con bacterias Gram negativas al parto que el grupo control, pero en las vacas tratadas una menor proporción de infecciones intramamarias evolucionaron en mastitis clínica (Hogan *et al.*, 1992c). Por otra parte, en un estudio en el que a vacas se les inoculó uno de los cuartos de sus glándulas mamarias con *Escherichia coli* cepa 487 (originalmente aislada de casos naturales de mastitis clínica), aquellas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación tuvieron la misma incidencia de mastitis clínica que el control (Hogan *et al.*, 1992a). En un estudio más reciente, Wilson *et al.* (2007) no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre vacas tratadas y controles, en la probabilidad de desarrollar en forma natural por lo menos un caso de mastitis clínica, durante la lactancia.

En cuanto al efecto de dosis adicionales de la vacuna sobre la incidencia de mastitis clínica, Erskine *et al.* (2007) compararon la incidencia de mastitis clínica adquirida en forma natural, entre vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación y otras a las que se les aplicó un protocolo compuesto de seis dosis de la vacuna. Al igual que en el presente estudio, dichos autores no observaron que las dosis adicionales de la bacterina produjesen una disminución en la incidencia de mastitis clínica.

La ausencia de una disminución en la incidencia de mastitis clínica en el grupo tratado respecto al control, podría deberse a que la vacuna J5 no prevendría la infección de la glándula mamaria por parte de las bacterias coliformes, sino que disminuiría la severidad de

las manifestaciones clínicas de las infecciones intramamarias por bacterias Gram negativas, que se producen. Este último efecto, fue observado en el estudio que Erskine *et al.* (2007), evaluando el efecto de dosis adicionales de la vacuna J5. La disminución en la incidencia de mastitis clínica que el protocolo tradicional de vacunación ha demostrado en otros estudios (González *et al.*, 1989; Hogan *et al.*, 1992c; Pol *et al.*, 2008), puede ser explicada porque la vacuna J5 actuaría disminuyendo la proporción de infecciones intramamarias presentes al momento del parto que se tornan en casos clínicos de mastitis durante la lactancia temprana, pero no previniendo las infecciones intramamarias que se producen.

5.2. Severidad de los casos de mastitis clínica

De los 614 casos de mastitis clínica registrados durante el estudio, se logró realizar diagnóstico de severidad en 598 de éstos, lo que representa un 97,39% del total. De éstos, 226 fueron diagnosticados como mastitis leve (37,79%), 213 casos como mastitis moderada (35,62%) y 159 correspondieron a mastitis severa (26,59%).

Para el estudio de la severidad de los casos de mastitis mediante regresión logística binaria, éstos se clasificaron en dos grupos; uno que reunía los casos leves y moderados (mastitis no severas) y otro grupo que correspondía a los casos severos de mastitis. Como se mencionó anteriormente, las mastitis severas alcanzaron el 26,59% de los casos, mientras que las no severas sumaron en conjunto 439 casos, lo que equivale a un 73,41% del total de mastitis a las que se les realizó diagnóstico de severidad.

En el período (de en promedio 31 días) comprendido entre el parto y la asignación de las vacas a sus respectivos grupos experimentales, se realizó diagnóstico de severidad a 89 casos de mastitis clínica, de los cuales 37 fueron diagnosticados como severos, lo que corresponde a un 41,57%. La etapa que se extendía entre la asignación de las vacas a los grupos de estudio y el final del período de observación, se dividió en periodos de cuatro semanas (28 días). La distribución de la severidad de los casos en dichos períodos fue la siguiente: en el primer período posterior a la asignación de las vacas a ambos grupos de estudio se le realizó diagnóstico de severidad a 102 casos de mastitis clínica, de los cuales

29 fueron diagnosticados como severos (28,43%); en el segundo período, de 103 casos 27 fueron severos (26,21%); en el tercer período, de 85 casos 19 fueron severos (22,35%); en el cuarto período, de 85 casos 14 fueron severos (16,47%); en el quinto período, de 65 casos 12 fueron severos (18,46%) y en el sexto período, de 63 casos a los que se les realizó el diagnóstico de severidad 20 de éstos fueron severos (31,74%).

Al considerar los casos de mastitis clínica registrados entre el parto y el momento de la asignación de las vacas a sus respectivos grupos experimentales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la severidad de éstos, entre el grupo de vacas tratadas y el grupo control ($p = 0,38$). De ello se desprende que ambos grupos de vacas tenían el mismo riesgo de que los casos de mastitis clínica que desarrollaron previo a su asignación a los grupos de estudio, fueran severos. Esta situación era esperable debido a que hasta ese momento, ambos grupos de vacas habían recibido la misma cantidad de dosis de la vacuna, aplicadas y repartidas en el tiempo de la misma forma.

Al evaluar la severidad de los casos de mastitis clínica registrados entre el momento de la asignación de las vacas a los grupos de estudio hasta el día 200 post parto, se observó que en el grupo de vacas tratadas, de 233 casos de mastitis clínica que se registraron en ese período, 63 de éstos fueron diagnosticados como mastitis severas, correspondientes a un 27,04% de los casos. En el grupo de vacas control, de 276 casos de mastitis clínica se registraron 96 casos severos, lo que corresponde a un 34,78% de los casos. Al realizar regresión logística binaria se determinó que las vacas del grupo tratadas, en comparación con el grupo control, obtuvieron una razón de riesgo (odd ratio, OR) de 0,72 (IC 95%: 0,47 - 1,09; $p = 0,12$), de que al sufrir mastitis clínica, ésta fuera severa. Estos resultados indicarían una menor proporción de casos severos de mastitis clínica, en las vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna. Sin embargo, el análisis de regresión logística binaria no demostró diferencias estadísticamente significativas para el riesgo de sufrir mastitis clínica severa, de ambos grupos de vacas, para ese período de tiempo.

Considerando el total de casos registrados en este mismo período, al realizar el análisis según número de lactancia de las vacas, aún cuando en los tres grupos de número de

lactancia, la proporción de casos severos fue menor en las vacas tratadas, la diferencia en el riesgo de producción de mastitis clínica severa, no fue estadística significativo ($p = 0,79$; $p = 0,48$; $p = 0,12$; para el grupo de primera, segunda y de tres o más lactancias, respectivamente).

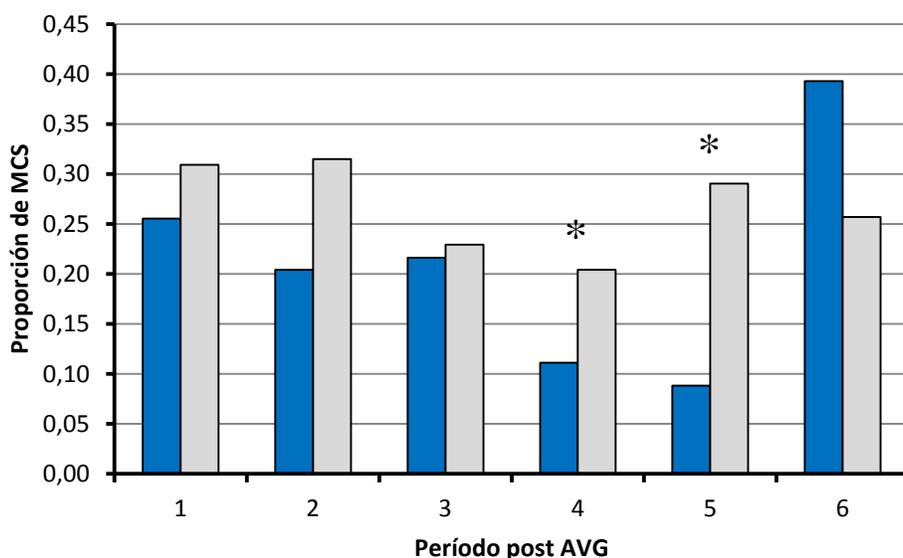


Figura 3: Proporción de casos de mastitis clínica severa (MCS), en relación al total de casos de mastitis diagnosticados en cada uno de los períodos de cuatro semanas, posteriores a la asignación de las vacas a los grupos experimentales (AVG). Se representa con barras azules el grupo de vacas tratadas ($n = 474$) y con barras grises el grupo control ($n = 588$). Asterisco (*): diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

Para poder evaluar el efecto de la dosis adicional de la vacuna, sobre la severidad de los casos de mastitis a través del tiempo, la etapa comprendida entre la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio se dividió en seis períodos de cuatro semanas cada uno. Como se muestra en la figura 3, se calculó la proporción de casos de mastitis severas en relación al total de casos de mastitis clínica, producidos en ambos grupos de vacas, para cada uno de dichos períodos. Mediante un análisis de regresión logística binaria, se calculó el riesgo de que los casos de mastitis que las vacas tratadas presentaron en cada período, fueran severos, en comparación con las controles (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados del análisis de regresión logística binaria para el efecto de la dosis adicional de la vacuna, sobre la severidad de los casos de mastitis clínica, por período.

Período	Razón de riesgo (*)	Intervalo de confianza (95%)	p
1°	0,93	0,46 – 1,9	0,84
2°	0,73	0,34 – 1,54	0,41
3°	0,76	0,33 – 1,75	0,52
4°	0,34	0,12 – 1	0,049
5°	0,27	0,08 – 0,9	0,033
6°	1,79	0,79 – 4,2	0,16

(*): Razón de riesgo de que los casos de mastitis clínica que presentaron las vacas tratadas alcanzaran el grado severo, en comparación con las controles.

Del primer al quinto período, los casos de mastitis ocurridos en el grupo de vacas tratadas tuvieron un menor riesgo de ser severos respecto al grupo de vacas control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en el cuarto y quinto período únicamente. Como se observa en la tabla 3, en el cuarto período (n = 85 casos), las vacas tratadas tuvieron una razón de riesgo de 0,34 (IC 95%: 0,12 - 1; p = 0,049), de que sus casos de mastitis fueran severos respecto al grupo control; alcanzando un valor de 0,27 (IC 95%: 0,08 - 0,9; p = 0,033), en el quinto período (n = 65 casos). En el primer, segundo y tercer período, si bien en todos éstos se observó una menor proporción de casos de mastitis severas en el grupo de vacas tratadas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El sexto (n = 63 casos), fue el único período posterior a la asignación de las vacas a los grupos experimentales, en el que se observó que los casos de mastitis del grupo de vacas tratadas fueron proporcionalmente más que los ocurridos en el grupo control. Sin embargo, al realizar el análisis de regresión logística binaria, el resultado de ésta no demostró diferencias estadísticamente significativas (p = 0,16).

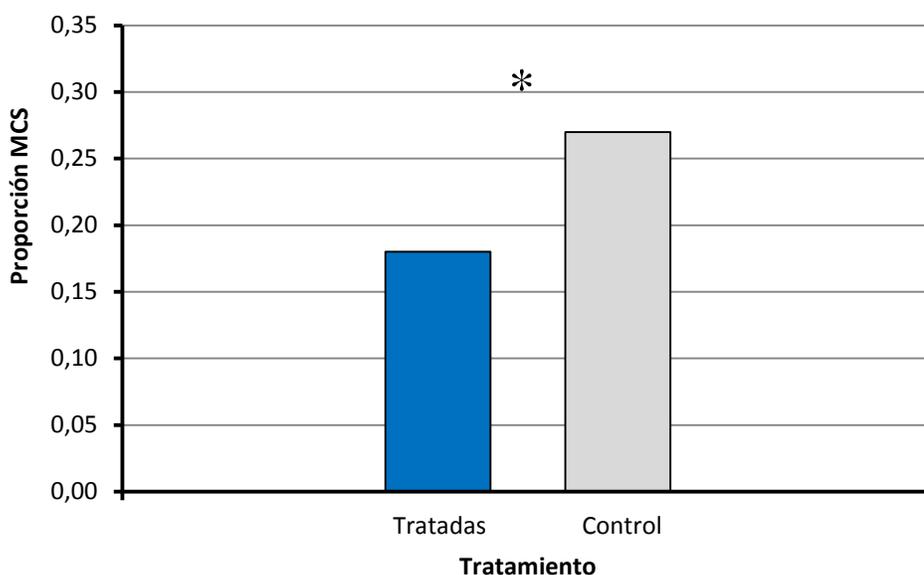


Figura 4: Proporción de casos de mastitis clínica severa (MCS), considerando únicamente los casos ocurridos entre el momento de la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio y el quinto período (día 140 post asignación de las vacas a los grupos y 171 de lactancia). La barra azul representa al grupo tratado (n = 474) y la barra gris al control (n = 588). Asterisco (*): diferencia estadísticamente significativa, entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

Al considerar únicamente los casos de mastitis clínica registrados entre la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio, y el quinto período posterior a este momento (día 140 post asignación de las vacas a los grupos y 171 de lactancia), se halló que en el grupo de vacas tratadas hubo 203 casos de mastitis clínica, de los cuales 37 fueron diagnosticados como severos, lo que equivale a un 18,23% de los casos. En el grupo control, durante el mismo intervalo de tiempo se produjeron 237 casos de mastitis clínica, 64 de los cuales fueron diagnosticados como severos, correspondientes a un 27% de los casos (Figura 4). Mediante regresión logística binaria se determinó que las vacas tratadas, en comparación a las controles, tuvieron una razón de riesgo de 0,61 (IC 95%: 0,38 - 0,96; $p = 0,032$), de que al sufrir un caso de mastitis clínica en dicho período de tiempo, este alcanzara el grado severo. Esto indica, que considerando únicamente los casos de mastitis clínica ocurridos entre el momento de la asignación de las vacas a los grupos de estudio y el quinto período posterior a éste, las vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna presentaron un

menor riesgo de que los casos de mastitis clínica que desarrollaron alcanzaran el grado severo.

Al realizar el análisis por número de lactancia (Figura 5), considerando únicamente los casos registrados entre el momento de la asignación de las vacas a sus respectivos grupos experimentales y el quinto período posterior a ese momento, se observó que en el grupo de vacas de tres o más lactancias, las vacas tratadas, obtuvieron una razón de riesgo de 0,5, de que los casos de mastitis que sufrieron se hicieran severos, comparadas con las vacas controles, siendo este valor estadísticamente significativo (IC 95%: 0,33 - 0,96; $p = 0,036$). Además, en este grupo, la diferencia en la proporción de casos severos entre las vacas tratadas y controles fue manifiesta. En cambio, en las vacas de primera lactancia se determinaron proporciones similares de mastitis severas, entre las vacas tratadas y controles (OR: 0,98; IC 95%: 0,58 - 2,28; $p = 0,96$); mientras que en las vacas de segunda lactancia, se observó una tendencia a una menor severidad en los casos de mastitis en las vacas tratadas, en comparación a las controles, pero la diferencia no alcanzó significancia estadística (OR: 0,56; IC 95%: 0,23 - 1,32; $p = 0,18$).

En este estudio, un 26,6% de los casos de mastitis clínica observados produjeron signos sistémicos en los animales, clasificándose según el criterio utilizado como casos severos de mastitis; esta cifra es mayor a los valores informados habitualmente en literatura. Se ha señalado que aproximadamente un 10% de los casos de mastitis clínica producidos por coliformes, se manifiestan con signos clínicos sistémicos (Smith *et al.*, 1985a; Hogan *et al.*, 1989), aunque este valor puede variar ampliamente entre predios. La alta proporción de casos severos de mastitis observados en este estudio, podría estar influenciada por el hecho de que en éste solo se consideraron casos de mastitis ocurridos previo al día 200 post parto, considerando que es en las etapas tempranas de la lactancia cuando se concentran los casos severos de mastitis (Hogan y Smith, 2003).

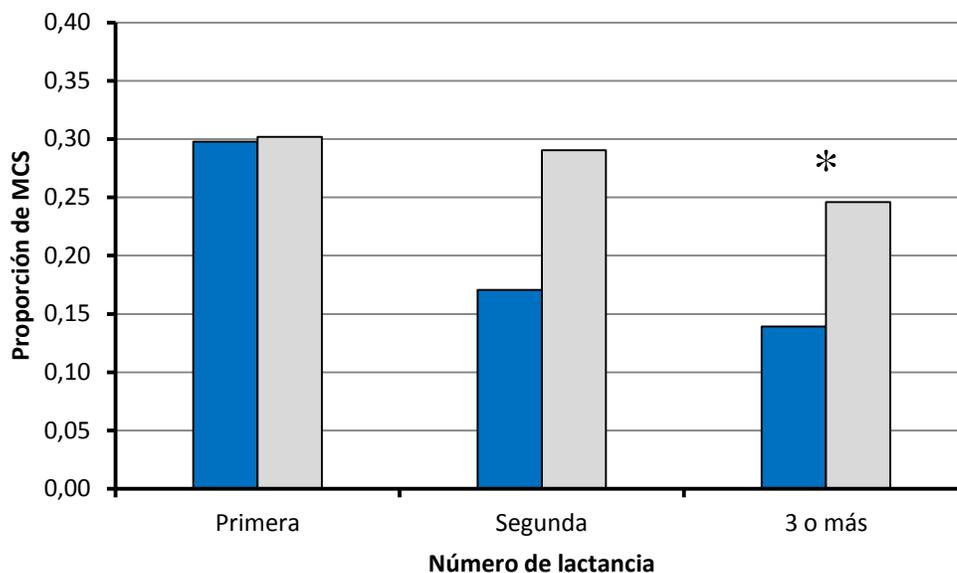


Figura 5: Proporción de casos de mastitis clínica severa (MCS), por número de lactancia, ocurridos entre el momento de la asignación de las vacas a los grupos de estudio y el quinto período (día 140 post asignación de las vacas a los grupos y 171 de lactancia). Las vacas tratadas se representan con barras azules ($n = 474$) y las controles con barras grises ($n = 588$). Asterisco (*): diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

En el presente estudio se observó que la aplicación de una dosis adicional de la bacterina, disminuyó el riesgo de que los casos de mastitis clínica que las vacas desarrollaron entre el momento de la aplicación de dicha dosis de la vacuna y los 140 días posteriores (día 171 de lactancia), fueran severos. La disminución en la severidad de los casos de mastitis clínica al aplicar el protocolo tradicional de vacunación ha sido demostrada en diversos estudios, aceptándose en general que la vacuna J5 reduce la severidad de los signos clínicos de la mastitis por coliformes, por lo que ejercería un efecto protector frente al desarrollo de casos severos de este tipo de mastitis. Sin embargo, en algunos estudios no se ha evidenciado una disminución de la severidad de la mastitis clínica.

Hogan *et al.* (1992a) inocularon *Escherichia coli* de cepa 487 en uno de los cuartos mamarios de vacas lecheras, y observaron que aquellas que recibieron el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, mostraron una menor severidad en los casos de mastitis clínica que desarrollaron, en comparación al grupo control. En otro estudio,

también desarrollado por Hogan *et al.* (1993), se observó que posterior a la inoculación de lipopolisacárido de *Escherichia coli* en un cuarto mamario, las vacas que recibieron la vacuna J5 tuvieron una menor respuesta febril que el grupo control. Por contraparte, en un estudio en el que se compararon dos vacunas J5 comerciales, ninguna de éstas logró disminuir la severidad de los signos clínicos de los casos de mastitis, a pesar de elevar considerablemente la concentración de anticuerpos anti *Escherichia coli* J5 (IgG1 e IgG2), (Tomita *et al.*, 2000). Análogamente, Wilson *et al.* (2007) no encontraron que las vacas tratadas con la vacuna J5 mostraran una menor severidad en los signos clínicos de mastitis desarrolladas naturalmente, en comparación con el grupo control, evidenciando solo una tendencia de que esto sucediera.

Como previamente se ha señalado, el efecto de dosis adicionales de la vacuna J5 sobre la severidad de los casos de mastitis clínica ha sido poco estudiado. Erskine *et al.* (2007) compararon el protocolo tradicional de vacunación, con uno que incorporaba dosis adicionales de la vacuna, durante los días 28, 56 y 84 posterior a la tercera dosis del protocolo tradicional. Dichos autores observaron que en las vacas sometidas a vacunaciones adicionales hubo una disminución en la proporción de casos de mastitis clínica severa contraídas en forma natural, en comparación a las vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, las que tuvieron una probabilidad 1,87 veces mayor de sufrir mastitis clínica severa ($p = 0,02$). Resultado que se asemeja a lo observado en el presente estudio (Figura 4).

En el estudio recién citado, se comprobó además que el grupo que recibió las dosis adicionales de la vacuna mostró títulos de inmunoglobulina IgG2 contra *Escherichia coli* J5 en sangre, superiores a los del grupo control, el día 40 posterior a la última dosis adicional. Además, en aquel estudio se observó que la mayor diferencia en las proporciones de mastitis clínica severa entre las vacas tratadas y controles, se produjo entre los días 43 y 126 de lactancia (hasta aproximadamente el día 31 posterior a la última aplicación de la vacuna), lo que difiere de lo observado en el presente estudio, donde el mayor efecto protector se observó entre los días 115 y 171 de lactancia (entre los días 84 y 140 post dosis adicional de la vacuna), (Figura 3), resultado de difícil interpretación.

En el presente estudio, aún cuando al considerar la totalidad de los casos de mastitis clínica registrados entre el momento de la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio y el quinto período posterior (día 140 post asignación de las vacas a los grupos experimentales y 171 de lactancia), las vacas tratadas tuvieron un menor riesgo de que los casos de mastitis clínica que presentaron se hicieran severos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 4). Cuando se realizó el análisis de regresión logística binaria para cada período en forma individual, solo en el cuarto y quinto período las diferencias entre el grupo de vacas tratadas y el grupo control tuvieron significancia estadística (intervalo de tiempo comprendido entre los días 84 y 140 posterior a la dosis adicional de la vacuna y aproximadamente 115 a 171 días de lactancia), (Figura 3). En el caso del primer, segundo y tercer período posterior a la asignación de las vacas a sus respectivos grupos, al ser analizados en forma individual, en todos éstos se observó una menor proporción de casos severos de mastitis en las vacas tratadas, en comparación a los controles, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, durante el período comprendido entre el parto y la asignación de las vacas a los grupos de estudio, no hubo diferencias en la severidad de los casos de mastitis clínica entre las vacas tratadas y controles. En el caso del sexto período, se observó una mayor proporción de casos severos de mastitis clínica en el grupo de vacas tratadas, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. Por lo previamente señalado, los resultados del presente estudio demostrarían un efecto protector del protocolo propuesto, en lo referente a la disminución de la severidad de las mastitis clínicas, hasta el día 140 posterior a la dosis adicional de vacunación, el cual no se evidenció durante el sexto período del estudio (días 141 a 169 post dosis adicional de vacunación).

En relación a lo tardío que se manifestó el efecto de la dosis adicional de la vacuna sobre la severidad de los casos clínicos de mastitis, es posible que existan factores, no evaluados en este estudio, que ejerzan un efecto que no permita que se evidencie notoriamente dicha respuesta, en los días inmediatamente posteriores a la aplicación de la dosis adicional; o que por el contrario, se manifiesten otros factores que aumenten la respuesta en los días más tardíos, en relación al momento de su aplicación. Podría aún estar ejerciendo su efecto,

aunque levemente, la última dosis del protocolo tradicional de vacunación, lo que podría enmascarar el efecto de la dosis adicional, por algún período de tiempo. Otra posibilidad es que, posterior al *peak* productivo, podría suceder un eventual aumento en los factores de riesgo asociados a mastitis, como por ejemplo, descuidos en el manejo de las camas, traslado de las vacas posterior al *peak* de producción a alojamientos de menor calidad, o un descenso del nivel nutricional de las vacas, lo que dejaría a las mismas mayormente expuestas a la mastitis, haciendo, eventualmente, más tangible el efecto de la dosis adicional de la vacuna.

Otros estudios han evaluado el efecto de dosis adicionales de la vacuna J5 (Chaiyotwittayakun *et al.*, 2004; Erskine *et al.*, 2010), observando un aumento en la producción de inmunoglobulinas anti *Escherichia coli* J5 en las vacas tratadas, en comparación con controles que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, lo que podría contribuir en la disminución de la severidad de los signos clínicos de los casos de mastitis, efecto que no fue evaluado en estos estudios.

Al estudiar el comportamiento de la severidad de los casos de mastitis clínica según el número ordinal de parto (Figura 5), se observó que en las vacas de primera lactancia el riesgo de que sufrieran mastitis clínica severa fue prácticamente el mismo entre vacas tratadas y controles; mientras que en el grupo de segunda lactancia, se observó una tendencia a que en las vacas tratadas los casos de mastitis clínica fueran menos severos. Solo en las vacas de tres o más lactancias este efecto fue estadísticamente significativo. En la literatura consultada no se encontró información sobre el efecto del número de lactancias de las vacas, sobre la respuesta a la vacuna J5. Es posible que la disminución natural en la eficacia de los mecanismos implicados en la defensa de la glándula mamaria que se produce con el aumento de la edad de las vacas, implique que éstas estén más propensas a contraer mastitis por coliformes y que, por lo tanto, el apoyo inmunológico adicional que confiere la dosis extra de la vacuna, se torne más manifiesto en las vacas de mayor número de lactancias.

5.3. Duración de los casos de mastitis clínica

De los 614 casos de mastitis clínica observados, a 530 se les registró el momento de alta del cuadro, calculándose su duración en $8,58 \pm 0,4$ días (promedio \pm error estándar). Considerando únicamente los casos de mastitis clínica a los que se les registró su duración, ocurridos previo a la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio ($n = 77$ casos), la duración de éstos alcanzó $10,36 \pm 0,9$ días. En el período comprendido entre la asignación de las vacas a los grupos experimentales y el día 200 post parto, se registró la duración de 453 casos de mastitis clínica y el promedio de la duración de éstos fue de $8,27 \pm 0,3$ días.

En el período que se extendía entre el parto y el momento de la asignación de las vacas a los grupos de estudio, considerando los 77 casos de mastitis clínica a los que se les registró su duración, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la duración de éstos entre el grupo de vacas tratadas y el grupo control ($p = 0,72$). En el período comprendido entre la asignación de las vacas a sus respectivos grupos y el día 200 post parto, en los grupos de vacas tratadas y controles, se registró la duración de 205 y 248 casos de mastitis clínica, respectivamente; alcanzando los valores correspondientes a ambos grupos a $8,33 \pm 0,5$ y $8,22 \pm 0,4$ días; sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 0,68$).

En el análisis de la duración de los casos de mastitis clínica registrados en los seis períodos de cuatro semanas posteriores a la asignación de las vacas a los grupos de estudio, entre el grupo de vacas tratadas y el grupo control, se establecieron promedios de duración de los casos muy similares entre ambos grupos dentro de cada período, no existiendo diferencias estadísticamente significativas para ninguno de dichos períodos (Tabla 4).

Al analizar la duración de los casos de mastitis clínica según el número de lactancia de las vacas, se observó que los casos de mastitis clínica del grupo de animales de primera lactancia tuvieron una duración de $8,25 \pm 0,9$ días, alcanzando un valor de $9,42 \pm 0,9$ días para las vacas de segunda lactancia y de $7,76 \pm 0,4$ días para las vacas de tres o más

lactancias. En ningún grupo de número de lactancia se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la duración de los casos de mastitis clínica, entre las vacas tratadas y las controles ($p = 0,56$; $p = 0,9$; $p = 0,46$; para el grupo de primera, segunda y de tres o más lactancias, respectivamente).

Tabla 4: Duración de los casos de mastitis clínica (promedio de días \pm error estándar) registrados en cada uno de los períodos de cuatro semanas, posteriores a la asignación de las vacas a los grupos experimentales, para el grupo tratado y el control.

Período	Vacas tratadas	Vacas control	p (*)
1°	7,39 \pm 1,1	7,61 \pm 1	>0,9
2°	7,56 \pm 1,1	10,4 \pm 0,9	0,86
3°	8,53 \pm 1,3	8 \pm 1,1	>0,9
4°	12,41 \pm 1,2	7,91 \pm 1	0,29
5°	7,3 \pm 1,3	6,46 \pm 1,3	>0,9
6°	8,17 \pm 1,4	8,23 \pm 1,2	>0,9

(*): significancia estadística del análisis de varianza para cada período.

El efecto de la vacuna J5 sobre la duración de los casos de mastitis clínica, únicamente ha sido evaluado previamente para el protocolo tradicional de vacunación, lo que limita el análisis de los resultados del presente estudio, para esta variable. En un trabajo en que las vacas fueron inoculadas con *Escherichia coli* de cepa 727 en un cuarto mamario (Hogan *et al.*, 1995), aquellas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, desarrollaron casos de mastitis clínica que tuvieron una duración 79,6 horas, mientras que en las vacas del grupo control no vacunadas, este valor fue 128,9 horas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Además, cuatro días después de la inoculación de *Escherichia coli* en las glándulas mamarias, la proporción de vacas que continuaron diseminando bacterias fue mayor en el grupo control. En otro estudio donde se inoculó *Escherichia coli* de cepa 727 en uno de los cuartos mamaros de vacas lecheras, también se observó que la duración de los cuadros clínicos de mastitis fue mayor en las vacas que no

recibieron la vacuna J5, frente a aquellas que se les aplicó el protocolo tradicional de vacunación (Hogan *et al.*, 2005).

En el presente estudio, al analizar el total de casos clínicos, independientemente de su severidad, no se observó que la aplicación de una dosis adicional de la vacuna afectara la duración de los casos de mastitis clínica que las vacas desarrollaron. Se observó que los casos severos de mastitis clínica tuvieron una mayor duración ($11,48 \pm 0,6$ días), comparados con los casos moderados ($8,61 \pm 0,5$ días) y leves ($6,68 \pm 0,5$ días), ($p < 0,001$ y $p = 0,018$, respectivamente). Si bien, la proporción de casos severos de mastitis fue mayor en el grupo de vacas tratadas, respecto al grupo control (Figura 4), ello no se reflejó en la duración del total de casos de mastitis clínica que afectó a dicho grupo; dado que su duración no se diferenció estadísticamente, respecto a los valores para el total de casos registrados en el grupo control. Análogamente a lo observado en el presente estudio, Smith *et al.* (1999), no encontraron diferencias en la duración de las infecciones intramamarias, entre vacas a las que se les administró la vacuna J5 y vacas que no la recibieron. Sin embargo, en dicho estudio no hubo diferencias en la severidad de los cuadros de mastitis entre ambos grupos, situación que si se observó en el presente estudio.

5.4. Recuento de células somáticas

La información referente a recuento de células somáticas se obtuvo del control lechero oficial (Cooprinsem), y para fines de este estudio, se utilizaron los datos registrados desde el momento del parto hasta el día 200 post parto. Durante este período, después de depurar la información, se dispuso de un total de 4.524 recuentos celulares mensuales, pertenecientes a 898 vacas. A los recuentos individuales de células somáticas se les aplicó la fórmula descrita por Ali y Shook (1980), para su transformación a puntajes lineales de células somáticas (PCS), de manera de ser analizados mediante métodos no paramétricos. El promedio de la totalidad de los PCS utilizados en el estudio fue $2,64 \pm 0,03$ (promedio \pm error estándar).

El promedio de los 513 PCS registrados en la etapa comprendida entre el parto y el momento de la asignación de las vacas a los grupos de estudio fue $2,75 \pm 0,08$. En ese período no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los PCS del grupo de vacas tratadas y controles ($p = 0,89$). En el caso de los 4.011 PCS registrados entre la asignación de las vacas a sus respectivos grupos experimentales y los 200 días post parto, el promedio de la totalidad de éstos fue $2,63 \pm 0,03$. En dicho período, en el grupo de vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna, para los 1.774 PCS registrados, se calculó un promedio de $2,62 \pm 0,06$; mientras que en el grupo control este valor fue $2,65 \pm 0,04$, para los 2.237 PCS registrados en el mismo período de tiempo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los promedios de PCS entre los grupos ($p = 0,67$). Al analizar los promedios de PCS para cada medición mensual, posterior a la asignación de las vacas a los grupos experimentales (Figura 6), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre las vacas tratadas y controles, para ninguna de dichas mediciones, ($p > 0,05$ en cada una de éstas).

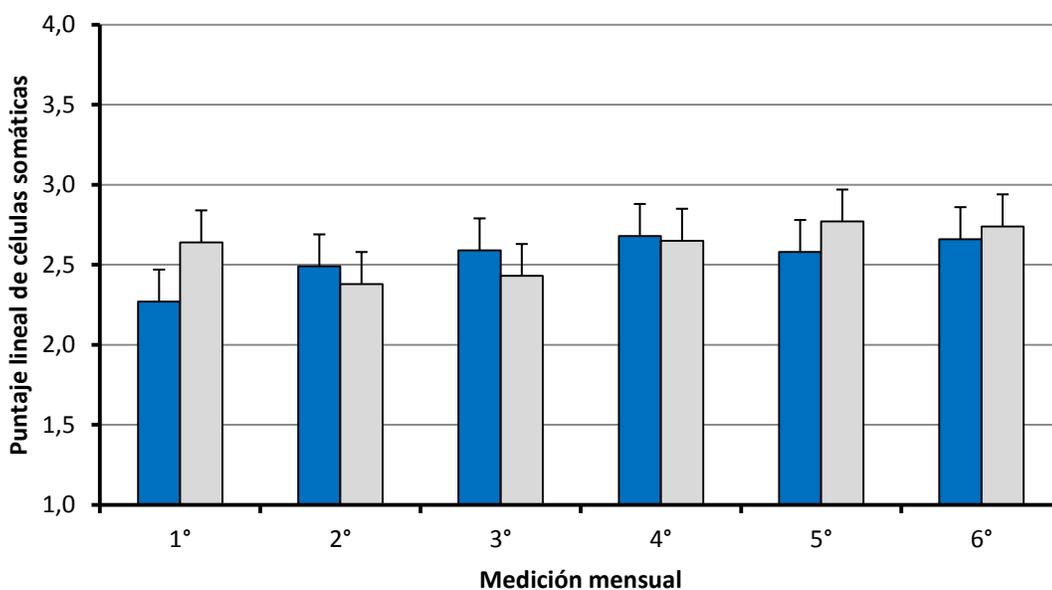


Figura 6: Promedios de puntajes lineales de células somáticas registrados entre la asignación de las vacas a los grupos experimentales y el día 200 post parto . Las vacas tratadas ($n = 1.774$ recuentos), están representadas mediante columnas azules y las controles con columnas grises ($n = 2.237$ recuentos).

Se realizó un análisis de los PCS registrados entre la asignación de las vacas a sus respectivos grupos de estudio y el día 200 post parto, según el número de lactancia de éstas. Independientemente de su grupo experimental, en las vacas de primera lactancia (n = 1.807 recuentos), los PCS alcanzaron en promedio a $2,12 \pm 0,05$. Para las vacas de segunda lactancia, se contó con 973 registros de PCS, cuyo promedio fue $2,44 \pm 0,06$. En el caso del grupo de vacas de tres o más lactancias se obtuvo en promedio $3,34 \pm 0,05$, para 1.231 registros de PCS.

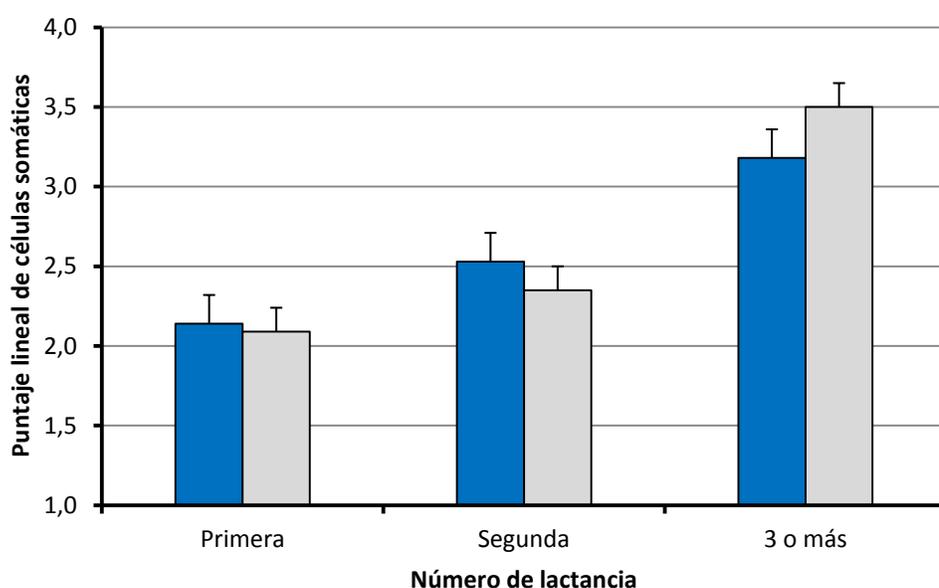


Figura 7: Promedios de puntajes lineales de células somáticas registrados entre el momento de la asignación de las vacas a los grupos experimentales y el días 200 post parto, por número de lactancia. El grupo de vacas tratadas (n = 1.774 recuentos), está representado con barras azules, mientras que el grupo control, mediante barras grises (n = 2.237 recuentos).

En la figura 7 se presentan los PCS para el grupo tratado y control, registrados en forma posterior a la asignación de las vacas a dichos grupos de estudio, según número de lactancia. Para 587 PCS pertenecientes a las vacas de tres o más lactancias que recibieron la dosis adicional de la vacuna, se obtuvo un promedio de $3,18 \pm 0,08$; mientras que para las

vacas controles el promedio de PCS alcanzó a $3,5 \pm 0,07$ ($n = 644$ recuentos). Estos resultados denotan una marcada tendencia a presentar un menor recuento de células somáticas en las vacas de tres o más lactancias, del grupo tratado ($p = 0,052$). En el grupo de vacas primera lactancia que recibieron la dosis adicional de la vacuna ($n = 781$ recuentos), el promedio de PCS alcanzó $2,14 \pm 0,08$; mientras que en las controles ($n = 1.026$ recuentos) este valor fue $2,09 \pm 0,06$, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0,98$). En el caso del grupo de segunda lactancia, el promedio de PCS de las vacas tratadas fue $2,09 \pm 0,06$ ($n = 406$ recuentos), alcanzando el valor correspondiente al grupo control a $2,35 \pm 0,08$ ($n = 567$ recuentos). Dentro de este grupo de lactancia, tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de PCS de ambos grupos experimentales ($p = 0,69$).

En el presente estudio la dosis adicional de la vacuna no disminuyó significativamente los recuentos de células somáticas. Sin embargo, se pudo observar una marcada tendencia a presentar menores PCS en las vacas de tres o más lactancias que recibieron la dosis adicional de la vacuna, respecto a las vacas controles (Figura 7). Fue justamente en el grupo de tres o más lactancias donde las vacas tratadas disminuyeron significativamente el riesgo de sufrir mastitis clínica severa (Figura 5), por lo que es en dicho grupo donde podría esperarse otras repercusiones positivas de la aplicación de la dosis adicional de la vacuna. La clara tendencia a una disminución de los recuentos de células somáticas observada en las vacas de tres o más lactancias que recibieron la dosis adicional de la vacuna, podría en parte, ser reflejo de un eventual efecto depresor de la severidad de las mastitis subclínicas por coliformes, que la dosis adicional de la vacuna podría conferir. Otra explicación podría ser, que en dichas vacas, se hubiera producido una recuperación más rápida de la inflamación subclínica ocasionada por los coliformes, lo que eventualmente se vería reflejado en una tendencia a disminución de los recuentos de células somáticas.

Los coliformes, como agentes productores de infecciones intramamarias, no se caracterizan particularmente por elevar los recuentos de células somáticas del rebaño, ya que las infecciones producidas por estos agentes se manifiestan principalmente como cuadros de mastitis clínica y en menor medida como mastitis subclínicas (Smith, 1983; Harmon,

1994). En estudios previos se ha evaluado el efecto del protocolo tradicional de la vacuna J5, sobre los recuentos de células somáticas de vacas que desarrollaron mastitis clínica, pero el efecto de la vacuna J5 en los recuentos de células somáticas del rebaño no ha sido evaluado en la literatura consultada. En un estudio en el que a vacas lecheras se les inoculó *Escherichia coli* cepa 727 en un cuarto mamario, no se encontraron diferencias significativas en la velocidad ni en la magnitud de producción de células somáticas en los cuartos que desarrollaron mastitis clínica, entre vacas tratadas con la vacuna J5 y controles no vacunados (Hogan *et al.*, 1992a). Hogan *et al.* (1995) observaron que las vacas tratadas con la bacterina, presentaron mayores recuentos de células somáticas en leche, siete días después de que se les inoculara *Escherichia coli* cepa 727 en un cuarto mamario, pero dichos autores señalaron que este efecto no se debió a una menor respuesta inflamatoria en las vacas tratadas, sino a que en ellas la duración de los cuadros clínicos de mastitis había sido menor.

5.5. Agente causal de los casos mastitis

De un total de 614 casos de mastitis clínica registrados en el estudio, se realizó cultivo bacteriológico en placas (Placas Trimastitis®) en 292 de éstos, equivalentes a un 47,55% del total. Se desarrollaron bacterias Gram negativas en 277 de los 292 casos a los que se les realizó cultivo (94,86%), en once muestras se observó desarrollo de bacterias Gram positivas (3,77%) y en cuatro muestras no se observó desarrollo bacteriano o fueron calificadas como contaminadas (1,37%).

En los casos de mastitis ocurridos durante el período comprendido entre el momento del parto y la asignación de las vacas a los grupos de estudio (n = 42 casos), al comparar el grupo de vacas tratadas respecto al grupo control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción del tipo bacteriano aislado en las placas (bacterias Gram negativas *versus* bacterias Gram positivas), ($p > 0,9$).

Considerando los casos de mastitis clínica a los que se les realizó cultivo en placas, presentados entre la asignación de las vacas a los grupos de estudio y el día 200 post parto,

en el grupo de vacas tratadas hubo 109 casos donde se desarrollaron bacterias Gram negativas (97,32%), en dos casos se desarrollaron bacterias Gram positivas (1,79%) y en una muestra no hubo desarrollo bacteriano o ésta resultó contaminada (0,89%). En el grupo control, en 141 casos se desarrollaron bacterias Gram negativas (93,38%), en siete casos hubo desarrollo de bacterias Gram positivas (4,64%) y en tres casos no hubo desarrollo bacteriano o las muestras resultaron contaminadas (1,99%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las vacas tratadas y las controles en la proporción del tipo de bacterias aisladas en las placas (bacterias Gram negativas *versus* bacterias Gram positivas), ($p = 0,31$).

Aunque en los planteles lecheros en los que las vacas permanecen en confinamiento permanente, como el que fue usado en este estudio, la proporción de bacterias Gram negativas aisladas desde los casos de mastitis clínica es generalmente alta, la proporción de bacterias Gram negativas aisladas en este estudio fue mayor a la informada en la literatura consultada, para la zona central de Chile (Donoso, 1997; Azócar, 2001). Además, en comparación con estos trabajos, en el presente estudio, la proporción de casos en los que no hubo desarrollo bacteriano fue considerablemente mayor. Sin embargo, se debe considerar, que estas diferencias podrían estar relacionadas con los distintos métodos bacteriológicos utilizados en el presente estudio y en los trabajos recién citados

En este estudio no se encontraron diferencias en la proporción de bacterias Gram negativas aisladas provenientes de casos de mastitis clínica, entre el grupo de vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna y el grupo control. En un estudio en el que se compararon vacas a las que se les aplicó la vacuna J5 contra un control, las vacas tratadas presentaron una menor proporción de bacterias Gram negativas aisladas de casos de mastitis clínica en relación al grupo control (González *et al.*, 1989). Hogan *et al.* (1992c) realizaron un ensayo de campo, en el que observaron que las vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación, presentaron una menor cantidad de casos de mastitis clínica producidas por bacterias Gram negativas. Por otra parte, en un estudio más reciente, no se observaron diferencias entre el grupo de vacas que recibieron la vacuna J5 y el grupo control en la proporción de coliformes aislados desde los casos clínicos de mastitis contraídos en forma

natural (Wilson *et al.*, 2007). Dentro de la literatura consultada, Erskine *et al.* (2007) realizaron el único trabajo que evaluó el efecto de dosis adicionales de la vacuna, sobre la proporción de agentes aislados de los casos de mastitis clínica. En este estudio se observó que un protocolo de vacunación compuesto de seis dosis de la vacuna, produjo una disminución en la proporción de bacterias Gram negativas aisladas de los casos de mastitis clínica, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa, en comparación al protocolo tradicional.

De los trabajos recién citados, se desprende que el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, podría prevenir las infecciones intramamarias por bacterias Gram negativas, disminuyendo así su proporción relativa en el total de aislamientos de los casos de mastitis clínica. La información entregada por la literatura consultada, referente al efecto de dosis adicionales de la vacuna J5, sobre los agentes causales de mastitis clínica, no sería concluyente. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que la aplicación de una dosis adicional de la vacuna al protocolo tradicional de vacunación, no sería eficaz en la prevención de las infecciones producidas por bacterias Gram negativas, resultado compatible con la falta de respuesta observada, para el protocolo propuesto, en lo referente a la incidencia de mastitis clínica (Tabla 2).

5.6. Vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis

Durante el curso del estudio murieron o fueron eliminadas, por diferentes causas, un total de 143 vacas. Dentro de éstas, diez vacas fueron eliminadas por causas asociadas a mastitis, cifra compuesta por vacas que murieron o fueron vendidas como consecuencia directa de mastitis clínica. Todas las eliminaciones asociadas a mastitis que se registraron, ocurrieron en el período posterior a la asignación de las vacas a los grupos experimentales.

En el grupo de vacas tratadas (n = 474), seis vacas fueron eliminadas como consecuencia de mastitis, mientras que en el grupo control (n = 588), ocurrieron cuatro eliminaciones asociadas a mastitis. No existieron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de vacas eliminadas como consecuencia de mastitis, entre el grupo de vacas

tratadas y el grupo control ($p = 0,35$). Al comparar las proporciones de vacas eliminadas por causas asociadas a mastitis, según número de lactancia, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las el grupo de vacas tratadas y el grupo control ($p = 0,19$; $p > 0,9$; $p = 0,88$; para los grupos de primera, segunda y de tres o más lactancias, respectivamente).

En el presente estudio, al comparar las vacas que sufrieron mastitis clínica severa frente a las que sufrieron mastitis clínica con un grado de severidad leve o moderado (mastitis no severas), no hubo diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de muerte o eliminación debido a mastitis (OR: 1,71; IC 95%: 0,48 - 6,09; $p = 0,4$). De esto se desprende que el efecto de disminución de la severidad de los casos de mastitis clínica evidenciado para el protocolo propuesto (Figura 4), difícilmente tendría la capacidad de reducir la proporción de vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis, ya que los resultados del presente estudio demostrarían que el grado de severidad de la mastitis, no es un factor de riesgo de muerte o eliminación de las vacas por causas asociadas a mastitis.

Al comparar la tasa de eliminación de un grupo de vacas que recibió el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, con otro que recibió tres dosis adicionales de la vacuna, Erskine *et al.* (2007) observaron que en el grupo tratado, un 65% de las vacas que desarrollaron mastitis clínica severa fueron eliminadas antes de alcanzar el final de la lactancia (305 días), mientras que en el grupo control, que recibió el protocolo tradicional de vacunación, un 67% de las vacas que desarrollaron mastitis clínica severa fue eliminado. El análisis estadístico, no demostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, lo que se asemeja a lo observado en el presente estudio. Además, dichos autores observaron que el porcentaje de vacas que logró terminar su lactancia, fue significativamente menor en el grupo control, sin embargo, no pudieron determinar en forma precisa, qué porcentaje de estas eliminaciones correspondía a causas asociadas a mastitis.

Por otra parte, al comparar el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, con un control negativo, no vacunado; se observó que las vacas inmunizadas presentaron una tasa

de descarte asociada a mastitis de 1,2%, mientras que en el grupo control, este valor fue 3,3%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Wilson *et al.*, 2007). En un ensayo de campo realizado por Pol *et al.* (2008), se observó que las vacas tratadas con una vacuna polivalente, que contenía *Escherichia coli* de cepa J5 y Rotavirus bovino, presentaron una tasa de eliminación asociada a mastitis menor (0,6%), que la registrada en el grupo control (4,7%).

5.7. Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia

De las 1.064 vacas incorporadas al estudio, a 964 se les registró su producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia, calculándose para éstas un promedio de $3.991,5 \pm 26,4$ L (promedio \pm error estándar). El grupo de vacas tratadas ($n = 431$ lactancias) y el grupo control ($n = 533$ lactancias), tuvieron un promedio de producción de $4.002 \pm 31,3$ L y $3983 \pm 28,1$ L, respectivamente; no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las producciones de leche de ambos grupos ($p = 0,65$), (Figura 8).

En la figura 9 se presentan los valores de la producción láctea acumulada a los 100 días en leche, según el número de lactancia. Las vacas de primera lactancia que recibieron la dosis adicional de vacunación ($n = 180$ lactancias), tuvieron una producción en promedio de $3.292 \pm 48,7$ L; mientras que en la del grupo control ($n = 228$ lactancias), alcanzó a $3.283 \pm 43,2$ L. Dentro del grupo de segunda lactancia, las vacas tratadas ($n = 111$), alcanzaron un nivel productivo de $4.219 \pm 61,6$ L; en cuanto, las del grupo control ($n = 146$), tuvieron una producción de $4.307 \pm 52,8$ L. En el grupo de tres o más lactancias, las vacas tratadas ($n = 143$), alcanzaron una producción de $4.497 \pm 51,3$ L en promedio; correspondiendo al grupo control ($n = 159$), un nivel productivo de $4.360 \pm 49,5$ L. El análisis de varianza no demostró diferencias estadísticamente significativas entre las producciones acumuladas a los 100 días en leche de las vacas tratadas y las controles, para ninguna de las categorías de número de lactancia analizadas ($p > 0,9$; $p = 0,88$; $p = 0,38$; para el grupo de primera, segunda y de tres o más lactancias, respectivamente).

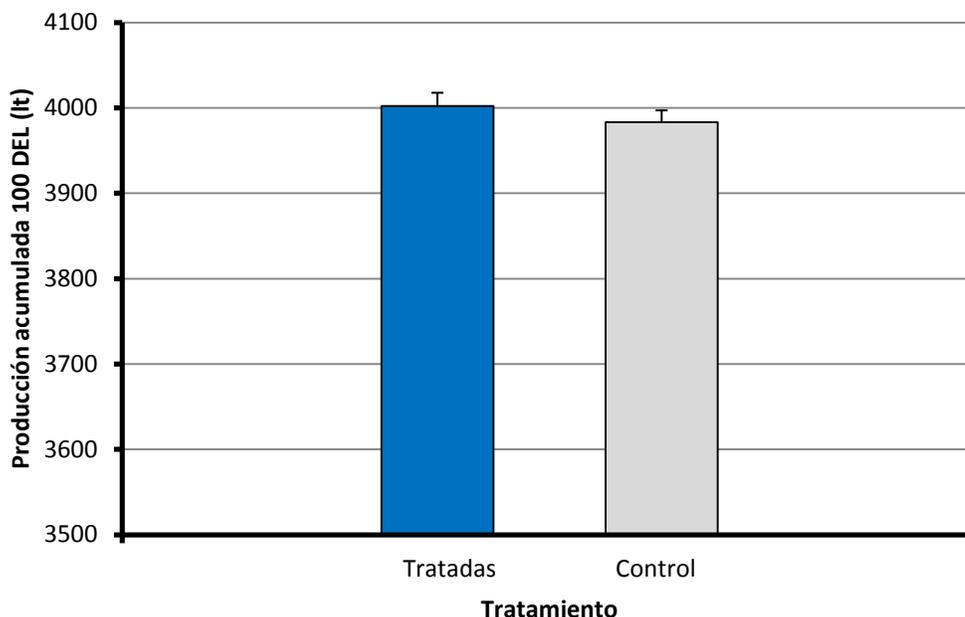


Figura 8: Producción láctea acumulada (litros) a los 100 días en leche (DEL). La barra azul corresponde al grupo de vacas tratadas (n = 431 lactancias) y la barra gris representa al grupo control (n = 533 lactancias).

Un total de 188 vacas sufrieron al menos un caso de mastitis clínica entre el momento de su asignación a sus respectivos grupos de estudio y el día 100 post parto. De éstas, a 173 se les calculó su producción acumulada a los 100 días de lactancia, la cual alcanzó a $3.835 \pm 48,3$ L, mientras que para el grupo de vacas que no sufrieron mastitis clínica en dicho período (n = 791), se determinó un valor de $4.030 \pm 23,3$ L, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0003$); situación esperable y que es concordante a lo descrito en la literatura consultada (Wilson *et al.*, 2004; Hagnestam *et al.*, 2007).

Al considerar únicamente las vacas que sufrieron al menos un caso de mastitis clínica entre el momento de su asignación a los grupos experimentales y el día 100 post parto, se estableció una producción de $3.815 \pm 70,6$ L para el grupo de vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna (n = 81), valor que alcanzó en las controles a $3.855 \pm 65,9$ L, no existiendo diferencias significativas en la producción de leche entre tratamientos ($p = 0,98$).

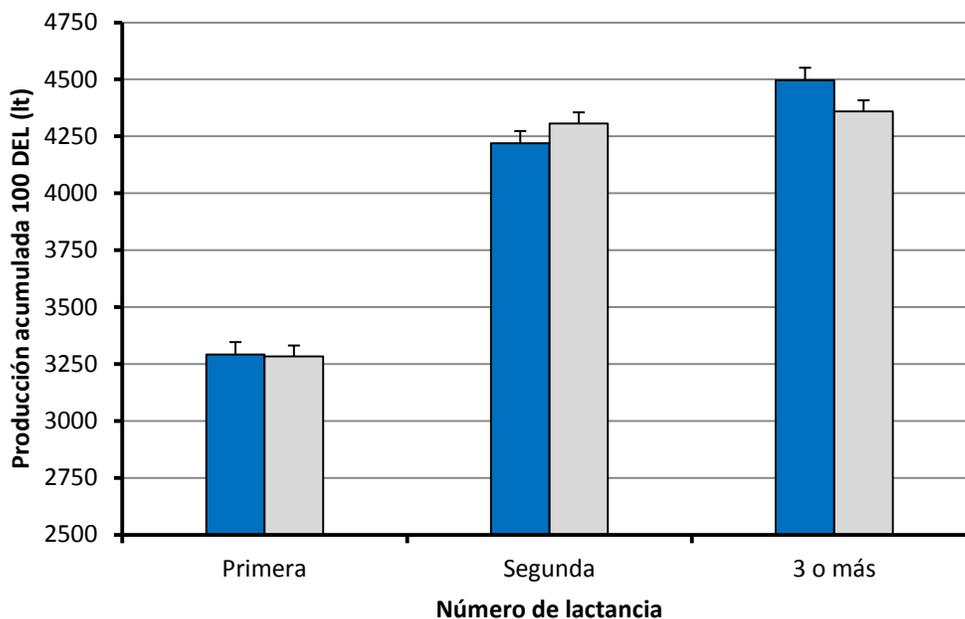


Figura 9: Producción láctea acumulada (litros) a los 100 días en leche según número de lactancia. Las barras azules representan al grupo de vacas tratadas (n = 474), mientras que las barras grises corresponden al grupo control (n = 588).

El efecto del protocolo tradicional de vacunación sobre la producción de leche de las vacas ha sido estudiado previamente. Sin embargo, el efecto de dosis adicionales de la vacuna sobre la producción láctea no ha sido analizado en la literatura consultada. En un estudio en que las vacas fueron inoculadas en un cuarto mamario con *Escherichia coli* cepa 487, aquellas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación de la bacterina J5, tuvieron menores pérdidas en producción láctea durante los siete días posteriores al desafío bacteriano, en comparación con los animales del grupo control, no vacunados (Hogan *et al.*, 1992a). Análogamente, en un estudio más reciente, se observó que las vacas que eran sometidas al protocolo tradicional de vacunación, tuvieron una menor disminución en su producción, posterior al desarrollo natural de mastitis clínica por coliformes, dentro de los primeros 50 días de lactancia, en relación al grupo de vacas que no fueron tratadas (Wilson *et al.*, 2008). Por contraparte, Hogan *et al.* (1995) no encontraron diferencias productivas entre las vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación y las controles no vacunadas, al analizar un período de siete días posteriores a la inoculación de *Escherichia coli* cepa 727 en uno de sus cuartos mamaros.

La ausencia de diferencias en los niveles productivos a los 100 días en leche, entre las vacas tratadas y controles, sería en principio consistente con los resultados obtenidos para la incidencia de mastitis clínica. Aunque se observó que la presencia de mastitis clínica significó un descenso en la producción de leche, la dosis adicional de la vacuna no bajó la incidencia de mastitis clínica, por lo que una eventual disminución en las pérdidas productivas asociadas a mastitis, como reflejo de una menor incidencia de mastitis clínica, no sería un resultado esperable. En cuanto a la relación entre la producción de leche y la severidad de los casos de mastitis clínica, en el presente estudio se observó que las vacas que presentaron por lo menos un caso de mastitis clínica severa entre el parto y los 100 días en leche, en comparación a las vacas que en dicho período sufrieron mastitis clínica con un grado de severidad leve o moderado (mastitis no severas), produjeron 128 litros menos, pero esta diferencia no tuvo significancia estadística ($p = 0,25$). De acuerdo a estos resultados, es muy improbable que la disminución de la severidad de los casos clínicos mostrada por el protocolo propuesto (Figura 4), se refleje en un incremento en la producción de leche de las vacas sometidas a este protocolo, en relación a los niveles productivos de las vacas del grupo control. Además, las mayores diferencias en la severidad de los casos de mastitis que se produjeron, se observaron posterior a los 100 días en leche, por lo que no tendrían efecto sobre la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia.

5.8. Fertilidad

5.8.1. Tasa de concepción a la primera inseminación

De 1.062 lactancias incluidas en el estudio, en 1.003 las vacas fueron inseminadas, lo que no ocurrió en las 59 restantes por diversas razones. En 299 casos las vacas quedaron preñadas a la primera inseminación, alcanzando una tasa de concepción a la primera inseminación de 29,81% para la totalidad de las vacas inseminadas, independiente de su grupo de estudio. En el grupo de vacas tratadas, en 454 lactancias las vacas fueron inseminadas, resultando 138 preñadas en la primera inseminación, lo que corresponde a una

tasa de concepción a la primera inseminación de 30,44% para ese grupo. En el caso del grupo control, de 549 lactancias en las que las vacas fueron inseminadas, en 161 casos las vacas quedaron preñadas a las primera inseminación, lo que es equivalente a una tasa de concepción a la primera inseminación de 29,33%. A pesar de que la tasa de concepción a la primera inseminación en las vacas tratadas fue algo más elevada, al realizar la regresión logística binaria se calculó una razón de riesgo de 1,07 de quedar preñadas a la primera inseminación, para las vacas tratadas respecto a las controles, no resultando este valor estadísticamente significativo (IC 95%: 0,81 - 1,41; $p = 0,62$).

Para el grupo de vacas de primera lactancia que fueron inseminadas ($n = 410$), la tasa de concepción a la primera inseminación fue 39,27%. En este grupo, las vacas inseminadas que recibieron la dosis adicional de la vacuna ($n = 182$), tuvieron una tasa de concepción a la primera inseminación de 37,36%, en tanto que en el grupo control ($n = 228$), este valor fue 40,79%. La razón de riesgo de que las vacas tratadas resultaran preñadas a la primera inseminación respecto al grupo control fue 0,87, no resultando este valor estadísticamente significativo (IC 95%: 0,58 - 1,3; $p = 0,51$). En el caso de las vacas de segunda lactancia que fueron inseminadas ($n = 263$), su tasa de concepción a la primera inseminación fue 25,86%; dentro de este grupo de número de lactancia, las vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna ($n = 112$), alcanzaron una tasa de concepción de 31,25%, mientras que en el grupo control ($n = 151$), este valor fue 21,85%. En este grupo se observó una tendencia de que las vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna tuvieran una mejor tasa de concepción a la primera inseminación, obteniéndose una razón de riesgo de 1,62 de quedar preñadas a la primera inseminación, en comparación con el grupo control, sin embargo esta tendencia no fue estadísticamente significativa (IC 95%: 0,92 - 2,82; $p = 0,092$). La tasa de concepción del grupo de vacas de tres o más lactancias que fueron inseminadas ($n = 330$), fue 21,21%. En este grupo, las vacas que recibieron la dosis adicional de la vacuna ($n = 160$), tuvieron una tasa de concepción a la primera inseminación de 21,88%, mientras que para el grupo control ($n = 170$), este valor alcanzó a 20,59%. Dentro de este grupo de número de lactancia, la razón de riesgo de que las vacas tratadas quedaran preñadas a la primera inseminación, respecto a las controles fue 1,06; no siendo éste valor estadísticamente significativo (IC 95%: 0,63 - 1,81; $p = 0,82$).

Un total de 311 vacas sufrieron al menos un caso de mastitis clínica en forma posterior a su asignación a los grupos experimentales, hasta el día 200 post parto. De éstas, 300 fueron inseminadas, obteniéndose una tasa de concepción a la primera inseminación de 21%. En el caso del grupo de vacas que fueron inseminadas y que no sufrieron ningún caso de mastitis clínica en igual período (n = 703), se alcanzó una tasa de concepción a la primera inseminación de 33,57%. Las vacas que sufrieron algún caso de mastitis clínica en dicho período, tuvieron significativamente un menor riesgo de resultar preñadas a la primera inseminación (OR: 0,61), comparado con las que no sufrieron mastitis clínica en dicho período (IC 95%: 0,44 - 0,85; p = 0,004).

Considerando únicamente las vacas que sufrieron algún caso de mastitis clínica en el período posterior a su asignación a los grupos de estudio, las vacas tratadas (n = 140) alcanzaron una tasa de concepción a la primera inseminación de 22,14%, mientras que en el grupo control (n = 160), este valor fue 20%. De acuerdo al análisis de regresión logística binaria, el grupo de vacas tratadas tuvo una razón de riesgo de 1,08 de quedar preñadas en la primera inseminación, en comparación al grupo control, no resultando este valor estadísticamente significativo (IC 95%: 0,61 - 1,91; p = 0,78).

5.8.2. Días a la preñez

Al analizar las 1003 lactancias en que las vacas fueron inseminadas, pudo comprobarse que en 751 casos las vacas lograron quedar preñadas antes de alcanzar los 200 días post parto (74,87%), determinando una mediana de 111 días a la preñez, independiente de su grupo experimental. En el grupo de vacas que fueron inseminadas y recibieron la dosis adicional de la vacuna (n= 454), un 73,78% de las vacas lograron quedar preñadas antes de los 200 días post parto, con una mediana de 111 días a la preñez, mientras que para el grupo control (n = 549), hubo un 75,77% de vacas que lograron quedar preñadas antes de los 200 días post parto, con una mediana de 112 días a la preñez. Para la comparación del tiempo que necesitaron las vacas de cada grupo para quedar preñadas, se utilizó el método de las curvas

de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 10), obteniéndose un log-rank de 0,26 entre ambas curvas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre éstas ($p = 0,61$).

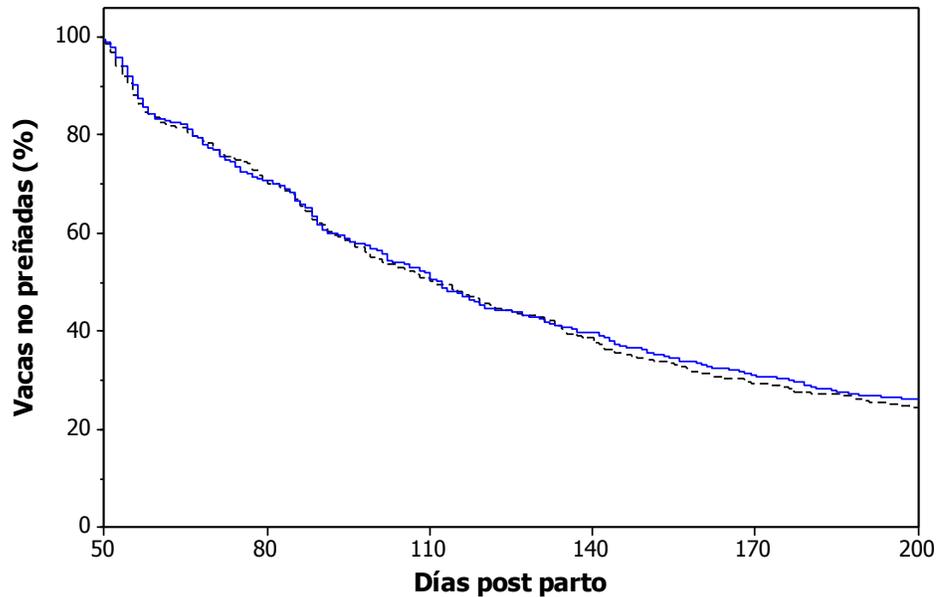


Figura 10: Curvas de supervivencia de días a la preñez, para el grupo de vacas tratadas (línea azul continua) y el grupo control (línea negra segmentada). Valor de log-rank de la comparación entre las curvas: 0,26 ($p = 0,61$).

Al realizar el análisis de los días a la preñez según el número de lactancia, en el grupo de primera lactancia ($n = 410$) se observó un 83,17% de vacas que quedaron preñadas antes de los 200 días post parto, con una mediana de 90 días a la preñez. En el grupo de segunda lactancia ($n = 263$), el porcentaje de vacas preñadas antes de completar los 200 días post parto fue 74,9%, con una mediana de 116 días a la preñez. En el caso del grupo de tres o más lactancias ($n = 330$), el 64,54% de las vacas lograron quedar preñadas previo a los 200 días post parto, siendo en éstas la mediana de los días a la preñez 144 días. Al comparar las curvas de supervivencia de días a la preñez entre las vacas tratadas y controles, dentro de los grupos de primera, segunda y de tres o más lactancias, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas dentro de ninguno de los grupos de número de lactancia ($p = 0,3$; $p = 0,15$ y $p = 0,6$; para las vacas de primera, segunda y de tres o más lactancias, respectivamente).

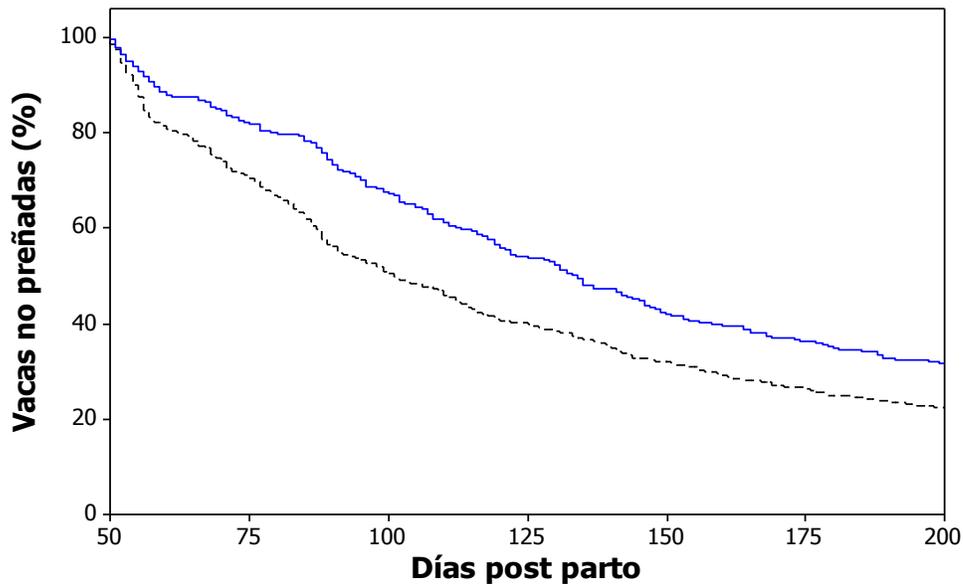


Figura 11: Curvas de supervivencia de días a la preñez, para las vacas que sufrieron mastitis clínica posterior a su asignación a los grupos de estudio (línea azul continua), comparadas con las que no sufrieron mastitis clínica, en el mismo período de tiempo (línea negra segmentada). Valor de log-rank de la comparación entre las curvas: 16,85 ($p < 0,001$).

De las vacas que fueron inseminadas, 300 sufrieron algún caso de mastitis clínica posterior a la asignación de éstas a sus respectivos grupos experimentales. Un 68,33% de las vacas afectadas por mastitis clínica logró preñarse antes de los 200 días post parto, calculándose para éstas una mediana 122 días a la preñez, mientras que en el grupo que no presentó mastitis ($n = 703$), un 77,52% de las vacas se preñó antes de los 200 días post parto, con una mediana 109 días a la preñez. Se determinó un log-rank de 16,85 entre las curvas (Figura 11), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$); resultado que indicaría que la presencia de mastitis clínica actuaría aumentando el número de días que necesitaron las vacas para quedar preñadas.

Considerando únicamente las vacas que sufrieron algún cuadro de mastitis clínica en forma posterior a su asignación a los grupos de estudio, en el grupo de vacas tratadas ($n = 140$), un 68,57% de éstas quedaron preñadas antes de los 200 días post parto, con una mediana de

119 días a la preñez. En el caso del grupo control los resultados fueron bastante similares, con una proporción de vacas preñadas previo a los 200 días post parto de 68,13% y una mediana de 123 días a la preñez. Entre las curvas de ambos grupos se calculó un log-rank de 0,001 (Figura 12); no siendo la diferencia entre éstas estadísticamente significativa ($p = 0,97$).

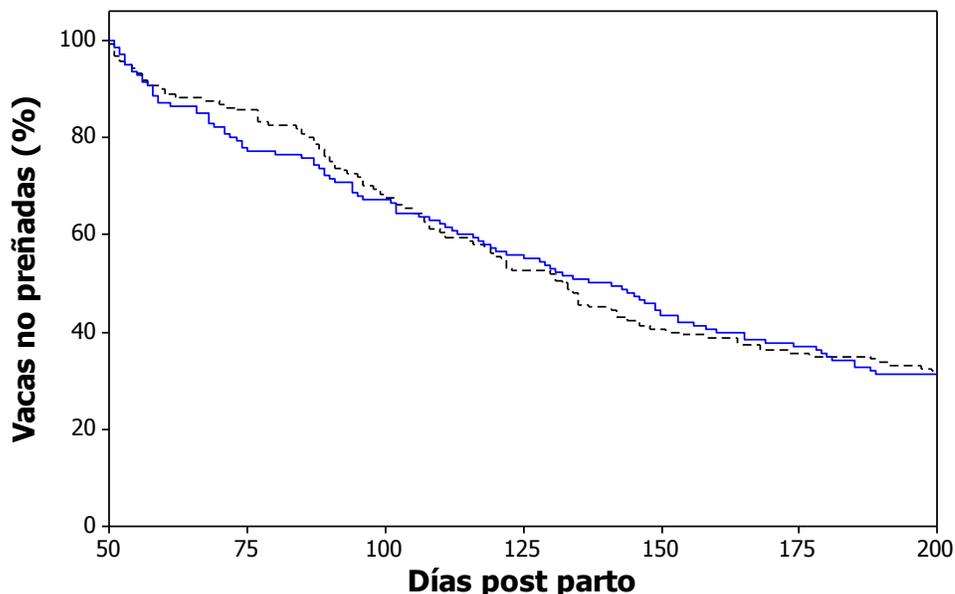


Figura 12: Curvas de supervivencia de días a la preñez, para el grupo de vacas tratadas (línea azul continua) y el grupo control (línea negra segmentada), considerando únicamente las vacas que sufrieron algún caso de mastitis clínica, posterior a su asignación a los grupos de estudio. Valor de log-rank de la comparación entre las curvas: 0,001 ($p = 0,97$).

Por otra parte, las vacas que sufrieron mastitis clínica severa posterior a su asignación a los grupos de estudio, no tuvieron un mayor riesgo de no quedar preñadas a la primera inseminación, en comparación con las que sufrieron mastitis clínica pero de severidad leve o moderada (mastitis no severas), (OR: 1,44; IC 95%: 0,82 - 2,52; $p = 0,21$). Tampoco se observó que la severidad de los casos de mastitis clínica afectara la variable días a la preñez, calculándose un log-rank de 0,149 entre las curvas generadas ($p = 0,22$). En consecuencia, la severidad de los cuadros de mastitis clínica, no tendría un efecto significativo en estos índices reproductivos. Por lo que se desprende que las diferencias

detectadas entre ambos protocolos de vacunación, en lo referente a la severidad de los casos de mastitis (Figura 4), no deberían reflejarse en variaciones de la fertilidad de las vacas, al comparar el grupo tratado y el control.

La relación entre la salud mamaria y la fertilidad ha sido tratada por diversos autores. En un estudio que evaluó el efecto de la mastitis clínica sobre diversos parámetros reproductivos, se observó que las vacas que sufrieron mastitis clínica, presentaron valores más elevados para el número de días al primer servicio, servicios por concepción y el lapso parto preñez; efecto que fue más evidente cuando la mastitis clínica se presentaba previo a la primera inseminación post parto (Barker *et al.*, 1998). Santos *et al.* (2004) señalan que la presencia de mastitis clínica disminuye la tasa de concepción a la primera inseminación, la tasa de preñez a los 320 días de lactancia y aumenta la incidencia de abortos, siendo mayores estas consecuencias cuando la mastitis clínica se presentaba entre el momento de la primera inseminación post parto y el diagnóstico de preñez. En un estudio en el que se asoció el efecto de la mastitis clínica y otras enfermedades con la fertilidad, se observó que ésta por si sola aumentó los días abiertos, los servicios por concepción y provocó que las vacas tardaran más tiempo en preñarse, en comparación a vacas que no sufrieron mastitis clínica (Ahmadzadeh *et al.*, 2009).

El efecto de la aplicación de la vacuna J5 sobre la fertilidad de las vacas lecheras ha sido escasamente estudiado. Wilson *et al.* (2008) compararon la fertilidad de vacas que recibieron el protocolo tradicional de vacunación frente a un grupo control de vacas no inmunizadas. Dichos autores no encontraron diferencias en la tasa de preñez, así como en la mediana de los días a la preñez y los servicios por concepción de ambos grupos. El efecto que podrían ejercer dosis adicionales de la vacuna J5 sobre la fertilidad, no ha sido evaluado previamente en la literatura consultada. Los resultados obtenidos en el presente estudio, indicarían que el protocolo propuesto, no ejercería un efecto favorable sobre los parámetros reproductivos tasa de concepción a la primera inseminación y días a la preñez, al ser comparado con el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5; resultados que estarían en concordancia con la ausencia de una respuesta, a la dosis adicional de la vacuna,

en lo que refiere a la incidencia de mastitis clínica, que no varió entre ambos grupos experimentales.

6. IMPLICANCIAS

La mastitis bovina, como principal agente depresor de la salud mamaria y como una de las enfermedades que genera mayores pérdidas económicas en los planteles productores de leche, es un desafío que enfrenta permanentemente la industria lechera y la medicina veterinaria del bovino. Dicho desafío es particularmente complejo en el caso de la mastitis ocasionada por bacterias coliformes, puesto que, mientras se ha avanzado bastante en el control de otros tipos de mastitis, en el caso de la mastitis por coliformes el progreso ha sido menor.

La mastitis por coliformes es un problema complejo de abordar. Para poder enfrentarlo de la mejor forma posible, primero es necesario comprenderlo, conocer tanto la naturaleza de los agentes implicados en este tipo de mastitis, como también los mecanismos que posee la vaca para defenderse de éstos, y la particular relación que se establece entre la mastitis y la realidad productiva y ambiental en que se encuentran inmersas actualmente las vacas lecheras.

La vacuna J5, es una de las herramientas que se utiliza frecuentemente en el control de la mastitis por coliformes. En este sentido, la presente memoria sirve como referencia en la toma de decisiones para su utilización, particularmente en cuanto a la conveniencia de implementar un protocolo que incluya una dosis adicional de la vacuna. En este estudio, la comparación con el protocolo tradicional, permitió comprobar que la aplicación de una dosis adicional de la vacuna J5 disminuyó significativamente el riesgo de que los casos de mastitis clínica, producidos entre el momento de la aplicación de dicha dosis y el día 171 de lactancia, se hicieran severos. Sin embargo, la respuesta a la dosis adicional de la vacuna se evidenció en forma más tardía a lo esperado, resultado que no tiene una explicación clara. Además, se observó que el efecto benéfico real, en lo referente a la disminución de la severidad de los casos de mastitis clínica, fue estadísticamente significativo solo en las vacas de más de dos lactancias.

La disminución en la severidad de los casos de mastitis clínica, ha sido informada por otros autores al comparar el protocolo tradicional de vacunación, frente a controles no vacunados (González *et al.*, 1989; Hogan *et al.*, 1992a; Hogan *et al.*, 1993; Pol *et al.*, 2008). Análogamente, Erskine *et al.* (2007), también determinaron una reducción en la severidad de los casos clínicos, para un protocolo compuesto de tres dosis adicionales de la vacuna, en comparación al protocolo tradicional de vacunación. En la mayoría de estos estudios, la conclusión de los autores fue que la vacuna J5 no evita que se produzca la infección por coliformes en la glándula mamaria, pero esta bacterina actuaría disminuyendo las manifestaciones clínicas de la infección.

Por otra parte, en el presente estudio, en el grupo de vacas que recibió la dosis adicional de la vacuna no se redujo la incidencia de mastitis clínica, la duración de los casos de mastitis, el recuento de células somáticas en leche ni la frecuencia de vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis, en comparación al grupo de vacas a las que se les aplicó el protocolo tradicional de vacunación. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos experimentales en la proporción del tipo de agentes aislados de los casos de mastitis clínica. Además, las comparaciones entre el grupo de vacas tratadas y controles, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia, la tasa de concepción a la primera inseminación y los días a la preñez.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten inferir que el efecto de la dosis adicional de la vacuna J5, no fue de una magnitud suficiente para disminuir la incidencia de mastitis clínica, la duración de los casos, el recuento de células somáticas, la frecuencia de vacas muertas o eliminadas por mastitis, ni para afectar la proporción del tipo de agentes causales de mastitis. Ello explicaría que, entre las vacas tratadas y controles, no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas en variables relacionadas con la salud mamaria, como la producción de leche y los índices reproductivos estudiados. En consecuencia, entre las variables estudiadas, la dosis adicional de la vacuna entregaría un efecto beneficioso limitado sobre la salud mamaria, reflejado únicamente por la disminución de la severidad de los casos clínicos de mastitis, particularmente en las vacas de mayor número de lactancias.

Aún es tarea inconclusa la determinación de bajo qué circunstancias, el efecto protector que la dosis adicional de la vacuna entrega, se tornaría en beneficios tangibles y económicamente rentables para un determinado plantel productivo y qué características éste debe tener para optimizar al máximo dichos beneficios. Probablemente, jugarían un papel importante para la toma de estas decisiones, el nivel de riesgo del plantel en cuestión frente a la mastitis, el perfil de la mastitis predominante y la situación sanitario-productiva que dicho plantel presente; factores que podrían incidir, de forma positiva o negativa, en la respuesta del rebaño, a dosis adicionales de la vacuna J5.

Es importante el desarrollo continuo de todas las áreas de la medicina preventiva aplicada a la mastitis bovina, ya que es esa la manera más eficiente y económicamente rentable de controlarla. Es de particular relevancia, que se siga avanzando en el entendimiento de los componentes de defensa que posee la vaca frente a la mastitis, así como también en los mecanismos biológicos implicados en la protección de la glándula mamaria, que la vacuna J5 y que otros tipos de vacunas podrían conferir. De esta forma, eventualmente, se podrán desarrollar métodos para poder promover y dirigir, de la manera más eficiente posible, la respuesta inmune de las vacas en contra de la mastitis y así poder compensar las dificultades ligadas a la alta producción, que las vacas deben superar para poder hacer frente a los agentes patógenos causantes de mastitis.

7. CONCLUSIONES

- Comparado con el protocolo tradicional de aplicación de la vacuna J5, el protocolo que incluye una dosis adicional de la vacuna, no mostró efectos significativos sobre la incidencia de mastitis clínica, duración de los casos clínicos, tipo de agente causal, vacas muertas o eliminadas como consecuencia de mastitis y recuento de células somáticas en leche.
- El análisis de las mastitis clínicas según severidad, producidas entre la aplicación de la dosis adicional de la vacuna J5 y el día 171 de lactancia, demostró que dicha dosis adicional redujo significativamente el riesgo de que los casos clínicos se hicieran severos.
- El efecto benéfico de la dosis adicional de la vacuna sobre la severidad de los casos clínicos de mastitis, solo se evidenció estadísticamente en las vacas de tres o más lactancias.
- Comparado con el protocolo tradicional, el protocolo de vacunación propuesto no se reflejó en cambios significativos en el rendimiento lácteo durante los primeros 100 días de lactancia, ni en los índices reproductivos tasa de concepción a la primera inseminación y días a la preñez.

8. BIBLIOGRAFÍA

AHMADZADEH, A.; FRAGO, F.; SHAFII, B.; DALTON, J.C.; PRICE, W.J. 2009. Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 273-282.

AZÓCAR, J.E. 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, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 124p.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; HARE, W.R.; SOHN, E.J. 2003. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J. Dairy Sci.* 86: 3128-3137.

BAR, D.; TAUER, L.W.; BENNETT, G.; GONZÁLEZ, R.N.; HERTI, J.A.; SCHUKKEN, Y.H.; SCHULE, H.F.; WELCOME, F.L.; GRÖHN, Y.T. 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 91: 2205-2214.

BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. 1998. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 81: 1285-1290.

BURTON, J.L.; ERSKINE, R.J. 2003. Mastitis and immunity: some new ideas for an old disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19: 1-45.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34: 521-564.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. 2001. An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow. *J. Dairy Sci.* 84: 1632-1639.

CHA, E.; BAR, D.; HERTL, J.A.; TAUER, L.W.; BENNETT, G.; GONZÁLEZ, R.N.; SCHUKKEN, Y.H.; WELCOME, F.L.; GRÖHN, Y.T. 2011. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 94: 4476-4487.

CHAIYOTWITTAYAKUN, A.; BURTON, J.L.; WEBER, P.S.D.; KIZILKAYA, K.; CARDOSO, F.F.; ERSKINE, R.J. 2004. Hyperimmunization of steers with J5 *Escherichia coli* bacterin: effects on isotype-specific serum antibody responses and cross reactivity with heterogeneous Gram-negative bacteria. *J. Dairy Sci.* 87: 3375-3385.

CULLOR, J.S.; SMITH, W.L. 1996. Endotoxin and disease in food animals. *Comp. Cont. Ed. Food Animal.* 18:31-38.

DIRECCIÓN METEOROLÓGICA DE CHILE. s.f. Climas de Chile. Región de Valparaíso. [en línea] < <http://www.meteochile.cl/> > [consulta: 3-12-2011]

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

DOSOGNE, H.; MEYER, E.; STURK, A.; VAN LOON, J.; MASSAERT-LEËN, A.M.; BURVENICH, C. 2002a. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis. *Inflamm. Res.* 51: 201-205.

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. 2002b. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. *Vet. Res.* 33: 1-12.

ELBEIN, A.D.; HEATH, E.C. 1965. The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 5: 1919-1925.

ERSKINE, R.J. 2001. Mastitis control in dairy herds. **In:** Radostits, O.M. Herd health: food animal production medicine. 9^a ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp: 397-433.

ERSKINE, R.J.; VAN DYK, E.J.; BARTLETT, P.C.; BURTON, J.L.; BOYLE, M.C. 2007. Effect of hyperimmunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin in adult lactating dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231: 1092-1097.

ERSKINE, R.J.; BROCKETT, A.R.; BEECHING, N.D.; HULL, R.W.; BARTLETT, P.C. 2010. Effect of changes in number of doses and anatomic location for administration of an *Escherichia coli* bacterin on serum IgG1 and IgG2 concentrations in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 71: 120-124.

ERSKINE, R.J.; BARTLETT, P.C.; SABO, K.M.; SORDILLO, L.M. 2011. Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 *Escherichia coli* bacterin. *Vet. Med. Inter.* 2011: Article ID: 915747. 5p.

GONZÁLEZ, E.N.; CULLOR, J.S.; JASPER, D.E.; FARVER, T.B.; BUSHNELL, R.B.; OLIVER, M.N. 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* Vaccine. *Can. J. Vet. Res.* 53: 301-305.

GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N. 1997. Current awareness of bovine mammary gland immunol. *Flem. Vet. J. Suppl.* 66: 341-358.

HAGNESTAM, C.; EMANUELSON, U.; BERGLUND, B. 2007. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *J. Dairy Sci.* 90: 2260-2270.

HARMON, R.J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. 77: 2103-2112.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; HOBLET, K.H.; SCHOENBERGER, P.S.; TODHUNTER, D.A.; HUESTON, W.D.; PRITCHARD, D.E.; BOWMAN, G.L.; HEIDER, L.E.; BROCKETT, B.L.; CONRAD, H.R. 1989. Field survey of mastitis in low somatic cell count herds. J. Dairy Sci. 72: 1547-1556.

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

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P. 1992b. Field trial to determinate 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. J. Dairy Sci. 76: 401-407.

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

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.; SCHOENBERGER, P.; ROMIG, S.; THOMPSON, L. 1997. Responses of antibody titers to intramammary immunization with *Escherichia coli* J5 bacterin. J. Dairy Sci. 80: 2398-2402.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. 2003. Coliform mastitis. Vet. Res. 34: 507-519.

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

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.; SOMMER, H.M. 2006. The enterobacteriaceae **In:** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins company. Philadelphia, USA. pp: 263-293.

KREMER, W.D.J.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; GROMMERS, F.J.; DAEMEN, A.J.J.M.; HENRICKS, P.A.J.; BRAND, A. 1993. Preinfection chemotactic response of blood polymorphonuclear leukocytes to predict severity of *Escherichia coli* mastitis. J. Dairy Sci. 76: 1568-1574.

LEBLANC, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1267-1279.

MCGUIRE, T.C.; MUSOKE, A.J.; KURTTI, T. 1979. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunol.* 38: 249-256.

MEGLIA, G.E.; MATA, H.T. 2001. Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. *Rev. Cien. Vet.* 3: 29-40.

MEIN, G.A.; NEIJENHUIS, F.; MORGAN, W.F.; REINEMANN, D.J.; HILLERTON, J.E.; BAINES, J.R.; OHNSTAD, I.; RASMUSSEN, M.D.; TIMMS, L.; BRITT, J.S.; FARNSWORTH, R.; COOK, N.; HEMLING, T. 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. Proc. 2nd International symposium on mastitis and milk quality, Vancouver, BC, Canada: 347-351.

MOORE, D.A.; CULLOR, J.S.; BONDURANT, R.H.; SISCHO, W.M. 1991. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. *Theriogenology.* 36: 257-265.

MORAGA, L.; AGÜERO, H.; BEZAMA, B.; MORALES, M.A. 1994. Evolución de la prevalencia de mastitis bovina en lecherías de la Región Metropolitana, Chile. *Av. Cien. Vet.* 9: 24-28.

MORRISON, D.C.; RYAN, J.L. 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* 38: 417-32.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle: Seventh Revised Edition. National Academy Press. 408 p.

NMC. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 2004. Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 47p.

NMC. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. s.f. Recommended mastitis control program. [en línea] < <http://www.nmconline.org> > [consulta: 20-12-2011]

PINEDO, P.J.; MELENDEZ, P.; VILLAGOMEZ-CORTEZ, J.A.; RISCO, C.A. 2009. Effect of high somatic cell counts on reproductive performance of Chilean dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 92: 1575-1580.

POL, M.; CHAVES, C.J.; MAITO, J.; TIRANTE, L.I.; VENA, M.M.; LAGIOLA, G.; VIANO, D.; FANDINO, F.; BARRA, F.; TARABLA, H.D.; CALVINHO, L.F. 2008. Eficacia de una vacuna polivalente conteniendo *Escherichia coli* J5. *Rev. Vet. Arg.* 245: 331-342.

- RADOSTITS, O; GAY, C.C; BLOOD, D.C.; HINCHELIFF, K.W.** 2002. Mastitis. **In:** Medicina veterinaria: Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España. 2 v. pp: 711-828.
- RUEGG, P.** 2005. Evaluating the effectiveness of mastitis vaccines. University of Wisconsin. Madison. [en línea] < <http://milkquality.wisc.edu> > [consulta: 04-01-2012]
- SANTOS, J.E.; CERRI, R.L.; BALLAU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H.** 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 80: 31-45.
- SHOOK, G.E.** 1993. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. Vet. Clinics of North America: Food Animal Practice 9: 563-581.
- SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S.** 1985a. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J. Dairy Sci. 68: 1531-1553.
- SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S.** 1985b. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. J. Dairy Sci. 68: 402-417.
- SMITH, J.L.; HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.** 1999. Efficacy of intramammary immunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin. J. Dairy Sci. 82: 2582-2588.
- SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.** 2008. Environmental mastitis: know your opponent. NMC. Regional meeting proceedings. [en línea] < <http://www.nmconline.org> > [consulta: 04-01-2012].
- SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L.** 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 7: 135-146.
- SURIYASATHAPORN, W.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; BRAD, A.** 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. J. Dairy Sci. 83: 1248-1255.
- TAYLOR, B.C.; DELLINGER, J.D.; CULLOR, J.S.; STOTT, J.L.** 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8⁺. Cell Immunol. 156: 245-253.
- TIZARD, I.R.** 2004. T helper cells and their response to antigen **In:** Veterinary immunology: an introduction. 7ª ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA. pp 105-116.
- TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.** 1990. Growth of Gram-negative bacteria in dry cow secretion. J. Dairy Sci. 73: 360-372.

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

TYLER, J.W.; CULLOR, J.S.; DELLINGER, J.D. 1990. Cross-reactive affinity purification of immunoglobulin recognizing common Gram-negative bacterial core antigens. J. Immunol Met. 129: 221-226.

TYLER, J.W.; SPEARS, H.; NELSON, R. 1992. Antigenic Homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain, *Escherichia coli* O111:B4 (J5). J. Dairy Sci. 75: 1821-1825.

VAN WERVEN, T.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; DAEMEN, A.J.J.M.; SCHUKKEN, Y.H.; BRAND, A.; BURVENICH, C. 1997. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*. J. Dairy Sci. 80: 67-74.

WENZ, J.R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F.B.; DINSMORE, R.P.; CALLAN, R.J. 2001. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 567-572.

WILSON, D.J.; GONZÁLEZ, R.N. 2003. Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. Vet. Clin. Food Anim. 19: 187-197.

WILSON, D.J.; GONZÁLEZ, R.N.; HERTL, J.; SCHULTE, H.F.; BENNETT, G.J.; SCHUKKEN, Y.H.; GRÖHN, Y.T. 2004. Effect of clinical mastitis on the lactation curve: a mixed model estimation using daily milk weights. J. Dairy Sci. 87: 2073-2084.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.J.; GONZÁLEZ, R.N.; SCHUKKEN, Y.H.; SPATZ, J. 2007. Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. J. Dairy Sci. 90: 4282-4288.

WILSON, D.J.; GROHN, Y.T.; BENNETT, G.J.; GONZÁLEZ, R.N.; SCHUKKEN, Y.H.; SPATZ, J. 2008. Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. J. Dairy Sci. 91: 3869-3879.