



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

**COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DOS VACUNAS CONTRA
MASTITIS AMBIENTAL EN VACAS LECHERAS DE LA ZONA
CENTRAL**

Viviana Andrea Bugeño Flores

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

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

Financiamiento: Fundación para la Innovación Agraria

SANTIAGO, CHILE
2019



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

**COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DOS VACUNAS CONTRA
MASTITIS AMBIENTAL EN VACAS LECHERAS DE LA ZONA
CENTRAL**

Viviana Andrea Bugueño Flores

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

Nota Final:

Firma

Profesor Guía:	Mario Duchens Arancibia
Profesor Corrector:	Oscar Peralta Troncoso
Profesor Corrector:	Patricio Retamal Merino

SANTIAGO, CHILE
2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco día a día el apoyo incondicional que brindó mi familia en este largo camino por la Universidad. A pesar, de lo difícil que resultó poder entrar a la Universidad, logré quebrar el destino y hoy me veo a un paso de comenzar mi etapa profesional, de la cual queda un largo trecho por aprender, y que no podría haber sido posible sin el apoyo de mi familia.

También agradezco a Rodrigo Recabarren, mi pareja, por estar presente en todos los momentos de estos siete años juntos, en donde nos acompañamos mutuamente en esta etapa tan bonita de nuestras vidas.

Dedicatoria especial, al Dr. Duchens por todas las oportunidades que me entregó y por confiar en mí, guiarme y compartir sus conocimientos. Además, de impulsarme a mejorar, a motivarme, quizás sin que se diera cuenta, a ser una mejor profesional.

A los profesores correctores Dr. Oscar Peralta y Dr. Patricio Retamal, por la ayuda entregada en la realización de esta memoria de título. Mención especial, a la Dra. Valeria Rojas, por su apoyo técnico estadístico que facilitó el desarrollo de mi trabajo.

También quiero agradecer al predio Santa Sara, administrador, jefes y trabajadores, que facilitaron el trabajo necesario para realizar éste estudio. No sólo me permitieron adquirir conocimientos del área, sino también aprendí mucho de su calidad humana, que no se enseña en ninguna universidad.

Además, quiero mencionar a los profesores del Departamento de Producción Animal que me dieron la oportunidad de participar como ayudante en distintas asignaturas impartidas en pregrado, que permitieron mejorar mi conocimiento y competencias como futura profesional. También, a la señora Norma San Martín, José Luis Nauto y Alma Yáñez, que hicieron agradable mis días como ayudante, y a los que tengo un gran cariño.

Finalmente, gracias a mis amigas/os de Santiago, Curicó, Chillán y Concepción por estar presente en las “convivencias”, en el estudio o simplemente cuando nos actualizamos de nuestras vidas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Mastitis en la vaca lechera	3
2.1.1. Repercusión económica de la mastitis bovina	4
2.1.2. Incidencia y etiología	5
2.2. Mastitis ambiental: Definición y características	6
2.2.1. Mastitis por coliformes	6
2.2.2. Desarrollo de la enfermedad	9
2.2.3. Factores que condicionan la presentación de mastitis por coliformes	12
2.2.4. Prácticas de prevención de la mastitis ambiental	15
2.3 Vacunación contra la mastitis ambiental y su efecto inmunológico	17
2.3.1 Eficacia de la vacunación sobre la salud mamaria.....	19
2.3.2. Principales factores que afectan la eficacia de la vacuna.....	20
2.3.3. Vacuna subunitaria contra la mastitis	21
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
5.1. Descripción del sistema productivo	24
5.2. Modelo experimental	24
5.3. Obtención de la información.....	25
5.4. Clasificación y diagnóstico de mastitis clínica	25

5.5. Análisis de la información	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1. Incidencia de mastitis clínica	29
6.1.1. Incidencia de mastitis clínica según grupo y número de lactancia	29
6.2. Severidad.....	31
6.2.1. Severidad según grupo y número de lactancia.....	32
6.3. Duración de los casos de mastitis clínica.....	35
6.3.1. Duración de los casos de mastitis clínica según grupo y número de lactancia	35
6.4. Producción de leche	36
6.4.1. Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia según grupo y número de lactancia	37
6.5. Recuento de células somáticas (RCS).....	38
6.5.1. Promedios de puntajes lineales para los controles mensuales	39
6.5.2. Promedios de puntajes lineales según grupo y número de lactancia	40
6.6. Agente causal	43
6.7. Animales muertos o eliminados a causa de mastitis clínica	45
7. IMPLICANCIAS	48
8. CONCLUSIONES	51
9. BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN

La mastitis bovina es uno de los principales problemas de la industria láctea. Esta enfermedad afecta la cantidad y calidad de la leche, presentando un fuerte impacto sobre el bienestar animal. Dentro de las prácticas de manejo de la salud mamaria, el uso de vacunas contra bacterias Gram negativas ha jugado un papel importante en la prevención y control de la enfermedad. Actualmente, se ha desarrollado una nueva vacuna subunitaria contra la mastitis causada por *Escherichia coli*, sobre la cual no hay estudios publicados, y que se espera tenga mejores resultados en su eficacia protectora.

El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de una vacuna subunitaria contra mastitis causada por *Escherichia coli* con la de una vacuna comercial (Enviracor®; Zoetis Inc), en vacas lecheras confinadas de la zona central, a través del estado de salud mamaria, producción de leche e índices de calidad de la misma. Se incluyeron vacas de forma aleatoria a dos grupos experimentales. Un grupo (n = 230) recibió la vacuna subunitaria, mientras que el otro (n=213) fue vacunado con la vacuna J5. El protocolo de inmunización fue similar para ambos grupos, e incluyó tres dosis de vacuna vía subcutánea; la primera al momento del secado, la segunda al parto y la tercera alrededor de los 7 días después del parto.

Se recopiló información desde los registros prediales y de informes realizados por Cooprinsem. La incidencia, el agente causal y la proporción de animales muertos o eliminados por mastitis clínica se analizaron mediante pruebas de comparación de proporciones. La duración de los casos y la producción de leche se evaluaron a través de análisis de varianza. El recuento de células somáticas se analizó a través de un análisis de varianza para medidas repetidas.

Se presentó un total de 146 casos de mastitis clínica. Las incidencias de mastitis clínica en el grupo tratado (n= 86) y en el grupo control J5 (n= 64), no fueron significativamente diferentes ($p = 0,23$). La severidad de los casos de mastitis no fue diferente entre el grupo tratado y control ($p = 0,06$), observándose una tendencia a una mayor severidad de los casos de mastitis clínica en el grupo tratado. La duración de los casos de mastitis clínica, en el grupo tratado ($6,4 \pm 0,4$ días) no fue diferente ($p = 0,47$) a la observada en el grupo control J5 ($6,6 \pm 0,5$ días). La producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia

en vacas tratadas ($4273 \pm 61,6$ L) y vacas control ($4251 \pm 63,6$ L), no fueron diferentes ($p = 0,43$).

El score de células somáticas en el grupo tratado ($2,30 \pm 0,06$) fue superior ($p = 0,005$) al del grupo control ($2,16 \pm 0,06$). Esta diferencia fue más evidente en vacas de segunda lactancia. El análisis de la proporción de bacterias ambientales como causa de los casos clínicos de mastitis, entre el grupo de vacas tratadas ($n = 59$) y grupo de vacas control ($n = 39$), no mostró diferencias significativas ($p = 0,41$). La proporción de animales muertos o eliminados a causa de mastitis clínica en el grupo tratado (1,7%) y el grupo control (1,4%), no fueron diferentes ($p = 0,75$). En conclusión, la vacuna subunitaria mostró un nivel de protección similar al de la vacuna comercial en lo que respecta a las variables analizadas.

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

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the main problems of the dairy industry. This disease affects milk quantity and quality, presenting a strong impact on animal welfare. Within the management practices of mammary health, the use of vaccines against Gram-negative bacteria has played an important role in the prevention and control of the disease. Currently, a new subunitarian vaccine against mastitis caused by *Escherichia coli* has been developed, on which there are no published studies, and which is expected to have better results in its protective efficacy.

The objective of this study was to compare the effectiveness of a subunitarian vaccine against mastitis caused by *Escherichia coli* with that of a commercial vaccine (Enviracor®, Zoetis Inc), in confined dairy cows in the central zone, through the state of mammary health, milk production and quality indexes of it. Cows were randomly included in two experimental groups. One group (n = 230) received the subunitarian vaccine, while the other (n = 213) was vaccinated with the J5 vaccine. The immunization protocol was similar for both groups, and included three doses of vaccine subcutaneously; the first at drying-off, the second at parturition, and the third around 7 days after calving.

Information was collected from the farm records and reports by Cooperinsem. Incidence, causative agent and the proportion of dead or culled cows by clinical mastitis were analyzed by means of proportional comparison tests. Duration of clinical cases and milk production were evaluated through analysis of variance. Somatic cell count was analyzed through an analysis of variance for repeated measures.

A total of 146 cases of clinical mastitis occurred. Incidences of clinical mastitis in the treated group (n = 86) and in the control group J5 (n = 64) were not significantly different (p = 0.23). Severity of clinical mastitis was not different between treated and control groups (p = 0.06), with a trend towards greater severity of clinical mastitis in the treated group. Duration of cases of clinical mastitis in the treated group (6.4 ± 0.4 days) was not different (p = 0.47) to that observed in the control group J5 (6.6 ± 0.5 days). Milk production accumulated at 100 days of lactation in treated cows (4273 ± 61.6 L) and control cows (4251 ± 63.6 L), were not different (p = 0.43).

Somatic cell score in the treated group (2.30 ± 0.06) was higher (p = 0.005) than in the control group (2.16 ± 0.06). This difference was more evident in second lactation cows.

Analysis of the proportion of environmental bacteria as the cause of clinical cases of mastitis, between treated (n = 59) and control cows (n = 39), did not show significant differences (p = 0.41). The proportion of dead or culled cows due to clinical mastitis in the treated group (1.7%) and the control group (1.4%) were not different (p = 0.75). In conclusion, the subunitarian vaccine showed a level of protection similar to that of the commercial vaccine with respect to the variables analyzed.

Key words: subunitarian vaccine, mammary health, clinical mastitis.

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades que produce mayores pérdidas económicas en la producción lechera, ya que afecta tanto la cantidad como la calidad de la leche. Dentro de las mastitis, la de tipo ambiental es más común en aquellos predios que presentan un sistema de confinamiento permanente, frecuente en la zona central del país. En estos sistemas, el principal agente patógeno aislado de las infecciones intramamarias es la bacteria *Escherichia coli*, perteneciente al grupo de los coliformes y que se encuentra presente en el ambiente en el que vive el animal.

La mastitis causada por coliformes se caracteriza por ser oportunista, con un alto riesgo de contagio, en el cual cerca del 80% a 90 % de los animales manifiestan signos clínicos, con una duración promedio por episodio de 10 días (Hogan y Smith, 2012). Todo esto repercute negativamente sobre la rentabilidad de la empresa debido a pérdidas asociadas a la baja producción de leche, costos por tratamiento, muertes o eliminación.

Dentro de las medidas que permite prevenir la mastitis clínica por coliformes, se encuentran, por una parte, aquellas que disminuyen la exposición del pezón a los agentes patógenos, limitando el contagio hacia los animales. Alternativamente existen estrategias que potencian la respuesta inmune, a partir de la vacunación, la cual es comúnmente utilizada como un método de control. La vacuna comercial más utilizada en la zona central es la vacuna J5 (Enviracor®, Zoetis Inc, Kalamazoo, MI, USA), la cual está formulada a base de una cepa rugosa de *Escherichia coli* O111:B4. A partir de diversos estudios se ha evaluado su efectividad con respecto al efecto de la vacuna contra la mastitis clínica, el cual se expresa en una disminución en la severidad y duración de los casos, sin afectar significativamente la incidencia (Smith *et al.*, 1985a; González *et al.*, 1989; Hogan *et al.*, 1992b; Hogan *et al.*, 1995; González *et al.*, 1996;; Hogan *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009).

Recientemente se ha desarrollado una vacuna subunitaria, no disponible comercialmente, altamente inmunogénica, a base de nanovesículas de fragmentos bacterianos, de pared y membrana celular y liposomas de *Escherichia coli*. Permite utilizar todos los antígenos de superficie bacteriana y proteínas de membrana, peptidoglicanos, ADN, entre otros elementos

moleculares intracelulares que potencian significativamente la respuesta inmune. La formulación utilizada permite obtener antígenos intactos, lo que permitiría mejorar la efectividad y duración de la respuesta inmune en el animal. Debido a la falta de estudios previos, y a la necesidad de crear nuevas soluciones a los desafíos sobre sanidad mamaria, sumado a su importancia en la rentabilidad de la empresa y calidad de la leche destinada a los consumidores, es que en esta memoria se planteó comparar la efectividad de una nueva vacuna subunitaria con la vacuna Enviracor J5 en condiciones de campo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mastitis en la vaca lechera

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, que produce daño patológico del epitelio glandular, causada principalmente por bacterias (Zhao y Lacasse, 2008). La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria causada por agentes infecciosos y no infecciosos, dentro de los infecciosos se encuentran las bacterias, micoplasmas, levaduras y algas (Bradley, 2002). El proceso inflamatorio, en respuesta a la presencia de agentes patógenos, activa reacciones locales, involucra la entrada de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a la glándula mamaria, que pueden ocasionar daño en el tejido mamario del animal (Aitken *et al.*, 2011). Los microorganismos ingresan a través del canal del pezón, invaden y proliferan en el tejido glandular, alterando la cantidad y composición de la leche producida, pudiendo afectar uno o más cuartos. Se puede inferir, entonces, que la mastitis es una enfermedad compleja, cuya presentación está estrechamente relacionada con la interacción existente entre el huésped susceptible, agente etiológico y el ambiente, componentes de la llamada triada epidemiológica.

La mastitis se clasifica según la presencia de síntomas, en mastitis clínica y mastitis subclínica. La mastitis clínica (MC) se caracteriza por alteraciones visibles de la leche o la ubre, con signos evidentes de inflamación de la glándula mamaria como enrojecimiento, hinchazón y dolor del cuarto afectado, provocando cambios químicos y físicos en la leche pudiendo comprometer al animal al desarrollo de una enfermedad sistémica (Koeck *et al.*, 2012). Por otro lado, la mastitis subclínica se presenta como una inflamación local leve e inaparente de la glándula mamaria, la leche presenta aspecto normal y no hay signos de inflamación en la glándula mamaria del animal, pero de igual forma se ve afectada la cantidad y calidad de la leche producida, siendo necesario para su diagnóstico el uso de técnicas de laboratorios, a través de la medición del recuento de células somáticas en leche (Constable *et al.*, 2017). La mastitis puede ocasionar distintos niveles de daño al tejido mamario, causando importantes efectos negativos en la salud y producción a corto plazo e incluso llegar a afectar la vida productiva futura, lo que requiere distintos tratamientos y de elevados costos económicos (Oliveira y Ruegg, 2014).

2.1.1. Repercusión económica de la mastitis bovina

La mastitis, independiente de su forma de presentación, representa la enfermedad más costosa del ganado lechero debido a la disminución en la producción y calidad de la leche, costos por tratamiento y leche de descarte, entre otros. Se ha determinado a partir de un estudio en lecherías de alto rendimiento en EE.UU, que el costo promedio por caso de mastitis clínica fue de USD 179, de los cuales USD 115 corresponden a costos asociados a la pérdida de leche, USD 14 por aumento de mortalidad y USD 50 por los costos implicados en el tratamiento de los casos de mastitis clínica (Bar *et al.*, 2008). Por su parte, se ha estimado los costos directos e indirectos de los casos de mastitis clínica ocurridos en los primeros 30 días de lactancia (Rollin *et al.*, 2015). El costo promedio de un caso de mastitis clínica en éste periodo alcanzó los USD 444, valor compuesto por USD 128 de costos directos por concepto de leche no comercializable, pérdida por muerte, tratamientos realizados y mano de obra, y por USD 316 de costos indirectos, relacionados a la disminución futura de leche, sacrificio y pérdidas reproductivas. Estos últimos, son costos manifestados en el resto de la lactancia, los que representan un costo económico considerable en la rentabilidad de la industria láctea.

El impacto económico de la mastitis clínica, también ha sido estimado según agente causal, encontrando que bacterias Gram negativas representan un costo más elevado comparado con las mastitis causadas por bacterias Gram positivas, siendo de USD 210 y USD 130, respectivamente (Cha *et al.*, 2011). En el mismo estudio, se observó que el costo promedio por caso de mastitis clínicas causadas por bacterias Gram negativas, estuvo relacionado principalmente a pérdidas productivas, mientras aquellas causadas por bacterias Gram positivas se relacionaron a costos por tratamiento.

En la misma línea, la relación entre la mastitis clínica y sus repercusiones en la producción de leche ha sido investigada. Un estudio ha descrito que vacas que presentan mastitis clínica, no sólo reducen la producción de leche durante el cuadro clínico, sino también el nivel productivo a lo largo del resto de la lactancia (Rajala-Schultz *et al.*, 1999). Pérdidas productivas en relación al agente bacteriano causal, han mostrado que mastitis clínicas causadas por bacterias Gram negativas presentan un mayor impacto productivo, en comparación a los casos de bacterias Gram positivas, alcanzando valores de 304 kg y 128

kg, respectivamente, en los 50 días posteriores al caso de mastitis clínica (Schukken *et al.*, 2009). Otros autores, también han estimado la pérdida diaria de leche en vacas que han sufrido mastitis clínica, la que podría alcanzar de 1 a 2,5 kg durante las primeras dos semanas posteriores al caso clínico, presentando diferente impacto según el número de partos y de la etapa de lactancia (Rajala-Schultz *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha detectado una relación directa entre los casos de mastitis y el número de lactancia, por lo que vacas con mastitis clínica en la primera lactancia presentan un mayor riesgo de presentar mastitis en la segunda lactancia (Dhakal *et al.*, 2016).

2.1.2. Incidencia y etiología

La incidencia de mastitis en Chile ha sido difícil de determinar, ya que no se han realizado investigaciones continuas de sus cambios a nivel nacional que permitan dimensionar el problema. A partir de estudios llevados a cabo en la Región Metropolitana, Moraga *et al.* (1994) estimaron que la prevalencia de mastitis, independiente de su presentación, fue aproximadamente del 64% anual. Por su parte, Azócar (2001) determinó que la prevalencia de mastitis clínica fue cercana al 49% anual, según datos recabados en la zona central de Chile.

Los principales microorganismos causantes de mastitis se clasifican en dos grandes grupos, según fuente de infección, en patógenos ambientales y en patógenos contagiosos. Dentro de las bacterias ambientales se encuentran; *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* (Oliver y Murinda, 2012), de origen intestinal, siendo el ambiente la principal fuente de infección. Por su parte, los patógenos de tipo contagiosos incluyen a *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp* (Zhao y Lacasse, 2008), siendo la glándula mamaria la principal fuente de infección.

Varios estudios sobre la proporción de los agentes patógenos causantes de mastitis clínica se han realizado en los sistemas productivos a nivel nacional. Donoso (1997), determinó en la Región Metropolitana la frecuencia de los agentes patógenos en vacas lecheras con mastitis clínica, resultando que el agente bacteriano mayormente aislado correspondió a *E. coli* (38,2%), en segundo lugar a *Staphylococcus coagulasa negativos* (CNS) (15,9%) y en tercer lugar *S. aureus* (6%). Por su parte, Azocar (2001) informó a partir de un estudio

bacteriológico de los casos de mastitis clínica, que la mayor proporción de patógenos aislados fueron bacterias contagiosas, representado por CNS (25%) y *S. aureus* (10%), y sólo una menor cantidad fue aislado *E. coli* (5%). Estos resultados difieren a los descritos en la literatura, lo que podría deberse al número reducido de muestras, y sobre todo al tipo de sistema de producción, basado en pastoreo, entre otras causas.

A partir de un estudio llevado a cabo en la zona central y sur de Chile, San Martín *et al.* (2002) observaron que vacas lecheras de la zona central presentaron un alto desarrollo de bacterias Gram negativas (45,2%), cuyo principal agente causal fue *E. coli* (40,8%), en tanto, en la zona sur hubo predominio de bacterias contagiosas, con mayor importancia de *S. aureus* (55,5%). Otro estudio mostró que del total de aislados bacterianos fueron identificado a *S. aureus*, CNS y *E. coli* como los agentes patógenos mayormente aislados, lo que corresponde a 44,7%, 24,2% y 15,7% de la totalidad de casos clínicos, respectivamente (San Martín *et al.*, 2003). Datos más recientes reportan que vacas con mastitis de la zona central presentaron un alto predominio de *E. coli* y CNS mientras en la zona sur fue identificado a *S. aureus* como el microorganismo causal más frecuentemente aislado de vacas con mastitis (Reyes *et al.*, 2016).

2.2. Mastitis ambiental: Definición y características

2.2.1. Mastitis por coliformes

Los coliformes son un grupo bacteriano Gram negativo, fermentadores de lactosa del tipo aerobia o anaerobia facultativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Los géneros clasificados como coliformes incluyen *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Schukken *et al.*, 2012). Además, hay otros tipos de especies bacterianas Gram negativas que pueden causar infecciones intramamarias, pero con características distintas a las mastitis causadas por coliformes, entre estos se pueden mencionar a las especies *Pseudomonas*, *Proteus*, y *Serratia*, encontrándose ocasionalmente como causante de los cuadros de mastitis clínica (Britten, 2012).

Los coliformes, son clasificados como bacterias de tipo ambiental, y son responsables de causar la mayor proporción de las mastitis clínicas en sistemas de confinamiento intensivos, siendo el ambiente su principal fuente de infección, pudiendo estar presente en variados

lugares en el hábitat del animal, quedando las vacas expuestas permanentemente a las bacterias potencialmente patógenas. Los patógenos ambientales causantes de mastitis son principalmente bacterias pertenecientes al grupo de los coliformes, siendo la especie *E. coli* la principal responsable de los casos clínicos de mastitis, es una bacteria que forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente (Hogan y Smith, 2012). Por su parte, los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* se encuentran principalmente en suelos, granos, agua y tracto gastrointestinal de los animales, que comúnmente suelen estar presente en las mangueras de la sala de ordeño utilizadas para lavar las ubres, contaminadas durante la ordeña (Hogan y Smith, 2012). Las vacas se encuentran echadas la mayor parte del día, lo cual hace que sus pezones estén en constante contacto con los materiales de cama, aumentando el riesgo de contagio debido a la gran cantidad agentes bacterianos existentes en dichos materiales, encontrándose una relación directa entre estas y las bacterias detectadas en los pezones y la tasa de mastitis clínica (Hogan y Smith, 2012). A pesar de que estas bacterias pueden causar variadas enfermedades infecciosas, entre ellas algunas que pueden afectar el tracto respiratorio y urogenital en vacas lecheras, la diseminación de estas bacterias hacia la glándula mamaria no es de importancia (Hogan y Smith, 2012).

Las bacterias coliformes no pueden sobrevivir en la piel del pezón por un periodo de tiempo prolongado, además tienen baja capacidad de adaptación a la glándula mamaria, y ante una infección, la vaca responde frecuentemente con una adecuada respuesta inmune, pudiendo a menudo eliminar al agente infeccioso (Ruegg, 2012). La mastitis clínica por coliformes se caracteriza por presentar cuadros clínicos leves o moderados, y en menor medida casos clínicos severos, estos últimos pueden alcanzar el 10% del total de casos clínicos de mastitis (Hogan *et al.*, 1989; Oliveira y Ruegg, 2014). Las manifestaciones clínicas leves, incluyen distintos grados de inflamación del cuarto afectado, pudiendo evolucionar a un caso clínico moderado, el que se acompaña de alteraciones visibles de la secreción láctea, y eventualmente generar una enfermedad severa, con signos sistémicos, asociados a una disminución del consumo de alimento, fiebre, deshidratación, muerte o eliminación del animal del sistema productivo (Hogan *et al.*, 1989; Ruegg, 2012).

Aproximadamente el 85% de las infecciones intramamarias causadas por coliformes derivan en mastitis clínica, y rara vez causan un aumento en el recuento de células somáticas en leche,

presentándose estas mastitis en mayor medida en rebaños bien manejados, con bajo recuento de células somáticas y con aumentos en el número de casos clínicos mensuales (Hogan y Smith, 2003; Ruegg, 2012).

Las infecciones causadas por coliformes son consideradas oportunistas y en promedio tienen una duración de 10 días (Hogan y Smith, 2012), variando según agente infeccioso y del nivel de adaptación de estos a la glándula mamaria, por lo que la prevalencia de mastitis clínica por coliformes no excede el 2%, pero pueden llegar a causar cerca del 30 a 40% de los casos de mastitis clínica (Hogan *et al.*, 1989). Las mastitis clínicas por coliformes, específicamente las causadas por *E. coli* y *Klebsiella spp*, rara vez presentan un curso crónico, con duraciones superiores a 90 días, sin embargo estas bacterias pueden persistir por un largo tiempo en el interior de la glándula mamaria, lo que no es una cualidad de todas las bacterias Gram negativas (Hogan y Smith, 2003). Por su parte, *Serratia spp* y *Pseudomonas spp*, con frecuencia producen infecciones intramamarias crónicas, que pueden incluso persistir en lactancias posteriores (Hogan *et al.*, 1989).

Durante la lactancia, cerca del 80% al 90% de las infecciones intramamarias por coliformes cursa con signos clínicos (Smith y Hogan, 2001). Las bacterias pueden invadir y multiplicarse dentro de la glándula mamaria, causando manifestaciones clínicas debido a la presencia de toxinas en la pared celular de las bacterias Gram negativas, las cuales son liberadas una vez muerta hacia el torrente sanguíneo, destruyendo las membranas celulares y dañando el tejido productor de leche, llegando a causar signos sistémicos de la enfermedad. Se ha observado que cerca del 70% de los casos clínicos de mastitis causadas por bacterias Gram negativas se presentan durante los primeros 90 días de lactancia (Hogan *et al.*, 1992), lo que ha establecido la importancia de esta enfermedad en los sistemas productivos. Adicionalmente, las mastitis clínicas causadas por bacterias Gram negativas presentan un mayor riesgo de muerte y sacrificio, en comparación a los casos clínicos causados por bacterias Gram positivas (Cha, *et al.*, 2013).

Varios estudios han determinado que las infecciones intramamarias causadas por bacterias Gram negativas, manifiestan mayores pérdidas de leche posterior a un caso clínico de mastitis, en comparación a las causadas por bacterias Gram positivas u otros microorganismos (Milne *et al.*, 2003; Schukken *et al.*, 2009).

2.2.2. Desarrollo de la enfermedad

Las bacterias logran ingresar a la glándula mamaria a través del canal del pezón. Es la principal puerta de entrada de las bacterias coliformes y la primera línea de defensa del sistema inmune innato, compuesta por elementos físicos y químicos, que limita el ingreso de agentes bacterianos a la glándula mamaria. A pesar que se desconoce el mecanismo por el cual logran ingresar, es probable que al ser patógenos oportunistas aprovechen momentos en los que el canal disminuye su capacidad de barrera (Hogan y Smith, 2003), como son el periodo próximo al parto y durante o posterior al proceso de ordeña, en los que está mayormente expuesto, lo que facilita la entrada de bacterias ambientales a través del canal del pezón.

Existe una compleja cadena de respuestas inmunes innatas y adaptativas relacionadas entre sí, y que son claves en la defensa de la glándula mamaria contra las infecciones bacterianas causantes de mastitis. Una vez que las bacterias coliformes atraviesan el canal del pezón y logran entrar a la cisterna de la glándula mamaria, se encuentran con distintos factores antibacterianos solubles como péptidos, lactoferrinas, sistema del complemento, lisozima, y citoquinas, que presentan propiedades bactericidas y bacteriostáticas que atacan a las bacterias invasoras (Aitken *et al.*, 2011). Estos factores pueden fluctuar sus concentración en los distintos periodos de lactancia, pudiendo cambiar su eficacia frente a distintas bacterias patógenas que producen mastitis (Aitken *et al.*, 2011).

Una vez que los coliformes sobrepasan las barreras naturales de la glándula mamaria, tanto las bacterias como los leucocitos, liberan una serie de productos, que permiten la movilización rápida de neutrofilos desde la sangre hacia el cuarto mamario afectado, provocando un aumento de las células somáticas en leche, que incluyen a macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos (Kehrli, 1994). Esta respuesta se caracteriza por ser inespecífica y por no mejorar con exposiciones sucesivas al agente infeccioso. Una vez instalada la infección intramamaria, las células somáticas aumentan paulatinamente en las primeras 12 a 24 horas, donde los neutrofilos son el principal componente de este incremento (Kehrli, 1994).

Los coliformes se caracterizan por un rápido crecimiento bacteriano, acompañado de la liberación de endotoxinas, que promueven la liberación de eicosanoides y citoquinas por las células inmunes, que desencadenan una respuesta inmune aguda y de corta duración, característica de este tipo de infección (Hogan y Smith, 2003; Aitken, 2011). Si la defensa inmune innata logra destruir a la bacteria, el reclutamiento de células defensivas se detiene y sólo una leve inflamación local es necesaria para recuperar el estado normal de la glándula mamaria. De acuerdo a lo eficiente de esta respuesta, va a ser la velocidad de eliminación de los agentes patógenos, y el impacto que tenga sobre la funcionalidad de la glándula mamaria, que puede llegar a afectar la calidad y cantidad de leche producida. En ocasiones, puede ocurrir que la respuesta inmune innata se vea superada por la infección intramamaria, permitiendo el crecimiento bacteriano y prolongándose la respuesta inmunológica, manifestando signos clínicos más severos, que van en directa relación al nivel de daño del tejido mamario (Kehrlí, 1994). La importancia de una adecuada respuesta inmune innata radica en el efecto directo sobre la respuesta inmune adaptativa, ya que afectaría la gravedad y duración de las infecciones intramamarias (Aitken *et al.*, 2011).

Cuando la respuesta inmune innata no logra acabar con la infección, el sistema inmune adaptativo se activa, a través de una respuesta mediada por linfocitos y células de memoria específicas contra los antígenos actuantes. Estas células tienen la capacidad de reconocer patrones antigénico específicos de un patógeno determinado, cuya respuesta puede tardar varios días en establecerse (Aitken *et al.*, 2011). La inmunidad adquirida se basa en el reconocimiento de antígenos, a través de los linfocitos CD4+, CD8+ y linfocitos B, que permiten ante una segunda exposición responder de forma específica, más rápida y por un tiempo más prolongado, respuesta conocida como “memoria inmunológica” (Aitken *et al.*, 2011).

Se describen distintas funciones de las células del sistema inmune adaptativo. Por una parte, los linfocitos B, sintetizan y secretan anticuerpos específicos contra los agentes bacterianos actuantes, los que reconocen y antagonizan los factores de virulencia bacterianos (Aitken *et al.*, 2011). Por otra parte, los linfocitos T, al ser estimulados por las bacterias patógenas, producen y liberan una serie de citoquinas que modulan la magnitud y duración de la respuesta inmune celular (Aitken *et al.*, 2011). El nivel de respuesta a la infección

intramamaria depende, en parte, a los factores específicos de virulencia bacteriana y a la interacción existente entre el agente infeccioso y el hospedero, relaciones que son variables, y que pueden resultar en síntomas agudos o crónicos en el desarrollo de la mastitis clínica (Aitken *et al.*, 2011).

2.2.3.1. Factores de virulencia bacteriana

Las bacterias coliformes presentan, en la superficie celular, una serie de factores de virulencia bacteriana, que son claves en el desarrollo de la infección intramamaria. Entre ellos, los elementos que permiten crecer y multiplicarse, relacionados con la capacidad de evadir los mecanismos de defensa de la glándula mamaria (Hogan y Smith, 1995). Los coliformes, parecen no depender de la adhesión al epitelio glandular, sino más bien del ambiente intramamario, debido a la presencia de secreción láctea, condicionando la velocidad de multiplicación bacteriana y la presentación de la enfermedad (Hogan y Smith, 2003). Existen factores de virulencia que les permiten crecer y multiplicarse utilizando la lactosa como fuente de energía y sobrevivir en condiciones de baja tensión de oxígeno (Hogan y Smith, 2003), cuyas poblaciones pueden alcanzar las 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro de leche, dentro de las 24 horas posterior a la infección intramamaria (Hogan *et al.*, 1992a), lo que va en directa relación con la severidad de la enfermedad.

Se ha observado que *Klebsiella spp* presenta antígenos de superficie que le permiten boquear la acción del sistema de complemento y disminuir la opsonización por parte de los anticuerpos (Williams *et al.*, 1988). En tanto, se describe que *E. coli* es capaz de evadir la fagocitosis, facilitando el desarrollo de la enfermedad, la que se caracteriza por presentar cuadros clínicos de mayor duración, retrasando el funcionamiento normal de la glándula mamaria (Hogan y Smith, 2003). Además, se ha observado que bacterias *E. coli* aisladas de casos clínicos de mastitis, ocurridos en el periodo periparto, presentaron una mayor resistencia a la fagocitosis bacteriana, comparado a las infecciones intramamarias presentadas en el periodo seco temprano o en el transcurso de la lactancia (Hogan *et al.*, 1992a).

Adicionalmente, las bacterias Gram negativas presentan un factor de virulencia clave en el desarrollo de las infecciones intramamarias. Es un lipopolisacárido (LPS) o endotoxina de

membrana externa, el que representa el principal factor de virulencia presente en las bacterias coliformes (Hogan y Smith, 2003). Los síntomas clínicos de la infección están relacionados con la interacción existente entre las endotoxinas y el sistema inmune del animal, en el cual estas moléculas cobran un rol importante, al ser responsable de daños locales y sistémicos. Estos últimos causados por la destrucción de la barrera epitelial, pudiendo las endotoxinas alcanzar el torrente sanguíneo, causando signos sistémicos de la enfermedad como anorexia, fiebre, y diarrea, pudiendo incluso provocar la muerte del animal (Hoeben *et al.*, 2000).

2.2.3.2. Lipopolisacárido: una molécula clave

El lipopolisacárido es el componente con mayor presencia en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y presente en los coliformes (Hogan y Smith, 2003). Representa el antígeno de superficie más importante, el que posee una función clave en la estimulación y coordinación del sistema inmune (Hogan y Smith, 2003). El lipopolisacárido está compuesto por una región lipídica (lípidos A) y una región glicosídica (polisacárido). El lípidos A, es la porción que le otorga las propiedades inmunoestimulante a la molécula. En tanto, la porción glicosídica, está compuesta de un antígeno central, el que se encuentra fuertemente conservado entre y dentro de las especies Gram negativas, y por una unidad terminal, que le otorga variabilidad antigénica en este tipo de microorganismo (Schukken *et al.*, 2012). Estas unidades, al presentar funciones separadas y/o sinérgicas, se establecen como uno de los factores de virulencia más complejos. La endotoxina es liberada una vez ocurrida la división o muerte celular, promoviendo la respuesta inflamatoria, la que no tendría un efecto directo sobre las células secretoras de leche, sino más bien actuarían afectando el flujo sanguíneo a nivel local (Hogan y Smith, 2003). Estos componentes inmunoestimulante son la base de la formulación de vacunas, ya que juegan un rol importante en el incremento de la efectividad y duración de la respuesta inmune en el animal, beneficiando el efecto protector sobre la salud mamaria (Sáenz y Lapierre, 2014).

2.2.3. Factores que condicionan la presentación de mastitis por coliformes

Las infecciones intramamarias causadas por bacterias coliformes aumenta de forma significativa en la lactancia temprana, característica típica de la mastitis causada por patógenos ambientales, disminuyendo progresivamente en el transcurso de la lactancia

(Smith *et al.*, 1985a). Así mismo, se describe una alta tasa de nuevos casos de mastitis clínica causados por bacterias coliformes en el periodo seco, debido a una mayor susceptibilidad de las vacas, la cual es mayor dos semanas posteriores del inicio de dicho periodo y dos semanas antes del parto (Smith *et al.*, 1985b). Un número importante de infecciones intramamarias que se producen en el periodo seco persisten en la lactancia temprana, observándose que cerca del 65% de los casos clínicos causados por coliformes presentes en el parto y en los dos primeros meses de lactancia, son infecciones intramamarias ocurridas durante el periodo seco, siendo principalmente causadas por *E. coli* (Smith *et al.*, 1985a).

Sin embargo, a pesar de que las vacas estén expuestas permanentemente a estas bacterias durante la lactancia, en el periparto son más susceptibles debido a la reducción en la capacidad para combatir infecciones como resultado de la depresión inmunológica (Ruegg, 2012). La vaca durante el periparto presenta una serie de eventos importantes que afectan negativamente la función inmunológica, como son los cambios a nivel hormonal, el estrés del parto, el aumento de las exigencias nutricionales debido a cambios metabólicos y el balance energético negativo. Estos factores afectarían la cantidad y capacidad funcional de los neutrófilos polimorfonucleares, que producen una respuesta más lenta ante una invasión bacteriana y disminuyen la capacidad de fagocitar y destruir a las bacterias patógenas, aumentando la incidencia y severidad de la mastitis, lo que sería consecuencia de un aumento del estrés oxidativo (Aitken *et al.*, 2009).

Los neutrófilos son la principal barrera defensiva celular de la glándula mamaria, y representan el principal incremento en las células somáticas durante una infección (Zhao y Lacasse, 2008). Sin embargo, a pesar de lo fundamental que resultan estas células en una infección intramamaria, se ha demostrado que la liberación de los metabolitos intermedios de oxígeno y enzimas proteolíticas pueden dañar el tejido mamario, afectando la funcionalidad de la glándula mamaria (Zhao y Lacasse, 2008), repercutiendo en la cantidad y calidad de leche producida. Se ha reportado que la presentación de casos clínicos de mastitis causados por bacterias ambientales, estaban estrechamente relacionado con un deterioro de los mecanismos inmune defensivos (Kremer *et al.*, 1993).

En el periparto, se ve afectada la respuesta de las células T CD4⁺, subdivididas en células T helper 1 (Th1) y células T helper 2 (Th2); las primeras tendrían un rol defensivo clave a nivel

local en la glándula mamaria, y en la protección contra la mastitis. En la etapa de transición se presentan cambios en los mecanismos de modulación de la respuesta inmune, predominando la respuesta Th2 humoral, desplazando y disminuyendo la capacidad de respuesta Th1 celular, lo que afectaría el movimiento de células de la línea de defensa innata hacia la glándula mamaria, y la posterior opsonización de las bacterias patógenas, lo que aumentaría la posibilidad de desarrollar mastitis por coliformes (Quesnell *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha visto una relación entre la edad de las vacas, la estación del año y el estado de lactancia, lo que podría afectar la susceptibilidad de las vacas a presentar mastitis clínicas causadas por bacterias Gram negativas. Diversos estudios muestran una mayor tasa de mastitis clínica causadas por bacterias ambientales a medida que aumentan el número de partos (Smith *et al.*, 1985a), lo que estaría relacionado con una disminución en la eficiencia del sistema inmunológico. Por otra parte, se ha descrito que la estación del año tiene un efecto sobre la presentación de mastitis clínica, siendo más evidente durante el verano, en vacas mantenidas en confinamiento permanente, lo que coincide con un elevado recuento de bacterias Gram negativas en las camas (Todhunter *et al.*, 1991), ya que favorecería el crecimiento de patógenos causantes de mastitis (Elghafghuf *et al.*, 2014). Además, se ha observado que el riesgo de presentar mastitis clínica por coliformes es mayor en vacas más viejas, cuyos partos son en verano (Smith *et al.*, 1985^a).

Adicionalmente, podría haber un efecto del estrés por calor sobre la incidencia de mastitis clínica por coliformes, ya que afectaría la resistencia de los animales a las infecciones bacterianas, pero se requieren más estudios para evaluar su efecto (Hogan y Smith, 2003). La mastitis clínica por coliformes se presentan más frecuentemente en condiciones de alta temperatura y humedad, por lo que la estación del año afectaría la tasa de nuevas infecciones por coliformes, presentándose con más o menos frecuencia en cierta estación del año (Hogan y Smith, 2003). Existen otros factores que pueden favorecer la presentación de mastitis clínica, como son la conformación de ubres y pezones, factores genéticos, el nivel de células somáticas presente en leche, entre otros.

El tipo de sistema productivo es un factor importante en la presentación de mastitis ambiental. Las vacas en confinamiento permanente tienen más riesgo de presentar este tipo de mastitis, comparado con las vacas a pastoreo, cuyas características y manejos predisponen al

desarrollo de infecciones intramamaria, ya que aumenta la exposición de la punta del pezón a los coliformes ambientales. Adicionalmente, el material de las camas es un factor relevante, es así que los materiales de cama orgánico, como aserrín, virutas, estiércol reciclado, entre otros, que en condiciones de alta temperatura y humedad, presentan un alto número de *Estreptococos* y coliformes ambientales (Hogan y Smith, 2003), que aumentan el riesgo de contagio de bacterias potencialmente patógenas causantes de mastitis.

La estación del año y la ubicación geográfica, representan un factor de riesgo adicional, afectando la presentación de mastitis por coliformes en ciertas épocas del año. Además, las vacas presentan un mayor riesgo de sufrir mastitis, al existir un aumento de la densidad animal, baja ventilación, higiene y limpieza inadecuada de los cubículos, y otros sectores de movimiento animal (Hogan y Smith, 2003). Por lo anterior, el control de la mastitis clínica causada por bacterias ambientales, es una tarea compleja y difícil de controlar.

2.2.4. Prácticas de prevención de la mastitis ambiental

Uno de los desafíos constante en el manejo de la mastitis ambiental, es lo heterogéneo que resultan las bacterias Gram negativas, con características fenotípicas y fuentes de contaminación diversa, sumado a las distintas cepas de especies bacterianas existentes, lo que ha dificultado el éxito de las medidas de prevención tendientes a controlar la mastitis en los sistemas productivos (Hogan y Smith, 2003). Las prácticas de manejo de las infecciones intramamarias causadas por coliformes contempla varias medidas, entre ellas las destinadas a controlar el riesgo de contaminación del pezón, y por otro lado aquellas que mejoran o potencian la respuesta inmune frente a las bacterias coliformes causantes de mastitis.

2.2.5.1. Programas de control ambiental

Las bacterias coliformes se encuentran presentes en el ambiente en el que habitan las vacas, y su eliminación del sistema productivo es imposible, por ello se han establecido programas para el control de la mastitis ambiental en sistemas productivos, que se enfocan en disminuir la cantidad de bacterias a la cual se ve expuesta la punta del pezón y que estas no logren entrar a través del conducto del pezón, los que contemplan una serie de medidas de manejos recomendados por el National Mastitis Council (NMC, s.f).

El control del riesgo de contagio en los planteles lecheros es una tarea constante. Dentro de las medidas que permiten reducir la exposición a partir del ambiente, se encuentran aquellas que controlan los factores que inciden en la contaminación del pezón, como son el proveer un ambiente limpio, seco, confortable, en conjunto a buenas prácticas de pre ordeño y ordeño (Hogan y Smith, 2003). Es importante realizar un diagnóstico oportuno de los casos clínicos de mastitis, eliminando a las vacas crónicamente infectadas, acompañado en lo posible de cultivos bacteriológicos del cuarto afectado, aplicando posteriormente un tratamiento adecuado y oportuno. Se recomienda además, el uso de una terapia de secado, que consta de la administración de un antibiótico comercial apropiado para las bacterias ambientales, en todos los cuartos mamarios, de acción prolongada, con posterior uso de un sellador interno de pezones (NMC, s.f).

2.2.5.2. Fortalecimiento de la respuesta inmunológica

Otra área de la prevención está enfocada en aumentar la resistencia de los animales a las infecciones intramamarias, fortaleciendo el sistema inmune adaptativo, a partir de la vacunación. La inmunización se define como una exposición controlada a un patógeno determinado, en ausencia de una infección real, que permite mejorar la respuesta inmune frente a una segunda exposición (Erskine, 2012). La vacunación tiene la capacidad de manipular el desarrollo, la supervivencia y la migración de las células de la memoria que son clave para una vacunación exitosa.

La investigación de la vacunación contra las bacterias ambientales ha ido de la mano con la búsqueda de la protección contra las bacterias coliformes causantes de mastitis. Los programas de vacunación tienen como principios aumentar la capacidad de las vacas para neutralizar las infecciones intramamarias, prevenir nuevos casos clínicos de mastitis y minimizar las alteraciones tisulares producto de las infecciones bacterianas (Sordillo, 2018). Además, la vacunación permite disminuir la propagación de los agentes patógenos en el sistema productivo y restringir el uso de antibióticos para tratar los casos clínicos de mastitis. La inmunización provee un mejoramiento de la actividad inmune mediada por células y anticuerpos, presentes en sangre y leche, contra determinantes antigénicos específicos (Sordillo, 2018).

Dentro de las principales dificultades que enfrentan los científicos en la elaboración de vacunas contra las bacterias coliformes, se pueden mencionar; la discrepancia existente entre las diferentes especies y cepas bacterianas, la falta de comprensión de los mecanismos inmunes específicos de la glándula mamaria, en conjunto a la dificultad para mantener altos niveles de inmunoglobulinas en leche, y el establecer de protocolos de vacunación apropiados (Wilson y González, 2003).

2.3 Vacunación contra la mastitis ambiental y su efecto inmunológico

El uso de vacunas contra las bacterias Gram negativas en el ganado lechero se ha transformado en una práctica habitual en los sistemas productivos. Actualmente se encuentran disponibles en el comercio varias vacunas contra la mastitis, y el estudio de su eficacia ha sido evaluado hace más de 25 años. En la actualidad una de las vacunas ampliamente utilizada, en el mundo y en Chile, es la Enviracor J5. Esta vacuna está formulada a base de una cepa rugosa mutante de *Escherichia coli* O111:B4 que carece del antígeno cápsula “O” de la pared celular, pero conserva el lipopolisacárido de núcleo, proteínas de membrana, y los antígenos de lípidos A intactos (Smith *et al.*, 1999; Hogan y Smith, 2009; Erskine, 2012). Estos patrones son comunes y altamente conservados entre las bacterias Gram negativas. Por lo anterior, la vacuna desarrolla una “memoria inmunológica” caracterizada por presentar una reacción cruzada para distintas especies y cepas de bacterias Gram negativas. A partir de ensayos experimentales, se han obtenido distintos resultados con respecto a la respuesta a la vacunación, aunque actualmente se conocen limitaciones en su tecnología (Erskine, 2012).

Los mecanismos inmunológicos que ocurren posterior a la vacunación y que tienen efecto en la protección contra la mastitis clínica actualmente son desconocidos. Teóricamente la serie de eventos posteriores a la inmunización son homologados a los estudiados en modelos humanos y en ratones (Dosogne, 2002). Tras la inmunización subcutánea, las unidades antigénicas se unen a las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células B activadas, o células dendríticas), los que son internalizados y posteriormente expuestos en las superficies celulares en conjunto a las moléculas de histocompatibilidad clase II. Estas células viajan hacia los tejidos linfoides, para presentar los antígenos a las células T CD4⁺ (células T auxiliares) y células T CD8⁺ (células T citotóxicas), que permiten ante una segunda

exposición responder de forma específica, más rápida y por un tiempo más prolongado, respuesta conocida como “memoria inmunológica”, así las vacas con infecciones intramamarias causadas por bacterias coliformes, presentan una respuesta inmune más efectiva comparada con las vacas no vacunadas.

Es probable que los linfocitos tengan un rol importante en la regulación de la respuesta inmune en la mastitis por coliformes, sin embargo el mecanismo por el que estas actúan no está del todo dilucidada (Dosogne, 2002). Una de las hipótesis es que la vacunación potencia la respuesta inmune celular a través de la acción de las células T CD4⁺, subdivididas en células Th1 y células Th2, respuesta que involucra la acción de citoquinas. Una respuesta inmune celular clásica en las infecciones por coliformes corresponde al tipo Th1, la que permite modular la actividad de macrófagos, y la adhesión, opsonización y diapedesis de los polimorfonucleares hacia la glándula mamaria, montando una respuesta de tipo celular. La respuesta Th1 sería la más importante en la defensa local contra la mastitis por *E. coli*, ya que induce la movilización de las células polimorfonucleares hacia el tejido glandular infectado, la que estaría aumentada en las vacas vacunadas (Dosogne, 2002).

El principal efecto biológico de las bacterinas se sustenta en la capacidad de promover la producción de anticuerpos contra los antígenos centrales que comparten las bacterias Gram negativas (Hogan y Smith, 2003). Las responsables de mediar esta respuesta, son las células Th2, a partir de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos, conocida como respuesta humoral. La protección mediada por los linfocitos B, consiste en el aumento de los títulos de Inmunoglobulina anti *E. coli* presentes en suero y leche (Tomita *et al.*, 2000). Existen cuatro clases de inmunoglobulinas involucradas en la respuesta local de la glándula mamaria, sin embargo la IgG2 es el anticuerpo predominante en el apoyo a los macrófagos y células polimorfonucleares en la fagocitosis de las bacterias patógenas, la que aumenta de forma importante producto de la vacunación (Aitken *et al.*, 2011).

2.3.1 Eficacia de la vacunación sobre la salud mamaria

Las vacunas son consideradas exitosas al proveer protección contra la mastitis, presentando sus mejores resultados en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se encuentran disponibles diversas publicaciones sobre la eficacia de las vacunas, siendo la vacuna J5 la que presenta mayor estudio al respecto.

Investigaciones señalan que vacas vacunadas con J5 presentan una menor incidencia de mastitis clínica, comparado con vacas control, no vacunadas, esta situación fue más evidente cuando se asoció a bacterias coliformes (González *et al.*, 1989; González *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha descrito que vacas tratadas con J5 presentaron una mayor protección sobre la incidencia de mastitis clínica causadas por Gram negativas, en la medida que aumentaba el número de lactancia, resultados no observados en el grupo control, no vacunado, mostrando una diferencia significativa entre ambos grupos (Smith *et al.*, 1985a; Hogan *et al.*, 1992b). Por su parte Hogan *et al.* (1992a) no observaron diferencias significativas en la incidencia de mastitis clínica durante la lactancia entre las vacas tratadas con la vacuna J5 y las vacas no vacunadas, resultados similares a los observado en otros estudios (Wilson *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2005).

Hallazgos en un desafío experimental intramamario con la cepa *E. coli*, mostró una tendencia a una reducción de la severidad de los signos clínicos de mastitis en el grupo tratado con J5, comparado con el grupo control, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Hogan *et al.*, 1993; Tomita *et al.*, 2000). En forma similar vacas tratadas con J5 presentaron una menor severidad en los casos naturales de mastitis clínica, que vacas control, no vacunadas, pero la diferencia entre ambos grupos en estudio no fue significativa (Wilson *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009). Además, la vacunación ha demostrado una disminución de la duración de los signos clínicos de mastitis (Hogan *et al.*, 1995; Hogan *et al.*, 2005). Sin embargo Smith *et al.* (1999) mostraron que vacas tratadas con la bacterina *E. coli* J5, tuvieron un aumento en la duración promedio de los casos clínicos de mastitis comparado al grupo control, no vacunado.

Con respecto al efecto de la vacunación sobre la producción de leche, no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo de vacas tratadas y el grupo de vacas control, en las

mediciones de producción de leche posteriores a los casos de mastitis clínica (Smith *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios han demostrado una mayor protección cuando los casos clínicos de mastitis eran causados por bacterias coliformes, siendo más evidente para *E. coli* (Wilson *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009). Los estudios también señalan, que la vacunación con la bacterina J5, por medio de ensayos experimentales de desafíos intramamarios con cepas de *E. coli*, no mostraron diferencias entre el grupo tratado con la vacuna J5 y el grupo control, placebo, en la respuesta de los recuentos de células somáticas en los cuartos afectados con mastitis clínica, (Hogan *et al.*, 1995; Hogan *et al.*, 1992a; Smith *et al.*, 1999; Tomita *et al.*, 2000; Hogan *et al.*, 2005).

El efecto de la vacunación sobre la eliminación de las vacas que han sufrido mastitis clínica, ha sido evaluado previamente. Se ha observado una asociación directa entre el uso de la vacunación con la supervivencia, así las vacas tratadas con J5 presentaron menos probabilidad de ser sacrificadas o eliminadas debido a la mastitis clínica, y este riesgo fue particularmente menor durante la lactancia temprana (Wilson *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009).

Al comparar los agentes bacterianos aislados de los casos clínicos de mastitis, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de vacas tratadas con J5 y grupo control, no vacunado (Hogan *et al.*, 1992b; Wilson *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha reportado que la proporción de cuartos mamarios infectados por bacterias Gram negativas y que se convirtieron posteriormente en un caso clínico de mastitis, fue significativamente menor en el grupo de vacas tratadas con J5 que en el grupo de vacas control (Hogan *et al.*, 1992b). Además, en este estudio los aislamientos bacterianos mostraron que el porcentaje de la bacteria *E. coli* aislada de los casos clínicos de mastitis en el grupo tratado y en el grupo control fue de 50 y 33 %, respectivamente.

2.3.2. Principales factores que afectan la eficacia de la vacuna

La eficacia de la vacunación puede ser afectada por distintos factores. Autores mencionan la depresión inmunológica ocurrida durante el periodo de transición, como un factor importante en la respuesta a la vacunación. Lo anterior, afecta negativamente la respuesta Th1 celular, que es la que permite la pronta llegada de neutrófilos al lugar de infección, función

desplazada hacia la respuesta Th2 humoral (Quesnell *et al.*, 2012), que es la que predomina en dicho periodo, impactando la efectividad de la vacunación.

El uso de distintos adyuvantes en las vacunas evaluadas, podrían perjudicar el efecto protector contra la mastitis causada por bacterias coliformes. Estudios han encontrado mejores respuestas inmunológicas en aquellas vacas a las que se les ha aplicado la bacterina *E. coli* J5 con un preparado de adyuvante soluble en agua, comparado con aquellas vacas tratadas con un adyuvante en base a una emulsión de aceite en agua (Hogan *et al.*, 2005).

Por otro lado, la vía de administración tendría cierto efecto sobre la respuesta inmune a la vacunación. Así, el uso de dosis sucesivas de la bacterina *E. coli* J5 aplicadas en distintos lugares anatómicos mostraron mejorar los títulos de anticuerpo en vacas lecheras (Erskine *et al.*, 2010). Resultados similares fueron observados al aplicar la vacuna J5 en el ganglio linfático supramamario (Tomita *et al.*, 1998). Adicionalmente, la administración intramamaria de la vacuna entre dos dosis subcutánea, han mejorado la respuesta inmune a la vacunación (Hogan *et al.*, 1997). También se ha descrito, que el momento de la inmunización podría afectar el nivel de eficacia que se desea alcanzar, pudiendo variar la respuesta si la vacuna es aplicada antes o después del parto (González *et al.*, 1989). Se ha descrito que la administración de dosis de refuerzo de la vacuna puede proporcionar inmunidad adicional en la protección contra la mastitis clínica por coliformes, mejorando la respuesta inmunológica de las vacas vacunadas (Wilson y González, 2003; Erskine *et al.*, 2007; Erskine *et al.*, 2010).

2.3.3. Vacuna subunitaria contra la mastitis

A pesar de los esfuerzos por implementar estrategias que permitan prevenir y controlar la mastitis por coliformes, y que han logrado ser beneficiosas en el manejo de esta enfermedad, la mastitis sigue siendo un desafío constante en los sistemas productivos de leche. Lo anterior, ha impulsado la búsqueda de vacunas más eficaces en la protección de la salud mamaria, y que permitan desarrollar una respuesta inmune más potente y duradera.

Las vacunas de uso actual contra la mastitis son de tipo muertas o inactivadas, cuya formulación las hacen menos efectivas, debido a que el proceso de inactivación involucra normalmente el uso de agentes físicos o químicos, que dañan a los antígenos proteicos, lo

que afecta la presentación de antígenos bacterianos y consecuentemente la respuesta inmunológica. La inmunidad desarrollada por estas vacunas, es menos efectiva y débil inmunogénicamente, debido a una rápida disminución de los títulos de inmunoglobulinas, que afectan negativamente la respuesta inmune de las vacas. Además, estas vacunas suelen utilizar ciertos factores de virulencia bacterianos, restringiendo la dirección de respuesta inmune, dejando un amplio margen de antígenos con posibilidad de provocar la enfermedad. Por lo tanto, la selección de los antígenos bacterianos incluidos en la vacuna se considera un paso clave (Sáenz y Lapierre, 2014).

Recientemente, se ha desarrollado una vacuna subunitaria altamente inmunogénica, no disponible comercialmente, formulada a base de nanovesículas de fragmentos bacterianos de pared y membrana celular y liposomas pequeños, además proteínas de membrana, lipopolisacáridos, peptidoglicanos, exopolisacáridos, ADN, entre otros componentes intracelulares de *E. coli* (Sáenz y Lapierre, 2014), que permiten fortalecer la respuesta inmune inducida por la vacunación. Su formulación permite generar antígenos intactos, ya que no son sometidos a agentes desnaturantes, por lo cual mejoraría la efectividad y duración de la respuesta inmune. Esta respuesta inmunológica estaría mediada por inmunoglobulinas altamente específicas, que limitan la invasión y proliferación bacteriana, causantes de la reacción inflamatoria del tejido mamario (Sáenz y Lapierre, 2014).

A partir de los resultados sobre la efectividad de las vacunas comerciales contra la mastitis y del efecto negativo de esta enfermedad sobre la rentabilidad de la empresa, la calidad de la leche y el bienestar animal, es que en esta memoria se propone realizar un estudio comparativo sobre esta vacuna subunitaria, altamente inmunogénica contra la mastitis, de la cual no existen estudios actuales sobre su implementación y resultados. Se esperaría que esta vacuna presente mejores resultados en términos de efectividad, debido a su formulación que la hace más inmunoestimulante.

3. HIPÓTESIS

La vacuna subunitaria contra *E. coli* es más eficaz que la vacuna tradicional J5 en relación a la prevención de mastitis clínica, producción de leche, recuento de células somáticas (RCS) y proporción del patógeno *E. coli* aislado en vacas lecheras.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Comparar la eficacia de una vacuna subunitaria contra mastitis causada por *E. coli* con la de la vacuna comercial J5 en vacas lecheras confinadas de la zona central, a través del estado de la salud mamaria, producción de leche e índices de calidad de la misma.

4.2. Objetivos específicos

Evaluar la incidencia, duración y severidad de los casos de mastitis clínica en vacas vacunadas con vacuna comercial J5 y vacuna subunitaria.

Comparar la producción de leche y el recuento de células somáticas en vacas vacunadas con vacuna comercial J5 y vacuna subunitaria.

Determinar el agente causal de mastitis en vacas vacunadas con vacuna comercial J5 y vacuna subunitaria.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Descripción del sistema productivo

El estudio se llevó a cabo en un plantel lechero ubicado en la comuna de Casablanca, Región de Valparaíso. La lechería cuenta con aproximadamente 1100 vacas en ordeña y un promedio de producción de 41 litros/vaca/día. Las vacas en lactancia están confinadas en galpones con cama de aserrín y en la mitad de lactancia se mueven a galpones con cubículos individuales con cama de arena o compost, mientras que las vacas secas se alojan en corrales de tierra sin techo.

El rebaño cuenta con un sistema computacional de registro y análisis de datos, permitiendo manejar información sobre la producción de leche, fertilidad, sanidad, entre otros, (Afifarm v3.05CI y DairyCOMP 305). Las vacas reciben raciones alimenticias de acuerdo a la etapa productiva, formuladas en base a los requerimientos del National Research Council (NRC, 2001), así existiendo dietas para vaca seca, pre-parto, post parto y de alta producción. Estas, están elaboradas a base de insumos como ensilaje de maíz, heno de alfalfa, alimentos concentrados y aditivos y se entregan varias veces al día con un carro mezclador.

La ordeña se realizaba en dos salas tipo espina de pescado, una con 24 unidades de ordeña y otra con 12 unidades de ordeña. Las vacas eran ordeñadas tres veces al día, con el siguiente protocolo: lavado de la ubre, *predipping*, despunte, secado de pezones, colocación de la unidad de ordeña, retirado automático y *dipping*. Además, las vacas al dar término a su lactancia se aplica la terapia de secado. En el ámbito sanitario, la incidencia de mastitis clínica era de aproximadamente de un 6,7% mensual. Además, presentaba un promedio mensual de recuento de células somáticas en leche de alrededor de 250.000 cel/ml.

5.2. Modelo experimental

Se utilizaron 443 vacas, asignadas a dos grupos experimentales; el primer grupo de vacas recibió la vacuna subunitaria, llamado grupo tratamiento; mientras que el segundo grupo fue vacunado con la vacuna habitual Enviracor J5 (Enviracor®; Zoetis Inc), llamado grupo control. Las vacas se incluyeron en cada grupo alternadamente cada semana al momento del secado (en vacas de uno o más partos) o al ingreso al grupo de preparto (en vacas de primer parto), hasta completar el número de animales a estudiar.

El grupo tratamiento recibió en cada inmunización una dosis de la vacuna subunitaria con 2 mL de la solución vía subcutánea en la zona escapular. En tanto, el grupo control recibió en cada inmunización la dosis correspondiente de la vacuna J5, que corresponden a 5 mL por vía subcutánea en la zona escapular. El protocolo de inmunización fue similar para ambos grupos y estuvo comprendido por tres dosis: la primera se administró al momento del secado (aproximadamente 60 días antes del parto); la segunda dosis cercano a los 21 a 27 días antes de la fecha probable de parto y la tercera dosis, se administró aproximadamente a los siete días después del parto. En ambos grupos, las hembras que van a su primer parto no reciben la primera dosis de la vacuna.

5.3. Obtención de la información

Se recolectó información de los eventos ocurridos hasta los 180 días de lactancia para cada vaca. Se evaluó la incidencia, severidad y duración de los casos de mastitis clínica, su agente causal, producción de leche, recuento de células somáticas, eliminaciones y muerte. Para esto, se utilizó la información obtenida a partir del uso de registros productivos y de sanidad mamaria desde los programas Afifarm v3.05CI (Afimilk; Afifarm, Israel) y DairyCOMP 305 (Valley Agricultural Software; Tulare, CA, USA). Para el recuento de células somáticas, los datos se obtuvieron de forma individual y mensual, a partir de informes del análisis de leche realizado por Cooprinsem.

5.4. Clasificación y diagnóstico de mastitis clínica

Una vez detectada la mastitis clínica durante la ordeña, a partir de la inspección de la leche en el vaso de fondo oscuro, para la detección de leche anormal, los animales fueron separados del grupo y se les realizó un examen clínico que permitió identificar el(los) cuarto(s) afectado(s), el grado de severidad y determinar el tratamiento adecuado de acuerdo a un protocolo para el diagnóstico y tratamiento de la mastitis. La clasificación de la severidad de los casos de mastitis clínica se basó en los métodos recomendados por la International Dairy Federation (IDF, 1999), en mastitis clínica leve, moderada y severa. La mastitis clínica leve sólo presenta un aspecto anormal de la leche, con cambios de color o consistencia. La mastitis clínica moderada, se caracteriza por presentar alteraciones visibles de la leche y con signos locales de inflamación, como hinchazón, sensibilidad al tacto, calor localizado y

endurecimiento. La mastitis clínica severa, manifiesta anomalías en la leche y ubre, además signos sistémicos de la enfermedad como fiebre, depresión, anorexia y muerte.

En el momento del diagnóstico de mastitis clínica se tomó una muestra de leche del cuarto afectado para evaluar el agente patógeno causante de la infección a partir de un cultivo bacteriológico. Las muestras se recolectaron según el protocolo recomendado por el National Mastitis Council (NMC, 2004). Al momento del muestreo, se eliminaron los primeros chorros de leche y se sumergió cada pezón en una solución desinfectante de predipping, dejando actuar el producto por al menos 30 segundos y se secó el pezón con una toalla desechable. Luego se desinfectó la punta del pezón y el orificio de entrada del canal del pezón con una solución de alcohol al 70% con un algodón para cada pezón. La muestra de leche fue recolectada en tubos estériles tipo Falcon con un total de 30 mL por cuarto, cada tubo fue identificado con el número de la vaca, fecha y cuarto muestreado.

El procesamiento de las muestras para el aislamiento e identificación del agente causal consistió en la siembra de la muestra en medio de cultivos agar McConkey, agar salt manitol y agar sangre a 37°C. A las cepas que crecieron en agar McConkey se les realizó tinción Gram y una batería bioquímica para enterobacterias, para poder identificar el género y especie bacteriana. Los microorganismos que crecieron en agar sangre se les realizó tinción Gram y las que resultaron ser cocáceas Gram positivas se utilizó la prueba bioquímica de la catalasa para distinguir bacterias del género *Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp. Las bacterias que fueron identificadas como catalasa positivo y crecieron en agar salt manitol se les aplicó la prueba de coagulasa para diferenciar entre *Staphylococcus* coagulasa positivo y negativo. Las bacterias coagulasa positivo fueron identificadas como *Staphylococcus aureus* a través de la detección del gen *nuc* mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Laboratorio de Vacunas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

5.5. Análisis de la información

La información se analizó usando el programa estadístico IBM SPSS Statistics v.22. Como indicadores de salud mamaria se emplearon variables como incidencia de casos clínicos de mastitis, severidad y duración de los casos, además del recuento de células somáticas, agente causal de las mastitis y el número de animales muertos o eliminados por mastitis.

1. Para comparar la incidencia de mastitis clínica en cada grupo, se realizó una prueba de comparación de proporciones (χ^2).
2. Para la evaluación de la severidad de los casos de mastitis clínica en cada grupo, los casos se categorizaron en leves, moderados y severos. El análisis de esta variable discreta se hizo a través de la prueba de Kruskal-Wallis.
3. La duración de los casos de mastitis clínica se estudió a través de análisis de varianza, para lo cual se consideró los efectos del tratamiento, número de lactancia y de la interacción entre tratamiento y número de lactancia. Lo anterior se expresa en el siguiente modelo:

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

Donde:

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

T_i = El efecto del i-ésimo tratamiento

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

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

e_{ij} = Error

4. Para la evaluación de la producción de leche, se incluyeron las producciones acumuladas a los 100 días de lactancia, las cuales se estudiaron a través de un análisis de varianza, incluyendo como efectos; el tratamiento, el número de lactancia, y la interacción entre estos predictores.

5. Para el análisis de los recuentos de células somáticas en leche (RCS) mensuales, éstos fueron previamente convertidos a puntajes lineales (PCS), basándose en la siguiente fórmula (Dabdoub y Shook, 1984):

$$PCS = \text{Log}_2 (RCS/100) + 3$$

Los PCS se analizaron a través de un análisis de varianza para medidas repetidas. Se consideraron los efectos de tratamiento, número de lactancia, el número de control y la interacción entre tratamiento y número de lactancia. Lo anterior expresado en el siguiente modelo:

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

Donde:

Y_{ijk} = Puntaje lineal de células somáticas

T_i = El efecto del i-ésimo tratamiento

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

L_k = El efecto del k-ésimo número de lactancia

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

e_{ijk} = Error

6. Para la evaluación del efecto del tipo de vacuna utilizada sobre el agente causal de los cuadros de mastitis clínica, a partir de los resultados de los cultivos bacteriológicos, éstos se clasificaron en patógenos ambientales y patógenos contagiosos. El análisis de esta variable discreta se realizó a través de la prueba de comparación de proporciones (χ^2).
7. La cantidad de animales muertos o eliminados hasta el día 180 de lactancia debido a mastitis clínica, en ambos grupos experimentales, se comparó a partir de una prueba de comparación de proporciones (χ^2).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Incidencia de mastitis clínica

Para los 443 animales en estudio, hasta los 180 días en lactancia, se observó un total de 146 casos de mastitis clínica, para las vacas del grupo tratamiento (n =230) y el grupo control (n =213). El grupo tratado presentó un total de 82 casos de mastitis clínica, lo que representa una incidencia del 35,7%; por su parte en el grupo control se registraron 64 casos de mastitis clínica, lo que corresponde a una incidencia del 30,0%. El análisis de la incidencia de mastitis no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado y grupo control (p = 0,23).

6.1.1. Incidencia de mastitis clínica según grupo y número de lactancia

Al analizar la incidencia de mastitis clínica según el número de lactancia, se observa que la cantidad de casos clínicos se incrementó a medida que aumentó el número de lactancia (Tabla 1); así las vacas de primer parto fueron las que presentaron la menor incidencia de casos clínicos de mastitis, aumentando en vacas de segunda lactancia y especialmente en vacas de tres o más partos, situación ocurrida en ambos grupos en estudio. El análisis de la interacción del número de lactancia con la vacuna utilizada, no presentó diferencias estadísticas, entre el grupo tratado y control, para ninguna categoría de número de lactancia.

Tabla 1: Incidencia de mastitis clínica (%), hasta los 180 días post parto, según número de lactancia, correspondientes al grupo tratamiento y al grupo control.

Lactancia	Tratamiento		Control		p
	n	Incidencia	n	Incidencia	
1	107	17,8%	113	18,6%	0,76
2	47	38,3%	47	31,9%	0,52
≥3	76	59,2%	53	52,8%	0,47

Los resultados muestran que el grupo tratado con la vacuna subunitaria no redujo la proporción de vacas que presentaron mastitis clínica, cuando se comparó con el grupo control J5. El grupo de vacas tratadas tuvo una incidencia de mastitis clínica similar a la del grupo control, por lo que podría afirmarse que ambas vacunas presentaron la misma efectividad.

Además, se aprecia que el efecto de ambas vacunas sobre la incidencia de mastitis clínica fue baja al observar la totalidad de casos de mastitis clínica durante el transcurso del estudio, lo que supera a la incidencia esperada para sistemas productivos de confinamiento permanente, como en el realizado en el presente estudio (Constable *et al.*, 2017). Estos resultados podrían estar explicados a la intensa exposición a agentes causantes de mastitis clínica, asociado a condiciones de manejo y factores climáticos, que pueden incrementar el riesgo de contagio de infecciones bacterianas (Hogan *et al.*, 2003). Por otra parte, las vacunas en general protegen poco contra la mastitis clínica, aceptándose que las vacunas no tendrían un efecto significativo en su incidencia (Wilson *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2005).

El efecto de la vacuna subunitaria sobre incidencia de mastitis clínica fue similar al de la vacuna Enviracor J5. La incidencia de mastitis clínica mostró un aumento numérico con la edad de las vacas, situación observada en ambos grupos experimentales. Al considerar las incidencias de cada categoría de número de lactancia, estas no fueron diferentes entre el grupo tratado y control. Las vacas particularmente afectadas, fueron las vacas de tres lactancias o más, donde además la incidencia observada en ambos grupos fue similar. Estos hallazgos concuerdan con lo enunciado por otros autores, los que describen que el riesgo de presentar mastitis clínica se incrementa a medida que lo hace el número de la lactancia (Constable *et al.*, 2017). Este efecto estaría asociado al mayor tiempo en que el orificio del pezón se encuentra abierto, aumentando el riesgo de exposición a bacterias patógenas del ambiente. Adicionalmente, en vacas de mayor edad el sistema inmune es menos eficiente, comparado con lo que ocurre en vacas más jóvenes, lo que aumentaría la presentación de mastitis clínica. Estos resultados podrían estar relacionados al importante desafío bacteriano al que están expuestas las vacas, que muchas veces supera la capacidad del animal de combatir la infección intramamaria. El periodo de transición, involucra cambios a nivel hormonal (Burvenich *et al.*, 2007), estrés debido al parto (Weber *et al.*, 2001), un incremento de las necesidades metabólicas (Kimura *et al.*, 1999), que afecta la capacidad inmunológica de la vaca y que pueden contribuir a un aumento en la incidencia de mastitis en el periparto y en la lactancia temprano, pudiendo desencadenar la enfermedad (Constable *et al.*, 2017).

El efecto de la vacunación sobre la incidencia de mastitis clínica ha sido estudiado previamente. A partir de un ensayo, utilizando el protocolo tradicional de vacunación, se determinó que las vacas no vacunadas presentaron un riesgo cinco veces mayor de presentar mastitis clínica por coliformes en los primeros 100 días post parto, comparadas con el grupo de vacas vacunadas con J5 (González *et al.*, 1989). Por su parte, Wilson *et al.* (2007) no observaron diferencias significativas en la incidencia de mastitis clínica durante la lactancia entre las vacas tratadas con la vacuna J5 y las vacas no tratadas ($p = 0,15$). Por el contrario, al evaluar la totalidad de casos de mastitis clínicas independiente del agente causal, no encontraron diferencias entre el grupo tratado y control, pero se observó que el grupo control presentó una tasa de mastitis clínica causada por bacterias Gram negativas cuatro veces mayor ($p < 0,05$) comparadas con el grupo de vacas tratadas con la vacuna J5 durante los primeros 90 días de lactancia (Hogan *et al.*, 1992b). Por su parte, la aplicación del protocolo tradicional de vacunación, las vacas tratadas y controles no vacunados presentaron un porcentaje de mastitis clínica por coliformes de 12,8% y 45%, respectivamente (González *et al.*, 1996). En otro estudio, en el que se evaluaron dos vacunas comerciales, a través de la inoculación intramamaria con la cepa *E. coli* 727, no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de mastitis clínica, entre las vacas del grupo tratado y el grupo de vacas control (Hogan *et al.*, 2005).

Al evaluar el efecto de la vacunación sobre la incidencia de mastitis clínica asociadas a bacterias Gram negativas, se determinó que el efecto fue significativo sólo en vacas de tres o más partos, durante la lactancia temprana (Hogan *et al.* 1992b). Resultados similares fueron observados por Smith *et al.* (1985a) en ensayos realizados con la vacuna J5, encontrando mayor protección en las vacas de mayor número de lactancia, representando el segmento de vacas con más alto riesgo de mastitis clínica asociadas a bacterias Gram negativas durante la lactancia temprana.

6.2. Severidad de los casos de mastitis clínica

Al comparar la distribución de la severidad de los casos clínicos de mastitis, se observó que en ambos grupos los casos leves fueron los que se presentaron en menor proporción. A pesar de presentar una diferencia numérica en la cantidad de casos leves entre el grupo tratado y el grupo control, esta no fue distinta estadísticamente. Los casos clínicos para ambos grupos

fueron principalmente moderados y severos, para ambas categorías los casos clínicos fueron similares en ambos grupos, no observando diferencia estadística. Destacando que los casos moderados se presentaron de forma similar en ambos grupos (Tabla 2). Además, se aprecia una tendencia a que en el grupo tratado las mastitis clínicas sean más severas comparado con el grupo control J5.

El análisis de la severidad no presentó diferencias estadísticamente significativa entre el grupo tratado y el grupo control ($p = 0,06$). Adicionalmente, a pesar de la diferencia numérica observada en las mastitis clínicas leves y severas, estas no fueron significativas entre los grupos experimentales.

Tabla 2: Proporción de los casos de mastitis clínica según su grado de severidad, para el grupo tratamiento ($n = 82$) y para el grupo control ($n = 64$).

Severidad*	Tratamiento	Control	P
1	9,8%	20,3%	0,10
2	45,1%	46,9%	0,87
3	45,1%	32,8%	0,17

*Severidad: 1 mastitis leve, 2 mastitis moderada, 3 mastitis severa.

6.2.1. Severidad según grupo y número de lactancia

El análisis de la interacción de la vacuna usada con el número de lactancia, no mostró diferencias significativas en la severidad de los casos clínicos de mastitis, entre el grupo tratado y control ($p = 0,34$). Al evaluar la severidad de acuerdo al número de lactancia, se observó que para las vacas de primer parto, tanto en el grupo tratamiento y control, las mastitis clínicas fueron principalmente moderadas, no observándose diferencia significativa ($p = 0,39$). En vacas de segundo parto, las mastitis clínicas para ambos grupos en estudio fueron mayoritariamente moderadas, sin presentarse diferencia significativa ($p = 0,38$); mientras que en las vacas de tres o más lactancias, la severidad de las mastitis clínicas para las vacas tratadas y controles, fueron mayormente severas y moderadas respectivamente. A pesar de que el grupo tratamiento presentó mayor severidad en sus mastitis clínicas, estas no fueron significativamente diferentes entre los grupos en estudio ($p = 0,18$) (Tabla 3).

Tabla 3: Mediana de severidad de los casos de mastitis clínica según número de lactancia.

Lactancia	Tratamiento	Control	p
1	2	2	0,39
2	2	2	0,38
≥ 3	3	2	0,18

Al comparar la severidad de los casos clínicos de mastitis en el presente estudio, se apreció similar efecto en ambas vacunas. Asimismo, en comparación al grupo control, el grupo tratado presentó una tendencia a mastitis clínicas más severas, lo que podría explicar la proximidad a la significancia estadística, sin embargo el análisis no mostró una diferencia significativa. En términos generales las vacunas utilizadas presentaron la misma protección sobre la severidad de los casos de mastitis clínica.

Durante el estudio, se observó una distribución del grado de severidad distinto a lo descrito en la literatura. Por una parte, se espera que las mastitis leves representen el 50% de todos los casos de mastitis clínica, situación no alcanzada para ambos grupos en estudio (Hogan *et al.*, 1989; Oliveira y Ruegg, 2014). Cabe destacar que, a pesar de que en el grupo tratado se presentó un menor porcentaje de mastitis leves que en el grupo control, esta diferencia no fue significativa (Hogan *et al.*, 1989; Oliveira y Ruegg, 2014). Por otra parte, se observó que las mastitis moderadas superaron el 40% del total de los casos, lo que supera lo esperado para este grado de severidad, situación hallada en ambos grupos (Hogan *et al.*, 1989; Oliveira y Ruegg, 2014). Finalmente, el porcentaje de vacas con mastitis clínicas severas superó el valor descrito en estudios previos, el que debería alcanzar cerca del 10% del total de casos clínicos de mastitis (Hogan *et al.*, 1989; Oliveira y Ruegg, 2014), hecho presentado en ambos grupos. Además cabe destacar que a pesar de que el porcentaje de casos severos en el grupo tratado fue mayor al del grupo control, la diferencia entre ambos grupos no fue significativa.

Cuando se consideró la interacción de la vacuna utilizada con el número de lactancia, se observó que ambas vacunas se comportaron de forma similar en el efecto sobre la severidad. Al describir la situación particular de cada categoría de número de lactancia, las vacas de

primer y segundo parto presentaron el mismo nivel de protección en la severidad de los casos clínicos. En vacas de tres lactancias o más, el grupo tratado y el grupo control, mostraron mastitis clínicas severas y moderadas, respectivamente, manifestando la misma protección sobre la severidad de los casos, no observando diferencia significativa. Tras analizar los resultados, se puede concluir que la vacuna subunitaria no mostró un aumento en la protección de la severidad de los casos clínicos de mastitis, concluyendo que ambas vacunas presentaron el mismo efecto, lo que se suma a los resultados previamente descritos

Diversos autores han estudiado el efecto de la vacunación sobre la severidad de los casos clínicos de mastitis. Hogan *et al.* (1993) observaron que el grupo tratado con J5 presentó signos clínicos menos severos, en comparación al grupo control, no vacunado, pero estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, el grupo de vacas tratadas presentó una respuesta febril significativamente menor que en el grupo de vacas control. Por su parte Tomita *et al.* (2000) a partir de un desafío experimental, no observaron diferencias significativas en la severidad de los casos clínicos de mastitis, entre el grupo vacunado y el grupo control. En el mismo estudio, el grupo tratado presentó mayores títulos de anticuerpos que el grupo control, alcanzando una diferencia significativa, situación ocurrida hasta el día 45 post parto.

Posteriormente, vacas fueron desafiadas vía intramamaria en uno de los cuartos, con la cepa *E. coli* 727, observando en vacas inmunizadas con la vacuna J5 una menor severidad de los casos clínicos de mastitis, comparadas con el grupo control (Hogan *et al.*, 2005). Por su parte Wilson *et al.* (2007) observaron una tendencia a que el grupo de vacas tratadas con J5 tuvieran casos clínicos de mastitis más leves (56%), en comparación a los casos clínicos del grupo control (47%), sin embargo esta diferencia no fue significativa ($p = 0,25$). Además, a pesar que vacas del grupo tratado, mostraron una menor severidad de los casos clínicos de mastitis, cuando estos fueron asociados a bacterias coliformes, en comparación al grupo control, esta diferencia no fue significativa. En otro estudio, se observó que la severidad de los cuadros clínicos de mastitis, no se asoció significativamente con la vacunación con J5, en el que no se redujo la gravedad de los casos clínicos de mastitis (Wilson *et al.*, 2009).

6.3. Duración de los casos de mastitis clínica

Con respecto a la duración de los casos de mastitis clínica ($n = 146$), en el grupo tratamiento ($n = 82$) el cuadro clínico tuvo una duración de $6,4 \pm 0,4$ días, mientras que en el grupo control ($n = 64$) alcanzó una duración de $6,6 \pm 0,5$ días, no mostrándose diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo tratamiento y control ($p = 0,47$).

6.3.1. Duración de los casos de mastitis clínica según grupo y número de lactancia

En el análisis de la duración de los casos clínicos de mastitis para ambos grupos experimentales, según número de lactancia, resultó que vacas de primera lactancia la duración fue similar. En vacas de segunda lactancia, se observó una diferencia numérica en la duración de los casos clínicos de mastitis, entre el grupo tratado y control, sin embargo esta diferencia no fue significativa. Las vacas de tres o más lactancias, la duración de los casos fue similar en ambos grupos (Tabla 4). La interacción del número de lactancia con la vacuna utilizada en ambos grupos, no presentó diferencias significativa, entre los grupos tratado y control, en la duración de los casos clínicos de mastitis ($p = 0,29$).

Tabla 4: Duración de los casos de mastitis clínica según grupo tratamiento y grupo control asociado al número de lactancia. Duración (días) con superíndice diferente son estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Lactancia	Tratamiento	Control
1	$6,0 \pm 0,8^a$	$5,6 \pm 0,8^a$
2	$6,0 \pm 0,9^a$	$8,0 \pm 0,9^a$
≥ 3	$6,8 \pm 0,5^a$	$6,6 \pm 0,7^a$

En el presente ensayo, la duración de los casos clínicos de mastitis de vacas tratadas, no difirió a la duración en el grupo control, observándose que la administración de la vacuna subunitaria no disminuyó significativamente la duración de los casos. Similares resultados fueron presentados al analizar la duración de los casos clínicos según número de lactancia. Así en términos generales, se puede mencionar que no se presentó una diferencia en la protección sobre la duración de los casos de mastitis clínica en los tipos de vacunas utilizados.

En estudios previos en los que se ha inmunizado con la vacuna J5, se ha demostrado que la inmunización con dicha vacuna disminuyó la duración de los casos clínicos de mastitis de 130 horas en las vacas del grupo control a 80 horas en las vacas tratadas, alcanzando una diferencia significativa, además el 20% de las vacas control aún presentaban sinología clínica a los 7 días de la infección intramamaria, en contraste al 5,3% del grupo vacunado (Hogan *et al.*, 1995).

Distintos resultados fueron los obtenidos por Smith *et al.* (1999) a partir de la inmunización convencional e intramamaria con la bacterina *E. coli* J5, y un posterior desafío intramamario de la cepa *E. coli* 727, en los grupos de vacas tratadas tuvo una duración promedio de los casos de mastitis clínica de 66 y 74 horas, mientras que en el grupo control alcanzó las 59 horas, a pesar de observar una diferencia en la duración de los casos, esta no fue significativa ($p > 0,05$). Posteriormente, al inmunizar con *E. coli* J5, con dos adyuvantes distintos, resultó que vacas que recibieron la vacuna J5 tuvieron una duración de 56 y 47 horas, mientras que la duración de los casos para el grupo control no vacunado fue de 85 horas (Hogan *et al.*, 2005).

6.4. Producción de leche

Para el análisis de la producción de leche, se consideró la producción acumulada hasta los 100 días de lactancia. Del total de vacas incluidas en cada grupo, se consideraron 218 lactancias del grupo tratamiento y 207 lactancias del grupo control. Las producciones de leche del grupo tratado y del grupo control, no fueron diferentes estadísticamente ($p = 0,43$) (Tabla 5).

Tabla 5: Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia para el grupo tratamiento y grupo control.

Grupo	Producción de leche acumulada a los 100 días	p
Tratamiento	4273 ± 61,6 L	0,43
Control	4251 ± 63,6 L	

6.4.1. Producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia según grupo y número de lactancia

El análisis de la interacción del número de lactancia con la vacuna utilizada, no demostró diferencias estadísticamente significativas, en la producción de leche entre el grupo tratado y control ($p = 0,34$). Adicionalmente, al comparar las producciones de leche en cada categoría de número de lactancia, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos en estudio (Tabla 6). Es posible apreciar una relación directa entre el número de partos y la producción de leche, pues a mayor número de partos, mayor es la producción de leche, siendo este efecto altamente significativo para ambos grupos ($p < 0,05$).

Tabla 6: Producción de leche para grupo tratamiento y grupo control, según número de lactancia. Producciones con superíndice diferente son estadísticamente significativo ($p < 0,05$) ($p < 0,05$).

Lactancia	Tratamiento		Control	
	n	Producción de leche	n	Producción de leche
1	106	$3721 \pm 70,1^a$	113	$3777 \pm 67,9^a$
2	44	$4560 \pm 108,9^b$	46	$4473 \pm 106,5^b$
≥ 3	68	$4946 \pm 87,6^c$	48	$5156 \pm 104,2^c$

Se observa que las producciones acumuladas a los 100 días de lactancia no difirieron entre el grupo tratado y el grupo control, lo que es consistente con la información presentada sobre la incidencia de mastitis clínica. Al no existir una diferencia en los casos clínicos totales entre los grupos en estudio, sería de esperar que las producciones de leche tampoco lo sean. Asimismo, la producción de leche según número de lactancia, no difirió entre el grupo tratado y control, apreciándose que la vacuna subunitaria no presentó un efecto significativo sobre la variable estudiada. En general, es normal apreciar una relación directa entre el número de partos y la producción de leche, situación existente en el presente estudio y presentada en ambos grupos experimentales. A partir de los resultados observados, se puede concluir que el uso de la vacuna subunitaria no manifestó un aumento significativo en la producción de leche, presentando similares resultados que el grupo control J5.

El efecto de la inmunización sobre la producción de leche ha sido estudiado por varios autores. Smith *et al.*, (1999) al comparar la producción de leche entre las vacas tratadas con la bacterina *E. coli* J5 frente a un grupo de vacas control no vacunadas, tras el desafío intramamario con la cepa *E. coli* 727, reportó que no se presentaron diferencias significativas en la producción de leche 7 días después del desafío. Wilson *et al.* (2008) demostraron que la vacunación con J5, redujo las pérdidas de leche atribuidas a los episodios de mastitis clínica, en comparación al grupo control, no vacunado. Lo anterior fue particularmente notorio en casos clínicos de mastitis asociados a coliformes, ocurridos en los primeros 50 días de lactancia, sin embargo la protección inmunológica que va disminuyendo a medida que avanza la lactancia hasta desaparecer cerca de los 100 días en leche.

Por su parte, Wilson *et al.* (2009) al comparar a vacas del grupo tratado con la vacuna J5, con un grupo control, placebo no vacunado; no observaron diferencias significativas en la producción de leche durante la lactancia temprana ($p = 0,28$), pero se apreció una fuerte protección de la vacuna J5 contra la pérdida de leche después de un caso de mastitis clínica por *Escherichia coli*, alcanzando un 75% menos pérdida de leche por día que en el grupo control no vacunado ($p = 0,02$), pero a medida que avanza la lactancia el efecto de protección de la vacunación disminuye, hasta desaparecer a los 75 días en leche. Además, la mayor protección alcanzada con la vacuna J5 se asoció significativamente con un aumento en los títulos de anticuerpos IgM, IgG1 e IgG2 anti *E. coli* J5 en sueros de vacas tratadas.

6.5. Recuento de células somáticas (RCS)

Del total de animales incluidos en el estudio, se emplearon los registros de los recuentos de células somáticas de 434 vacas, lo que equivale a 2016 controles mensuales, cuyo análisis se realizó a partir de su conversión a puntajes lineales de células somáticas (PCS).

El promedio de los 1013 puntajes lineales registrados en el grupo tratamiento fue de $2,30 \pm 0,06$ (promedio \pm error estándar). Por su parte, el grupo control registró 1003 puntajes lineales con un promedio de $2,16 \pm 0,06$. La diferencia numérica observada en los recuentos celulares, entre el grupo tratado y control, fue altamente significativa ($p = 0,005$).

6.5.1. Promedios de puntajes lineales para los controles mensuales

El comportamiento de los controles mensuales de ambos grupos se muestra en la Tabla 7. Se aprecia que vacas pertenecientes al grupo tratamiento mostraron, en la mayoría de los controles, un leve aumento de los puntajes lineales respecto a los del grupo control. A pesar, de presentar una diferencia numérica en la mayoría de los controles mensuales, los puntajes lineales del grupo tratado y del grupo control no fueron distintos estadísticamente. La interacción de la vacuna utilizada con los controles mensuales, no presentó diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control ($p = 0,90$).

Tabla 7: Puntajes lineales de los controles mensuales, para ambos grupos experimentales, registrados hasta los 180 días en lactancia. Puntajes lineales con superíndices diferentes son estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Control	Tratamiento	Control
1	2,35 \pm 0,15 ^a	1,91 \pm 0,14 ^a
2	2,13 \pm 0,14 ^a	1,95 \pm 0,15 ^a
3	2,15 \pm 0,14 ^a	2,25 \pm 0,17 ^a
4	2,18 \pm 0,17 ^a	2,32 \pm 0,18 ^a
5	2,57 \pm 0,18 ^a	2,51 \pm 0,48 ^a
6	2,57 \pm 0,15 ^a	2,55 \pm 0,16 ^a

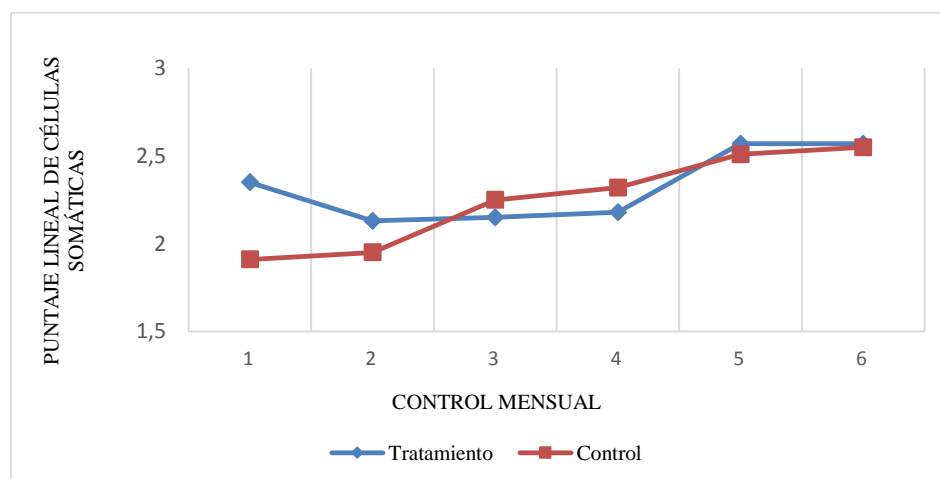


Figura 1: Puntajes lineales de los controles mensuales, para ambos grupos experimentales, registrados hasta los 180 días en lactancia.

6.5.2. Promedios de puntajes lineales según grupo y número de lactancia

La tabla 8 muestra los promedios de puntajes lineales para cada categoría de número de lactancia de los grupos en estudio. Sólo se observó diferencia significativa entre los grupos tratado y control, en las vacas de segunda lactancia, las que presentaron un aumento en los puntajes lineales de células somáticas ($p < 0,05$). En tanto, en vacas de una y de tres o más lactancias, no se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos estudiados. La interacción de la vacuna utilizada con el número de lactancia, no mostró diferencias significativas en los recuentos celulares entre los grupos en estudio ($p = 0,15$).

Tabla 8: Puntajes lineales según grupo y número de lactancia para ambos grupos experimentales, registrados hasta los 180 días de lactancia. Puntajes lineales con superíndices diferentes son estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Lactancia	Tratamiento	Control
1	$2,05 \pm 0,09$ ^{ab}	$1,99 \pm 0,09$ ^{ab}
2	$2,11 \pm 0,14$ ^{bc}	$1,66 \pm 0,19$ ^a
≥ 3	$2,85 \pm 0,11$ ^d	$2,50 \pm 0,13$ ^{cd}

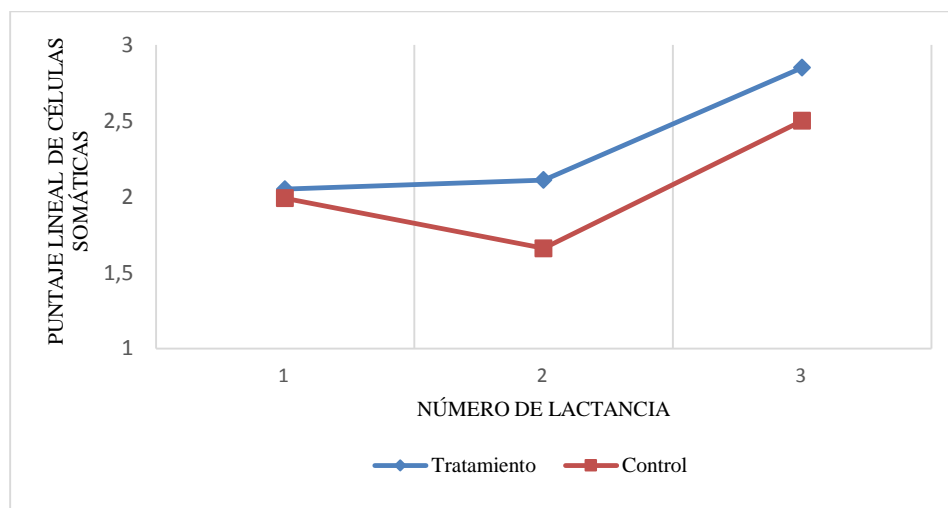


Figura 2: Promedios puntajes lineales según grupo y número de lactancia para ambos grupos experimentales, registrados hasta los 180 días post parto.

En el presente estudio no se observó que la inmunización con la vacuna subunitaria redujera los promedios de los recuentos celulares en leche. Los resultados evidencian un aumento de los puntajes lineales en el grupo tratado, por lo que no se observa un efecto mayor respecto al grupo control. Comparado con el grupo control, el grupo de vacas tratadas presentó un aumento significativo en el recuento de células somáticas en leche. Estos resultados, podrían deberse a cierto impacto del mayor porcentaje de mastitis clínicas más severas del grupo tratado comparado con las mastitis del grupo control J5, que en dichos casos clínicos, implicarían un mayor daño al epitelio glandular, lo que afectaría negativamente los niveles de células somáticas en leche.

Por su parte, al comparar los controles mensuales de los recuentos de células somáticas, no se observó que la vacuna subunitaria tuviera un efecto adicional sobre los puntajes lineales. A pesar de que en el grupo tratado se presentó en la gran mayoría de los controles un leve aumento de los puntajes lineales, la diferencia entre ambos grupos no fue significativa, mostrándose un efecto similar para ambas vacunas. En los controles mensuales, se aprecia un aumento de los puntajes lineales a medida que avanza la lactancia, situación observada en ambos grupos, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Harmon, 1994). Por lo general, el recuento de células somáticas se incrementa con el avance de la lactancia, siendo más notorio al final de la lactancia y en las primeras semanas post parto, lo que sería independiente del grado de infección intramamaria. Este aumento estaría más relacionado con los eventos inmunes que permiten preparar la glándula mamaria para una futura lactancia, que permitan fortalecer las defensas inmunológicas en el periparto.

El efecto de la vacuna utilizada sobre los puntajes lineales, de acuerdo al número de lactancia, mostró que vacas tratadas de segundo parto, presentaron un aumento significativo de los puntajes lineales, respecto a las vacas control. Esta situación es distinta a la observada en vacas de una, y de tres o más lactancias. En términos generales, la vacuna subunitaria no disminuyó significativamente los recuentos celulares, cuando fueron evaluados según número de lactancia, comparado con el grupo control J5. Además, los resultados muestran un aumento de los puntajes lineales a medida que aumenta el número de partos, situación esperable y coincidente con lo descrito en la literatura (Harmon, 1994).

En general, se reconoce que las mastitis clínicas, y principalmente aquellas causadas por bacterias coliformes, no se caracterizan por elevar el recuento de células somáticas en leche, ya que los cuadros clínicos son de corta duración y tienen poca efecto en el aumento de las células somáticas, lo que se relaciona con el nivel de adaptación del patógeno a la glándula mamaria, lo que ha sido evidenciado por estudios previos (Harmon *et al.*, 1994; Barkema *et al.*, 1998; Ruegg, 2012).

Previamente, se ha estudiado el efecto de la vacunación en el recuento de células somáticas en leche, sin embargo estos se han realizado comparando con un grupo control no vacunado. Por ejemplo, Hogan *et al.* (1995), a partir de un desafío intramamario con la cepa *E. coli* 727, no observaron diferencias entre el grupo tratado con la vacuna J5 y el grupo control, en la velocidad y magnitud de la respuesta de los recuentos de células somáticas en los cuartos afectados con mastitis clínica. Sin embargo las mediciones 7 días posteriores señalan que el grupo vacunado presentó menores recuentos de células somáticas, lo que no estaría relacionado con una menor respuesta inflamación local del grupo tratado, sino más bien a una reducción en la duración de los casos de mastitis clínica.

De forma similar, en un desafío intramamario con la cepa *E. coli* 487, Hogan *et al.* (1992a) observaron que la inmunización no influyó en los recuentos de células somáticas del cuarto afectado, entre el grupo tratado con la vacuna J5 y el grupo control, no vacunado. Más tarde, Smith *et al.* (1999) no encontraron que el uso de la vacuna J5 modificara los niveles de recuento de células somáticas de los cuartos mamarios inoculados experimentalmente, entre las vacas tratadas y el grupo de vacas control, no vacunado. Por su parte, Tomita *et al.* (2000) evaluaron los cuartos mamarios desafiados con la cepa *E. coli* 727, observando que a pesar de aumentar el recuento de células somáticas y mantenerse elevado a lo largo del estudio, estos no difirieron entre el grupo tratado con la vacuna J5 y el grupo control no vacunado. Recientemente, también a partir de la inoculación intramamaria, se determinó que el recuento de células somáticas en leche fue mayor en el grupo control no vacunado 15 horas posteriores al desafío, pero en mediciones siguientes, estos fueron similares entre el grupo de vacas tratadas con J5 y el grupo de vacas control, no vacunado (Hogan *et al.*, 2005).

6.6. Agente causal

De un total de 146 casos de mastitis clínica observados, se realizó cultivo bacteriológico a 98 casos, lo que corresponde al 67,1% del total. De los resultados obtenidos, 45 muestras resultaron con desarrollo de bacterias ambientales (45,9%), cinco muestras tuvieron desarrollo de bacterias contagiosas (5,1%) y 48 muestras resultaron negativas al desarrollo bacteriano o presentaron contaminación bacteriana (49%).

La tabla 10 muestra los resultados de los cultivos de leche con desarrollo de bacterias ambientales, donde se observa que ambos grupos presentaron similar distribución. Por otra parte, las bacterias contagiosas causantes de mastitis clínica representaron una menor proporción comparado a la totalidad de aislados bacterianos, donde los principales agentes en el grupo tratado fueron *Staphylococcus spp* y *Corynebacterium spp*, y para el grupo control J5 fue *Corynebacterium spp*.

Tabla 10: Proporción de agentes bacterianos ambientales aislados de casos de mastitis clínica, para el grupo tratamiento y para el grupo control.

Ambientales	Tratamiento (n=25)		Control (n = 20)	
	n	%	n	%
<i>Escherichia coli</i>	14	56%	9	45%
<i>Streptococcus spp</i>	4	16%	4	20%
<i>Klebsiella spp</i>	4	16%	4	20%
<i>Serratia spp</i>	2	8%	1	5%
<i>Enterococcus spp</i>	1	4%	0	0%
<i>Citrobacter spp</i>	0	0%	2	10%

Al comparar la distribución de los resultados obtenidos en los cultivos bacteriológicos, se pudo observar que el desarrollo de bacterias ambientales representó un porcentaje importante de la totalidad de los casos muestreado, tanto para el grupo tratamiento (n = 59) como para el grupo control (n = 39), destacando que para este último, su porcentaje fue mayor. Por su parte, la cantidad de casos en los cuales hubo desarrollo de bacterias contagiosas fue menor en ambos grupos. En casi la mitad de los casos de mastitis clínica no hubo desarrollo

bacteriano, tanto para el grupo tratamiento como para el grupo control. Sólo el grupo tratamiento presentó dos muestras con presencia de contaminación bacteriana (Tabla 11).

Tabla 11: Proporción de agentes bacterianos aislados de casos de mastitis clínica, para el grupo tratamiento (n = 59) y para el grupo control (n = 39).

Agente bacteriano	Tratamiento	Control
Ambientales	42,4%	51,3%
Contagiosos	6,8%	2,6%
Negativo	47,4%	46,1%
Contaminado	3,4%	0%

Al comparar los resultados de los cultivos bacteriológicos de los casos de mastitis clínicas, en los cuales hubo desarrollo de bacterias ambientales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y control ($p = 0,41$), mismo resultado se obtuvo al comparar la proporción de agentes bacterianos contagiosos entre ambos grupos en estudio ($p = 0,64$) (Tabla 12).

Tabla 12: Proporción de agentes bacterianos aislados de casos de mastitis clínica, para el grupo tratamiento (n = 29) y para el grupo control (n = 21).

Agente bacteriano	Tratamiento	Control
Ambientales	86,2%	95,2%
Contagiosos	13,8%	4,8%

La inmunización con la vacuna subunitaria no redujo la proporción de bacterias ambientales aisladas de los casos clínicos de mastitis. Vacas tratadas presentaron una menor cantidad de casos clínicos causados por bacterias ambientales que vacas control, donde a pesar de la diferencia numérica observada en los aislados ambientales, ésta no fue significativa. La vacuna subunitaria no disminuyó la cantidad de agentes patógenos ambientales causantes de los casos de mastitis clínica, mostrando ambas vacunas el mismo efecto en la variable estudiada. Además, ambos grupos presentaron una alta proporción de agentes ambientales aislados de los casos de mastitis clínica, que los descritos en la literatura y en estudios

realizados en la zona central de Chile (Hogan *et al.*, 1989; Donoso, 1997), siendo mayor en el grupo de vacas control. Esta situación es esperable en los sistemas de confinamiento permanente, donde las mastitis clínicas causadas por bacterias ambientales tienden a ser elevadas.

Adicionalmente, en ambos grupos, cerca de la mitad de los aislamientos bacteriológicos fueron negativos al crecimiento bacteriano, lo que es levemente más alto a lo revisado en la literatura (NMC, 2004). Esta baja detección de patógenos en las muestras cultivadas, podría deberse a la cantidad reducida de bacterias presentes al momento de la toma de muestra de leche, que dificultan la detección de los microorganismos, o a las necesidades de condiciones especiales de cultivo bacteriológico, diferentes a las empleadas en este estudio.

El efecto de la vacunación sobre la proporción de mastitis clínicas causadas por bacterias ambientales ha sido estudiado previamente. En un estudio en el que se evaluó la eficacia de una bacterina de *E. coli* J5, se observó que la proporción de bacterias Gram negativas fue menor en el grupo de vacas tratadas con J5, que las vacas control, no vacunadas (González *et al.*, 1989). Por el contrario Hogan *et al.* (1992b) mostraron que el porcentaje de la bacteria *E. coli* aislada de los casos clínicos de mastitis en el grupo tratado con J5 fue mayor que el presentado en el grupo control, el que alcanzó el 50 y el 33%, respectivamente, lo que corresponde a la proporción relativa del total de casos de mastitis clínica. Por su parte, Wilson *et al.* (2007; 2009) al comparar los agentes bacterianos aislados de los casos clínicos de mastitis, no encontraron diferencias significativas en la proporción de los agentes patógenos aislados entre el grupo tratado y grupo control.

6.7. Animales muertos o eliminados a causa de mastitis clínica

De las 443 vacas incluidas en el estudio, 28 fueron eliminadas por distintas causas, hasta el día 180 de lactancia. Del total, siete vacas fueron eliminadas a consecuencia de mastitis clínica, ya sea por venta o muerte de los animales afectados. Los grupos de vacas tratadas y control, presentaron cuatro y tres vacas eliminadas a causa de mastitis clínica, respectivamente, lo que corresponde a 1,7% para el grupo tratado y 1,4% para el grupo control ($p = 0,75$).

La información de todas las vacas eliminadas debido a mastitis clínica se analizó a partir de la sobrevivida (en días) con el método de Kaplan-Meier. La tabla 12 muestra los datos sobre el tiempo de sobrevivida en días y la eliminación de las vacas en el tiempo para vacas del grupo tratado y vacas del grupo control. Además, se observó la misma probabilidad de sobrevivir al menos hasta el días 180 de lactancia, para ambos grupos.

Tabla 12: Probabilidad de sobrevivencia en el rebaño para el periodo comprendido desde el inicio del estudio hasta los 180 días después del parto, para el grupo tratamiento y el grupo control.

Tiempo (días)	Tratamiento	Control
14	1	1
18	0,99	1
40	0,99	1
86	0,99	1
89	0,99	0,99
128	0,98	0,99
157	0,98	0,99
180	0,98	0,99

La inmunización con la vacuna subunitaria presentó un efecto protector sobre la eliminación de vacas a consecuencia de mastitis clínica, similar al observado en el grupo de vacas control J5, apreciando el mismo nivel de eficacia en ambas vacunas. Se puede afirmar que en el presente estudio, no se encontró una diferencia significativa entre el grupo tratado y control, en la proporción de animales eliminados por mastitis clínica. Además, se observa que ambas vacunas presentaron una menor proporción de casos clínicos que terminaron en eliminación, comparado a lo descrito en la literatura (Ruegg, 2012).

En general, se acepta que la vacunación provee cierta protección en la eliminación de los animales a causa de mastitis clínica. En un estudio (Wilson *et al.*, 2009), se observó que el grupo de animales vacunados presentaban un riesgo de eliminación por mastitis clínica significativamente menor, comparado con el grupo control ($p < 0,03$), mientras que el riesgo de morir a causa de mastitis clínica, no fue diferente entre el grupo vacunado y grupo control

($p > 0,27$). Por su parte, Wilson *et al.* (2007) demostraron que la eliminación de las vacas, asociada a mastitis clínica, fue mayor en el grupo control, no vacunado, que para las vacas tratadas con J5, alcanzando una diferencia significativa. Sin embargo, en el análisis general, el grupo control presentó un mayor porcentaje de animales eliminados a causa de mastitis clínica, en comparación al grupo control, pero esta diferencia no fue significativa.

7. IMPLICANCIAS

La mastitis, es una de las enfermedades que más impacta al sistema productivo, debido a las consecuencias negativas sobre la economía y el bienestar animal de las vacas. A pesar de los esfuerzos por reducir los niveles de esta enfermedad, sus resultados muchas veces no son los esperados, motivando constantemente a los productores de leche y a Médicos Veterinarios a buscar avances en la prevención y control de la mastitis, la que se ha convertido una tarea compleja. Progresos en el manejo de la mastitis por coliformes han sido útiles para la prevención de esta enfermedad. Sin embargo, lo complejo que resultan los mecanismos involucrados en su desarrollo, la falta de comprensión de los eventos inmunológicos y de las relaciones existentes entre la vaca, el agente infeccioso y el ambiente, hacen de la presentación de esta enfermedad un problema más difícil de manejar.

El uso de vacunas en cualquier programa de control, ha mostrado ser beneficioso en el manejo de la mastitis por coliformes. A partir de esto, es que esta memoria de título permite evaluar el uso de una nueva vacuna desarrollada recientemente en el país, contra la mastitis por coliformes, y considerar su posible futura incorporación en los programas de prevención. Este estudio permitió comparar los efectos de dos vacunas contra la mastitis en vacas lecheras, una de ellas disponible comercialmente. Los creadores de la vacuna subunitaria postulan que es más efectiva en términos de protección contra la mastitis, mientras que la vacuna comercial J5, a partir de numerosos estudios, ha mostrado consistentemente una mejoría en la protección de la salud mamaria.

La eventual incorporación de la vacuna subunitaria en los programas de prevención de mastitis por parte de los productores, está asociada con distintos factores que podrían condicionar su utilización, como la eficacia protectora de la vacuna, el costo económico, la facilidad de implementación, y su disponibilidad en el mercado. Es así, que la realización de este estudio y de futuras evaluaciones, resultan importantes al momento en que esta vacuna se encuentre disponible comercialmente.

En el presente estudio, la vacuna subunitaria proporcionó un efecto similar, respecto a la incidencia de mastitis clínica, duración de los casos clínicos, el tipo de agente causal y la proporción de animales muertos o eliminados a causa de la mastitis clínica, al compararlo

con el grupo control J5. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia.

Tampoco se observaron diferencias en la severidad de los casos clínicos de mastitis, habiendo una tendencia a una mayor severidad de los casos clínicos en el grupo tratado con la vacuna subunitaria. Adicionalmente, comparado con el grupo control, el grupo de vacas tratadas presentó un aumento significativo en el recuento de células somáticas en leche. Sólo en vacas de segunda lactancia del grupo tratado, se observa un incremento de los puntajes lineales de células somáticas en leche, al compararlo con el grupo control J5, alcanzando una diferencia significativa.

Con la evidencia presentada en este estudio, se desprende que los efectos alcanzados por la vacuna subunitaria, fueron similares a los de la vacuna comercial J5 en relación a la incidencia, duración y severidad de los casos clínicos de mastitis, la cantidad de bacterias ambientales causantes de mastitis y la proporción de animales muertos o eliminados a causa de la enfermedad. Tampoco se observó que la vacuna estudiada alcanzara un efecto superior sobre la producción acumulada a los 100 días de lactancia. Adicionalmente, el grupo tratado presentó un recuento de células somáticas en leche significativamente mayor que el grupo de vacas control. Por lo anterior, se entiende que en general no se presentaron diferencias significativas en los indicadores de salud mamaria, producción de leche e índices de calidad, derivando en una eficacia protectora similar a la obtenida con la vacuna Enviracor J5.

Dentro de las posibles razones de una respuesta de la vacuna subunitaria, similar a la de la vacuna comercial, pero menor a lo esperado debido a su formulación, por una parte estarían aquellas asociadas a las características propias de ésta, cuya formulación podría afectar el nivel de respuesta en el sistema inmune de las vacas, pero debido a la poca información disponible al respecto, es que se necesitan más estudios para su evaluación. Por otra parte, se ha estudiado que los niveles de protección alcanzados están muy relacionados con la situación sanitaria del sistema productivo, el manejo de factores ambientales, el nivel de patógenos coliformes presentes en el plantel, el estado inmune de las vacas, entre otros, lo que pueden afectar las ventajas proporcionadas por la vacunación.

Este estudio, es el primero de esta vacuna en condiciones de campo en la zona central. Sin embargo, se deberían considerar estudios adicionales con un grupo control no vacunado, a fin de establecer otra manera de evaluación y estimar la magnitud de la protección de las vacas frente a la mastitis clínica al compararlo a un grupo no vacunado, pero es muy difícil conseguir que predios lecheros se arriesguen a dejar vacas sin vacunar, por ser una enfermedad que genera elevados costos para la empresa.

Los programas de prevención de la mastitis bovina son una herramienta que ha mostrado ser beneficiosa, fácil de implementar y de bajo costo. Sin embargo, es necesario avanzar en el entendimiento de los distintos componentes de la respuesta inmune de la glándula mamaria, y de la identificación de los factores que intervienen en el desarrollo de la respuesta inmune alcanzada con la vacunación. Por todo esto, investigaciones continuas en el desarrollo de vacunas contra la mastitis es una alternativa razonable, ya que se espera podrían mejorar los avances alcanzados en la prevención de la mastitis bovina a través de la vacunación.

8. CONCLUSIONES

No se observaron diferencias significativas en la incidencia y duración de los casos clínicos de mastitis entre el grupo de vacas tratadas con la vacuna subunitaria y el grupo de vacas control J5.

La vacuna subunitaria no redujo significativamente la severidad de los casos clínicos de mastitis. Comparado al grupo control J5, las vacas tratadas mostraron tendencia a una mayor severidad de sus casos clínicos de mastitis.

No se observaron diferencias significativas en la producción de leche acumulada a los 100 días de lactancia entre las vacas vacunadas con la vacuna subunitaria y la vacuna comercial J5. En comparación a las vacas control, vacas tratadas con la vacuna subunitaria tuvieron un incremento significativo en el recuento de células somáticas en leche, situación observada en gran parte del estudio.

La aplicación de la vacuna subunitaria no demostró diferencias en la proporción de animales muertos o eliminados debido a la mastitis clínica, ni la clase de agente causal de los casos clínicos de mastitis.

La vacuna subunitaria contra *E. coli* no fue más eficaz que la vacuna tradicional J5 en lo que respecta a las variables analizadas, rechazándose la hipótesis planteada en el presente estudio.

9. BIBLIOGRAFÍA

AZÓCAR, J. 2001. Prevalencia, incidencia, y etiología de mastitis en un centro de acopio lechero, comuna de María Pinto, Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias 83 p.

AITKEN, S.; KARCHER, E.; REZAMAND, P.; GANDY, J.; VANDEHAAR, M.; CAPUCO, A.; SORDILLO, L. 2009. Evaluation of antioxidant and proinflammatory gene expression in bovine mammary tissue during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 92(2): 589-598.

AITKEN, S.; CORL, C.; SORDILLO, L. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 16(4): 291-304.

BAR, D.; TAUER, L.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.; HERTL, J.; SCHUKKEN, Y.; SCHULTE, H.; WELCOME, F.; GROHN, Y. 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 91(6): 2205-2214.

BARKEMA, H.; SCHUKKEN, Y.; LAM, T.; BEIBOER, M.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81(2): 411-419.

BRADLEY, A. 2012. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* 164(2): 116-128.

BRITTEN, A. 2012. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28(2): 187-202.

BURVENICH, C.; BANNERMAN, D.; LIPPOLIS, J.; PEELMAN, L.; NONECKE, B.; KEHRLI, J.; PAPPE, M. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. J. Dairy Sci. 90(1):39–54.

CHA, E.; BAR, D.; HERTL, J.; TAUER, L.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.; SCHUKKEN, Y.; WELCOME, F.; GRÖHN, Y. 2011. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. J. Dairy Sci. 94(9): 4476-4487.

CHA, E.; HERTL, J.; SCHUKKEN, Y.; TAUER, L.; WELCOME, F.; GRÖHN, Y. 2013. The effect of repeated episodes of bacteria-specific clinical mastitis on mortality and culling in Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 96(8): 4993-5007.

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

DABDOUB, S.; SHOOK, G. 1984. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count and clinical mastitis. J. Dairy Sci. 67 (Suppl. 1): 163-164.

DHAKAL, K.; TIEZZI, F.; CLAY, J.; MALTECCA, C. 2016. Causal relationships between clinical mastitis events, milk yields and lactation persistency in US Holsteins. Livestock Sci. 189: 8-16.

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

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. 2003. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. *Vet. Res.* 33(1): 1-12.

ELGHAFGHUF, A.; DUFOUR, S.; REYHER, K.; DOHOO, I.; STRYHN, H. 2014. Survival analysis of clinical mastitis data using a nested frailty Cox model fit as a mixed-effects Poisson model. *Prev. Vet. Med.* 117(3-4): 456-468.

ERSKINE, R.; VANDYK, E.; BARTLETT, P.; BURTON, J.; BOYLE, M. 2007. Effect of hyperimmunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin in adult lactating dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231(7): 1092-1097.

ERSKINE, R.; BROCKETT, A.; BEECHING, N.; HULL, R.; BARTLETT, P. 2010. Effect of changes in number of does and anatomic location for administration of an *Escherichia coli* bacterin on serum IgG1 and IgG2 concentrations in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 71(1): 120-124.

ERSKINE, R. 2012. Vaccination Strategies for Mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28(2): 257-270.

GONZALEZ, R.; CULLOR, J.; JASPER, D.; FARVER, R.; BUSHNELL, R.; OLIVER, M. 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can. J. Vet. Res.* 53(3): 301-305.

GONZALEZ, R.; WILSON, D.; MOHAMMED, H.; SEARS, P.; RIVAS, A.; CAMPBELL, S. 1996. A placebo-controlled trial of an Escherichia coli J5 bacterin and the ribotyping-based assessment of coliform bacteria diversity on a dairy farm. Proceedings of the 19th World Buiatrics Congress. Edinburgh: Br. Cat. Vet. Assoc. p. 277-280.

HARMON, R. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. 77(7): 2103-2112.

HOEBEN, D.; BURVENICH, C.; TREVISI, E.; BERTONI, G.; HAMANN, J.; BRUCKMAIER, R.; BLUM, J. 2000. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. J. Dairy Res. 67(4): 503-514.

HOGAN, J.; SMITH, K.; HOBLET, K.; SCHOENBERGER, P.; TODHUNTER, D.; HUESTON, W.; PRITCHARD, D.; BOWMAN, G.; HEIDER, L.; BROCKETT, B.; CONRAD, H. 1989. Field survey of mastitis in low somatic cell count herds. J. Dairy Sci. 72(6): 1547-1556.

HOGAN, J.; WEISS, W.; TODHUNTER, D.; SMITH, K.; SCHOENBERGER, P. 1992a. Efficacy of an Escherichia coli J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. J. Dairy Sci. 75(2): 415-422.

HOGAN, J.; SMITH, K.; TODHUNTER, D.; SCHOENBERGER, P. 1992b. Field trial to determine efficacy of an Escherichia coli J5 mastitis vaccine. J. Dairy Sci. 75(1): 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(2): 401-407.

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

HOGAN, J.; SMITH, K.; SCHOENBERGER, P.; ROMING, S.; THOMPSON, L. 1997. Antibody titer responses to intramammary immunization with *Escherichia coli* J5 bacterin. *J. Dairy Sci.* 80(10): 2398-2402.

HOGAN, J.; SMITH, K. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34(5): 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(2): 534-542.

HOGAN, J.; SMITH, K. 2012. Managing Environmental Mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28(2): 217-224.

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

KEHRLI, M.; SHUSTER, D. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 77(2): 619-627.

KIMURA, K.; GOLF, J.; KEHRLI, M. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(11):2385–2392

KOECK, A.; MIGLIOR, F.; KELTON D.F; SCHENKEL, F.S. 2012. Alternative somatic cell count traits to improve mastitis resistance in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 95(1): 432-439.

KREMER, W.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E.; GROMMERS, F.; SCHUKKEN, Y.; HEERINGA, R.; BRAND, A.; BURVENICH, C. 1993. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic. *J. Dairy Sci.* 76(11): 3428-3436.

MORAGA, L.; AGÜERO, H.; BEZAMA, M.; MORALES, M. 1994. Evolución de la prevalencia de mastitis bovina en lecherías de la Región Metropolitana, Chile. *Av. Cs. Vet.* 9(1): 24-28.

MILNE, M.; BIGGS, A.; FITZPATRICK, J.; INNOCENT, G.; BARRETT, D. 2003. Use of clinical information to predict the characteristics of bacteria isolated from clinical cases of bovine mastitis. *Vet. Rec.* 152(20): 615-617.

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/wp-content/uploads/2016/08/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM.pdf> [consulta: 27-07-2018]

OLIVER, S.; MURINDA, S. 2012. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28(2): 165-185.

OLIVEIRA, L.; RUEGG, P. 2014. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 97(9): 5426-5436.

QUESNELL, R.; KLAESSIG, S.; WHATTS, J.; SCHUKKEN, Y. 2012. Bovine intramammary *Escherichia coli* challenge infections in late gestation demonstrate a dominant antiinflammatory immunological response. *J. Dairy Sci.* 95(1): 117-126.

RAJALA-SCHULTZ, P.; GRÖHN, Y.; McCULLOCH, C.; GUARD, C. 1999. Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(6): 1213-1220.

REYES-JARA, A.; CORDERO, N.; AGUIRRE, J.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA, G. 2016. Antibacterial effect of copper on microorganisms isolated from bovine mastitis. *Front. Microbiol.* 28(7): 1-10.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K.; OVERTON, M. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev. Vet. Med.* 122(3): 257-264.

RUEGG, P. 2012. New perspectives in udder health management. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28(2): 149-163.

SÁENZ, L.; LAPIERRE, L. 2014. Vacuna subunitaria, polivalente altamente inmunogénica contra mastitis en mamíferos. The World Intellectual Property Organization CL 3247-2014.

SAN MARTIN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; LEON, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C. 2002. Bacterial resistance of mastitis pathogens isolated from dairy cows in the Vth Region, Metropolitan Region and Xth Region, Chile. *Arch. Med. Vet.* 34(2): 221-234.

SAN MARTIN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; ESPINOZA, S.; LEON, B.; BORIE, C. 2003. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from dairy herds in Chile. *J. Appl. Res. Vet. Med.* 1:87–95.

SCHUKKEN, Y.; HERTL, J.; BAR, D.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.; RAUCH, B.; SANTISTEBAN, C.; SCHULTE, H.; TAUER, L.; WELCOME, F.; GROHN, Y. 2009. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(7): 3091-3105.

SCHUKKEN, Y.; CHUFF, M.; MORONI, P.; GURJAR, A.; SANTISTEBAN, C.; WELCOME, F.; ZADOKS, R. 2012. The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis Klebsiella, Serratia, and More. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28(2): 239-256.

SMITH, K.; TODHUNTER, D.; SCHOENBERGER, P. 1985a. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy sci.* 68(6): 1531-1553.

SMITH, K.; TODHUNTER, D.; SCHOENBERGER, P. 1985b. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.* 68(2): 402-417.

SMITH, J.; HOGAN, J.; SMITH, K. 1999. Efficacy of Intramammary Immunization with an *Escherichia coli* J5 Bacterin. *J. Dairy Sci* 82(12): 2582-2588.

SMITH, K.; HOGAN, J. 2001. The world of mastitis. **In:** 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. Vancouver, Canada. 13-15 September 2001. National Mastitis Council; Am. Assoc. Bovine Pract. pp. 1 - 12.

SORDILLO, L. 2018. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34(3): 507-523.

TODHUNTER, D.; SMITH, K.; HOGAN, J. 1990. Growth of Gram negative bacteria in dry cow secretion. *J. Dairy Sci.* 73(2): 363-372.

TODHUNTER, D.; SMITH, K.; HOGAN, J.; SCHOENBERGER, P. 1991. Gram negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52(2): 184-188.

TOMITA, G.; NICKERSON, S.; OWENS, W.; WREN, B. 1998. Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 81(8): 2159-2164.

TOMITA, G.; RAY, C.; NICKERSON, S.; OWENS, W.; GALLO, G. 2000. A comparison of two commercially available *Escherichia coli* J5 vaccines against *E. coli* intramammary challenge. *J. Dairy Sci.* 83(10): 2276-2281.

WEBER, P.; MADSEN, S.; SMITH, G.; IRELAND, J.; BURTON, J. 2001. Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenge cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83(3-4):213-240.

WILSON, D.; GONZÁLEZ, R. 2003. Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19(1): 187-197.

WILSON, D.; GROHN, Y.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.; SCHUKKEN, Y.; 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(9): 4282-4288.

WILSON, D.; GROHN, Y.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R.; SCHUKKEN, Y.; 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.

WILSON, D.; MALLARD, B.; BURTON, J.; SCHUKKEN, Y.; GROHN, Y. 2009. Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 16(2): 209-217.

WILLIAMS, P.; LAMBERT, P.; BROWNS, M. 1988. Penetration of immunoglobulins through the *Klebsiella* capsule and their effect on cell-surface hydrophobicity. *J. Med. Microbiol.* 26(1): 29-35.

ZHAO, X.; LACASSE, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.* 86(Suppl 13): 57-65.