ITEA (1996). Vol. 92A N.º 2. 53-66

# EVALUACIÓN DE VACUNAS FRENTE A LAS MASTITIS ESTAFILOCÓCICAS DEL GANADO VACUNO LECHERO EN CONDICIONES DE EXPLOTACIÓN COMERCIAL: PROBLEMÁTICA ENCONTRADA

**B. Amorena***
**M. Pérez***
**E. Gracia*,****
**C. Rota***
**R. Baselga*,****
**I. Albizu*,****
**J. L. Alabart***
**J. M. Hernandorena*****
**M. J. Pascual*****
**J. Ocáriz*****
**J. Marco******

* CSIC-Servicio de Investigación Agraria
Gobierno de Aragón, Aptdo. 727
50007 Zaragoza

** Dirección actual:
Exopol, S.L. (autovacunas)
María de Luna 11, 50015 Zaragoza

*** Ctra. del Sadar S/N. Edificio El Sario
31006 Pamplona

**** Servicio de Investigación y Mejora Agraria
Gobierno Vasco. Derio (Vizcaya)

RESUMEN

Se ha realizado un estudio preliminar para evaluar, en condiciones naturales de explotación comercial, el efecto de una vacuna frente a mastitis estafilocócica sobre el recuento de células somáticas (RCS = número de células somáticas por mililitro de leche, indicador indirecto de infección bacteriana mamaria), y sobre la producción de leche (kg de leche/día), la cual es menor en animales mastíticos. Se utilizaron en el estudio 132 vacas de raza Frisona de Navarra pertenecientes a cuatro explotaciones, comprendiendo el estudio un total de 982 muestras de leche, recogidas durante los cinco meses anteriores y cinco meses posteriores al mes de la primera vacunación. La revacunación se realizó a los dos meses tras la primera vacunación. Se observó en el grupo vacunado respecto del grupo control un aumento del 17,8% ($P < 0.05$) en la proporción de animales con un RCS menor en el período post-vacunal (5 meses) que en el período pre-vacunal (5 meses). También se observó que dichos animales vacunados presentaban en el mencionado período post-vacunal un RCS menor (20.6% de reducción: $P < 0.05$) y una producción de leche mayor (6,1% de incremento: $P < 0,05$) respecto del grupo control, lo cual significa que el beneficio económico de la vacuna sería de

13 veces mayor que su coste. Se ha analizado también en este trabajo la problemática encontrada al realizar la evaluación de vacunas en condiciones de explotación comercial.

**Palabras clave:** Vacuna, Mastitis, *Staphylococcu*, Células somáticas, Producción leche

SUMMARY

EVALUATION OF VACCINES AGAINST STAPHYLOCOCCAL MASTITIS IN DAIRY CATTLE UNDER COMMERCIAL FARM CONDITIONS: PROBLEMS INVOLVED

A preliminary study was carried out to evaluate the effect of a staphylococcal mastitis vaccine on somatic cell count (SCC = number of somatic cells per mililiter of milk, an indirect indicator of mammary gland bacterial infection), and on milk production (kg of milk/day, known to decrease in animals with mastitis) under natural conditions in commercial farms. A total of 132 cows of the Navarra Holstein-Friesian breed were used. They belonged to four farms. A total of 982 milk samples, collected from these animals five months before and five months after the month of vaccination were involved in the study. Animals were boostered two months after the first vaccination. When compared with the control group, the vaccinated group had an increase of 17.8% ($P < 0.05$) in the proportion of animals which presented a lower RCS in the 5 months following vaccination than in the 5 months before vaccination. Also, vaccinated animals had in the 5 months following vaccination a lower RCS (20.6% reduction; $P < 0.05$) and a higher milk production (6.1% increment; $P < 0.05$) in relation to the control group, meaning that the economic benefit of the vaccine may be 13 times higher than the cost. The problems found when carrying out the study under the mentioned farm conditions were also analysed in this study.

**Key words:** Vaccine . Mastitis, *Staphylococcus*, Somatic cells, Milk production.

## Introduccion

La mastitis, especialmente la mastitis subclínica, es la causa de graves pérdidas económicas en razas vacunas lecheras (ZORRAQUINO, 1986; KLEINSCHROTH *et al.*, 1990; HUNT y ANDERSON, 1993). La enfermedad es etiológicamente compleja y está causada primordialmente por bacterias de los géneros *Streptococcus, Escherichia* y *Staphylococcus* (POUTREL, 1985; HUNT y ANDERSON, 1993). La mastitis estreptocócica ha sido generalmente controlada por antibioterapia, existiendo pocos trabajos sobre vacunación al respecto (MACKIE *et al.*, 1983; RAINARD, 1992; TYLER *et al.*, 1992). Sin embargo, la aparición de resistencias a antibióticos, en el caso de las mastitis colibacilares y de las estafilocócicas, ha llevado al desarrollo de distintas vacunas en ambos casos. Las vacunas frente a *Escherichia coli* han sido desarrolladas ampliamente, llegándose a conseguir una vacuna elaborada con una cepa rugosa ($r_e$ J5-TC), que carece de una serie de enzimas necesarios para una correcta síntesis de la pared, pero está provista de una región molecular común a distintas cepas capaz de conferir inmunidad

frente a ellas (CULLOR, 1991; HUNT y ANDERSON, 1993).

También se ha realizado un esfuerzo considerable en el campo de las vacunas frente a estafilococos. Inicialmente, las vacunas estafilocócicas se hallaban compuestas por toxina alfa o hemolisina beta, determinadas proteínas de la superficie bacteriana (proteína A) y/o bacterias inactivadas de distintas especies estafilocócicas, con resultados poco alentadores en muchos casos (BROCK *et al.*, 1975; ADLAM *et al.*, 1977; GUIDRY *et al.*, 1980; WATSON, 1984; YOSHIDA *et al.*, 1984; PANKEY *et al.*, 1985; FROST y MATTILA, 1988; GREENBERG *et al.*, 1989). Dado que algunas de estas vacunas parecían moderar la gravedad de la mastitis clínica pero no controlaban la crónica, últimamente los esfuerzos se han centrado en encontrar componentes moleculares del estafilococo relacionados con la cronicidad y que mejoren la eficacia de la vacuna (FOSTER, 1991).

A la hora de elegir nuevos componentes moleculares, conviene recordar que la fagocitosis es el mecanismo más importante de defensa inmunológica en la gándula mamaria. Dado que los estafilococos aislados de mastitis producen frecuentemente exopolisacáridos (FOSTER, 1991) que dificultan la fagocitosis de bacterias opsonizadas con anticuerpos frente a los componentes de la pared celular y parecen favorecer la colonización (BASELGA *et al.*, 1993, 1994), se utilizan en las nuevas vacunas bacterias rodeadas de exopolisacárido (YOSHIDA *et al.*, 1984; WATSON, 1988; WATSON, 1992), con resultados esperanzadores. Asimismo, se ha enriquecido el componente vacunal con exopolisacárido aislado de *Staphylococcus aureus* (el más patógeno de los estafilococos y frecuentemente asociado a la cronicidad en las mastitis bovinas). Debido a que la inmunopotencia de esta especie molecular es muy reducida, se ha incrementado su potencia inmunológica, uniéndola covalentemente a una proteína transportadora (FATTOM *et al.* 1992.; GILBERT *et al.*, 1993) o incluyéndola en liposomas (AMORENA *et al.*, 1994; patente Nº de Registro: 9200223), obteniéndose en este último caso unos resultados positivos en la infección experimental y moderadamente positivos a nivel de campo frente a mastitis estafilocócica en ganado ovino (MARCO, 1994). El correspondiente inóculo vacunal consiste, por un lado, en exopolisacáridos de *S. aureus* incluidos en liposomas; y, por otro lado, en la siguiente mezcla: un toxoide (sobrenadante formalinizado de un cultivo de S. aureus) y bacterias inactivadas adyuvantadas (de la especie *S. aureus* y una especie coagulasa-negativa).

Los efectos beneficiosos producidos por una vacuna pueden evaluarse considerando, tanto en las infecciones experimentales como en las naturales, algunos de los siguientes aspectos: 1) los de tipo inmunológico (duración de la respuesta humoral, clase y subclase de inmunoglobulina producida); 2) los que conciernen a la leche (la producción lechera y la calidad de la leche con referencia a proporción de grasa, proteína, lactosa y extracto seco); 3) los que atañen al desarrollo y salud del recién nacido (ganancia media diaria, etc.; WATSON, 1984, 1988); y 4) los que indican la tasa de nuevas infecciones o la prevalencia de la infección mastítica, la cual puede estimarse directamente mediante examen bacteriológico o indirectamente, mediante el recuento de las células somáticas (RCS) en leche, ya que los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) aumentan considerablemente en la leche de una vaca mastítica, lo cual les permite fagocitar las bacterias y paliar la infección.

Antes de realizar una evaluación definitiva en condiciones de explotación comercial

en la especie bovina con una vacuna frente a mastitis estafilocócica adecuada a dicha especie, se decidió realizar una evaluación preliminar y, a su vez, estudiar mediante el presente trabajo la problemática encontrada al realizar la evaluación en dichas condiciones. El objeto de este estudio es, por un lado, determinar si la vacuna ya ensayada en ganado ovino (AMORENA *et al.*, 1994) es inocua (carece de efecto tóxico) en ganado bovino y, por otro lado, averiguar con dicha vacuna o con una vacuna carente de toxicidad qué efectos se observarían sobre la producción y el RCS cuando se vacunan los animales de una explotación y cuáles serían las condiciones idóneas para poder evaluar el efecto de dicha vacuna en cuanto a las características de los animales a utilizar y el tratamiento estadístico de los datos. Considerando que en explotaciones de ganado bovino tales como las participantes en el control de producciones realizado por el Instituto Técnico y de Gestión de Vacuno de Navarra (ITGV) se dispone de los valores de RCS de cada animal a lo largo de las distintas lactaciones así como de los datos productivos (cantidad y calidad de la leche), para este estudio se utilizó dicha información, obtenida en ganaderías vacunas de raza Frisona de Navarra.

## Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en explotaciones de bovino de raza Frisona de Navarra. En cada una de ellas, se establecieron 2 grupos (vacunado y no vacunado). Se intentó distribuir los animales en ambos grupos de forma homogénea, según el estado microbiológico de la mama (primer criterio, estableciéndose distintos coeficientes: 0 = no infección; 1 = infección por *Staphylococcus aureus*; 2 = infección por otros estafilococos; 3 = infección por otro microorganismo), el recuento de células somáticas (RCS; segundo criterio, con coeficientes de 1 a 4, ordenados de menor a mayor RCS) y la edad del animal (animales de un parto frente a animales de dos o más partos).

En las explotaciones colaboradoras existían, en principio, suficientes animales infectados para que contagiaran a otros. En caso de ser eficaz, la vacuna debería proteger a los animales candidatos a contagio (menor número o gravedad de la infección), reducir el RCS y aumentar la producción en estos animales frente a los no vacunados. Sin embargo, éramos conscientes de las dificultades que conlleva realizar un estudio de esta naturaleza a nivel de rebaños comerciales. La gran variabilidad en niveles productivos y de RCS entre animales, la presencia de infecciones debidas a distintos géneros bacterianos, las diferencias en condiciones de manejo higiénico y de ordeño entre rebaños, así como el uso de animales en fases productivas muy distintas, podían dificultar la observación de un efecto neto de la vacuna, tanto en este estudio como en la observación que el ganadero puede realizar con los datos que le son fácilmente asequibles.

La vacunación y el recuerdo se realizaron por vía intramuscular, con un intervalo de 60 días. En primer lugar, se vacunaron dos de las explotaciones (explotaciones E y F con 82 y 74 animales, respectivamente) con los inóculos especificados en la patente mencionada (Nº de Registro: 9200223).

Considerando los resultados sobre inocuidad obtenidos (véase apartado de resultados correspondiente), se decidió para las 4 explotaciones restantes, eliminar el toxoide del inóculo vacunal. Asimismo, se sustituyó el adyuvante sulfato de dextrano de la vacu-

na original por hidróxido de aluminio, quedando los demás componentes vacunales inalterados en cuanto a su composición, calidad y cantidad por vacuna. Así, la vacuna modificada (que constaría de bacterias inactivadas + hidróxido de aluminio por un lado, y de liposomas + exopolisacárido por otro) fue aplicada a animales de otras cuatro explotaciones (A, B, C y D), las cuales suponían un total de 291 animales. Las explotaciones B y C fueron vacunadas en Junio, mientras que las explotaciones D y A lo fueron en Septiembre. Para el estudio de efectos de la vacuna referentes a producción lechera y RCS, se consideraron para cada explotación dos períodos: el pre-vacunal (que sería de 5 meses previo al mes de la primera vacunación) y el post-vacunal (que incluiría los cinco meses subsiguientes a la primera vacunación). Los resultados obtenidos en estas cuatro explotaciones fueron sometidos a análisis estadístico.

Los análisis bacteriológicos realizados antes de comenzar el ensayo revelaron una prevalencia elevada de mastitis estafilocócicas en las explotaciones objeto de estudio. Posteriormente, y considerando las limitaciones presupuestarias y la disponibilidad de información a través del control de producciones, el seguimiento de los animales implicados en el ensayo se centró en el análisis de la evolución del recuento de células somáticas por mililitro de leche (RCS) y de la producción (Kg de leche/día).

Considerando los resultados obtenidos en el estudio previo de los efectos de esta vacuna en el ganado ovino (MARCO *et al.*, 1995), se restringió el período de observación para las muestras implicadas en el análisis estadístico a 10 meses (5 previos a la primera vacunación y 5 posteriores a la misma, sin considerar el mes de vacunación). En el caso de que los efectos observados en dicho período respecto del efecto de la vacunación sobre el RCS y sobre la producción (kg de leche/día) fueran muy importantes, se procedería a ampliar el período de observación a más de 11 meses (más de 5 meses tras la vacunación). También se procedería a analizar el efecto sobre la composición de la leche en dicho caso.

Se eliminaron del estudio aquellas vacas, entre las 291 consideradas, cuyo RCS fue mayor o igual a $10^6$ células somáticas/ml de leche en dos o más tomas durante el periodo comprendido entre el mes de vacunación (inclusive) y los 5 meses anteriores. Cuando la vacunación se realizó durante la lactación, todos los datos estudiados correspondieron a esa lactación. En aquellas vacas que se vacunaron durante el periodo de secado o al final de la lactación, sus datos correspondieron a dos lactaciones consecutivas (la previa y la posterior). Solo se tuvieron en cuenta aquellas vacas de las que se disponía de al menos un control anterior y otro posterior a la vacunación, dentro del periodo de estudio.

En suma, bajo las condiciones indicadas, el análisis comprendió un total de 982 controles (480 anteriores y 502 posteriores a la fecha de vacunación), procedentes de 132 vacas (63 vacunadas y 69 controles) de 4 explotaciones. Se eliminó, pues, el 54,6% de las 291 vacas inicialmente consideradas.

Los RCS se sometieron a transformación logarítmica antes de efectuar los análisis estadísticos. Para estudiar el efecto de la vacuna sobre el RCS se consideraron dos parámetros: uno cualitativo, consistente en el tanto por ciento de animales cuyo RCS medio fue menor en el periodo posterior a la vacunación que en el anterior, y otro cuantitativo, consistente en el RCS en sí (tras su transformación logarítmica). El primero (porcentaje) se comparó mediante la técnica de chi-cuadrado. Para el segundo (logaritmo

decimal de los RCS), se realizó un análisis de varianza-covarianza (ANCOVA). El modelo inicial fue el siguiente:

$$LRCS_P_{ijk} = \mu + VACU_i + MES_j + VACU*MES_{ij} + \beta*LRCS_A_{ijk} + MES\beta_j*LRCS_A_{ijk} + VACU\beta_i*LRCS_A_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

LRCS_P: Logaritmo decimal del recuento de células somáticas en cada muestreo mensual de cada vaca, posterior a la vacunación (variable dependiente).

$\mu$: media general de LRCS_P

VACU: Efecto de la vacunación (2 niveles: vacunado, no vacunado)

MES: Meses tras la primera dosis vacunal (5 niveles, correspondiendo a los 5 meses consecutivos posteriores a la vacunación)

LRCS_A: Media del logaritmo decimal del recuento de células somáticas en los 5 meses anteriores a la vacunación para cada vaca (covariable)

$\beta$: Pendiente de la regresión entre LRCS_P y LRCS_A

$MES\beta_j$*LRCS_A y $VACU\beta_i$*LRCS_A: representan las interacciones entre los factores fijos MES y VACU con la covariable LRCS_A (posibilidad de heterogeneidad de pendientes)

$\epsilon$: Error aleatorio que incluye el efecto vaca.

Los efectos VACU y MES se consideraron fijos. LRCS_A se utilizó como covariable, al objeto de corregir las diferencias iniciales que existían entre los grupos vacunado y no vacunado. Este mismo modelo se utilzó para analizar el efecto de la vacunación sobre la producción de leche (KGLECHE_P), pero sin realizar la transformación logarítmica. La media aritmética de la producción de leche en los 5 meses anteriores a la vacunación (KGLECHE_A) se utilizó como covariable para corregir las diferencias iniciales que existían entre los grupos vacunado y control. Las interacciones (entre factores fijos y entre éstos y la covariable) que no fueron estadísticamente significativas se eliminaron progresivamente del modelo hasta llegar a un modelo definitivo. Dichos análisis se realizaron mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1989), utilizando el sumatorio de cuadrados de tipo III.

## Resultados y discusión

### Inocuidad de la vacuna

En las explotaciones E y F, en las que se aplicó el inóculo previamente descrito (en la patente indicada en la sección Material y Métodos), aparecieron algunas reacciones tóxicas en el momento de la inoculación, las cuales, si bien eran relativamente suaves, no eran deseables (estas reacciones no habían aparecido en la especie ovina; MARCO, 1994) y podrían influir como factor de estrés en el sistema inmunológico y en la producción de leche.

Por ello, y a la vista de experiencias anteriores descritas por diversos autores en cuanto a las reacciones anafilácticas que pueden causar diversos toxoides, se decició descartar el toxoide de la vacuna para la explotaciones A, B, C y D. Asimismo, y con el objeto de abaratar costes, se eliminó para estas últimas explotaciones el adyuvante sulfato de dextrano, sustituyéndose éste por

hidróxido de aluminio. El nuevo inóculo vacunal así obtenido no causó efectos tóxicos en ninguna de las cuatro explotaciones, por lo que se procedió a la evaluación estadística de los datos productivos y de RCS en dichas explotaciones.

## Recuento de células somáticas (RCS) y producción lechera

En la Fig.1, se ilustra la evolución de la media de RCS (log10 RCS), y de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en el conjunto de las explotaciones estudiadas. Se observa una tendencia hacia un RCS inferior y una producción algo superior, en el grupo vacunado frente al no vacunado en el periodo posterior a la vacunación. Es decir, el grupo vacunado parece remontar mediante la vacunación la deficiencia que tenía durante el período pre-vacunal en cuanto a producción y estado sanitario de la mama (RCS). Asimismo, y con independencia de la vacunación, se observa en ambos grupos (vacunado y control) una tendencia a un aumento de RCS y a una disminución de producción según avanza el período de estudio, probablemente como consecuencia del efecto debido al estadío de la lactación.

En la Fig. 2, se ilustra la evolución de la media del recuento de células somáticas ($log_{10}$ RCS), a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D). En general, puede concluirse que la tendencia observada en el conjunto de las explotaciones respecto del RCS fue también observada en cada una de ellas. Asimismo,

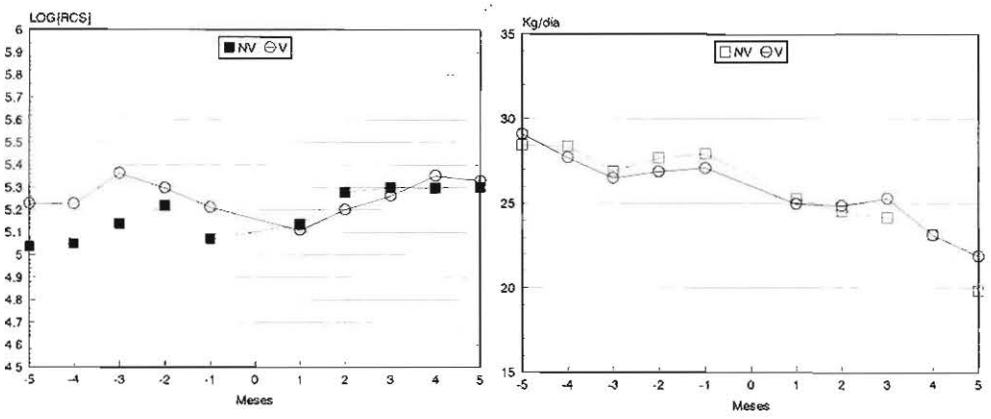



Fig. 1. Evolución de la media del recuento de células somáticas (RCS), expresado en Log10 de RCS, y de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en el conjunto de las explotaciones estudiadas. (Mes 0 = primera dosis vacunal; V = vacunado; NV = no vacunado)

*Evolution of the mean somatic cell count (SCC), expressed in Log10 of SCC, and of milk production (kg/day) in a 10 month-period (5 months preceeding the first vaccination and 5 months following that vaccination), considering the farms altogether (Month 0 = first vaccine dosis; V = vaccinated; NV = not vaccinated)*

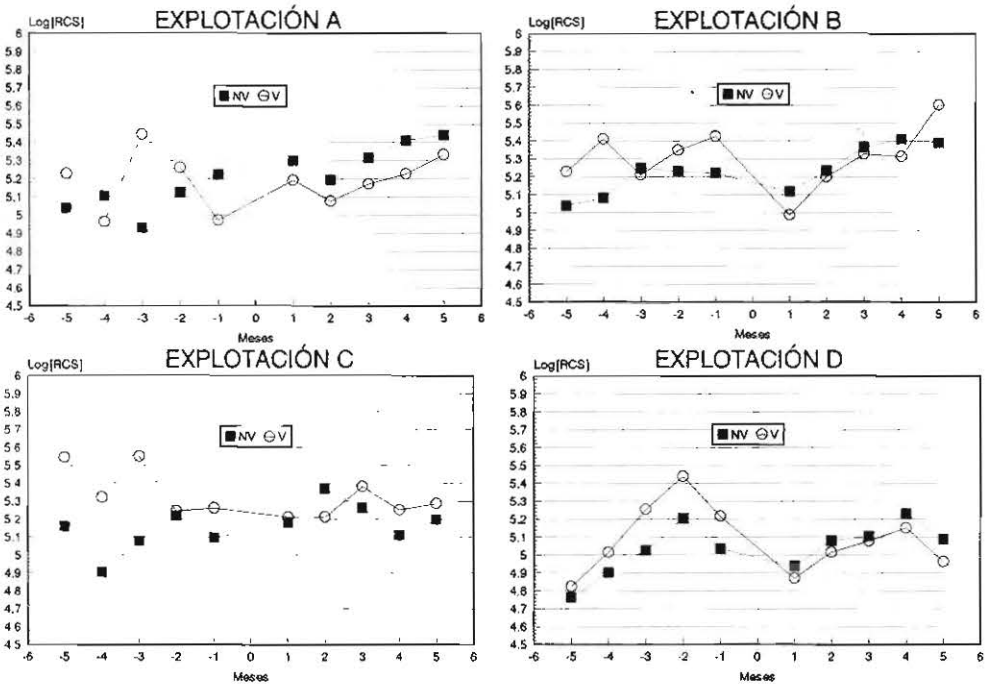



Fig. 2. Evolución de la media del recuento de células somáticas ($log_{10}$ de RCS) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D). (Mes 0 = primera vacunación; V = vacunado; NV = no vacunado)

*Evolution of the mean somatic cell count (SCC), expressed in $Log_{10}$ of SCC in a 10 month-period (5 months preceeding the first vaccination and 5 months following that vaccination), in each of the studied farms (A, B, C and D). (Month 0 = first vaccine dosis; V = vaccinated; NV = not vaccinated)*

tres de las cuatro explotaciones siguen la tendencia indicada anteriormente. Solo en la explotación C deja de observarse en valores absolutos un menor número de células somáticas en el grupo vacunado respecto del grupo control durante el período post-vacunal. Ello puede deberse a que en dicha explotación el RCS era mucho más elevado en el grupo vacunal que en el grupo control durante el período pre-vacunal. La vacunación solo pudo reducir ligeramente esta diferencia en el período post-vacunal.

También se estudió la evolución de la media de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación) en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D; Fig. 3). Se observa que las explotaciones siguen la tendencia mencionada de aumento de producción, especialmente tras la segunda vacunación (mes 2 tras la primera vacunación). En conclusión, al igual que el RCS, la tendencia observada en el conjunto de las explotaciones respecto de la producción fue también detectada en cada una de las explotaciones.

En las Tablas 1 y 2, se presenta un resumen de los análisis de varianza realizados. Para el RCS (LRCS_P, Tabla 1), resultaron

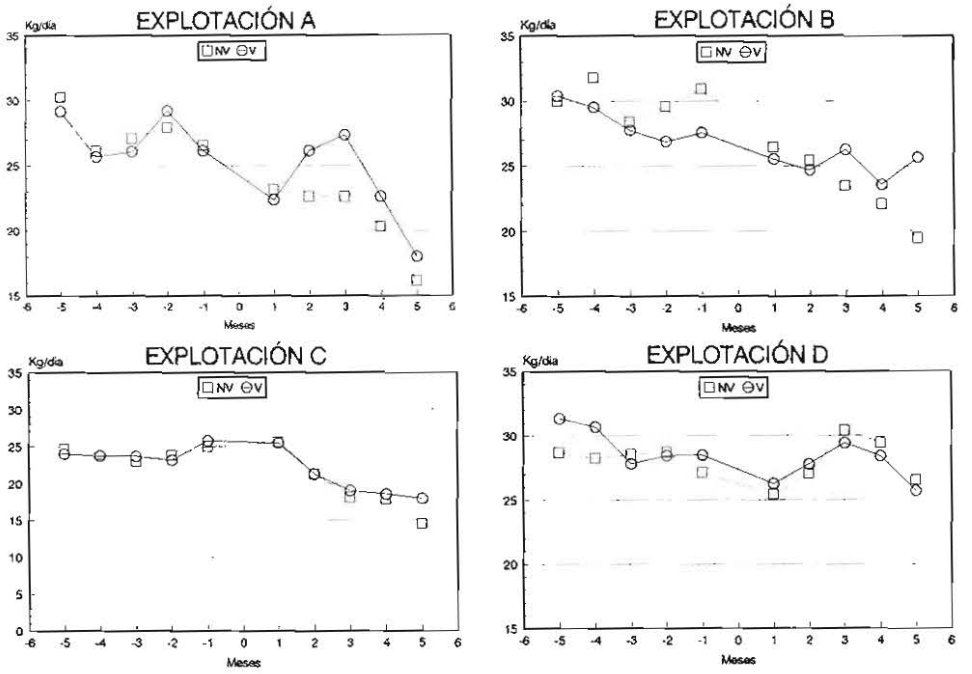



Fig. 3. Evolución de la media de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D). (Mes 0 = primera dosis vacunal; V = vacunado; NV = no vacunado)

*Evolution of milk production (kg/day), in a 10 month-period (5 months preceeding the first vaccination and 5 months following that vaccination), in each of the studied farms (A, B, C and D). (Month 0 = first vaccine dosis; V = vaccinated; NV = not vaccinated)*

TABLA 1

RESULTADOS DEL ANCOVA PARA EL LOGARITMO DECIMAL DEL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (LRCS_P) EN LOS 5 MESES POSTERIORES A LA VACUNACIÓN

*TABLE 1*

*RESULTS OF THE ACOVA FOR THE DECIMAL LOGARITHM OF SOMATIC CELL COUNT IN THE 5 MONTHS FOLLOWING VACCINATION*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | F | Significación (P<) |
|---|---|---|---|
| VACU | 1 | 5.27 | 0,0221 |
| MES | 4 | 3.15 | 0,0137 |
| LRCS_A | 1 | 113.37 | 0.0001 |
| LRCS_A*MES | 4 | 2.48 | 0,0431 |

TABLA 2
RESULTADOS DEL ANCOVA PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE (KGLECHE_P) EN LOS 5 MESES POSTERIORES A LA VACUNACIÓN
*TABLE 2*
*RESULTS OF THE ANCOVA FOR MILLK PRODUCTION (KGLECHE_P) IN THE 5 MONTHS FOLLOWING VACCINATION*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | F | Significación (P<) |
|---|---|---|---|
| VACU | 1 | 6,62 | 0,0104 |
| MES | 4 | 1,40 | 0,2312 |
| KGLECHE_A | 1 | 193,39 | 0,0001 |
| KGLECHE_A*MES | 4 | 4,89 | 0,0007 |

significativos los efectos producidos por la vacunación (VACU) y mes posterior a la vacunación (MES) así como la covariable (LRCS_A) y su interacción con el factor MES. Esto último significa que la pendiente (β) entre la variable objeto de estudio (LRCS_P) y la covariable (LRCS_A) no fue la misma a lo largo de todos los meses. No se observó interacción entre los factores VACU y MES, lo que indica que la diferencia neta de RCS entre los grupos vacunado y control fue similar para todos los meses estudiados. Tampoco hubo interacción entre el factor VACU y la covariable LRCS_A, lo que indica que la relación entre LRCS_P y LRCS_A fue similar en ambos grupos (vacunado y control).

Para la producción diaria de leche (KGLECHE_P. Tabla 2), los resultados fueron similares, a excepción de que no pudimos demostrar diferencias significativas entre meses.

Una vez corregidos los desequilibrios en RCS encontrados entre los grupos vacunado y control en el periodo anterior a la vacunación, así como los producidos por las variaciones mensuales, se observó que el efecto medio neto de la vacuna en el periodo posterior a la vacunación fue de una reducción del recuento de células somáticas del 20,6% (medias geométricas de mínimos cuadrados: 158.489 y 199.526 células/ml, para los grupos vacunado y control, respectivamente; P<0.03). En el grupo vacunado, el porcentaje de vacas con un RCS medio menor en los 5 meses posteriores a la fecha de vacunación que en los 5 anteriores fue de 54%. Sin embargo, en el grupo control esta cifra fue del 36,2% (un 17.8% inferior; P<0.05), debido probablemente a contagios de animales sanos, al agravamiento de la patología de animales subclínicamente infectados a lo largo del tiempo y/o al incremento en RCS según avanza la lactación.

Este descenso en el RCS del grupo vacunado en relación al grupo control, así como el descenso en el porcentaje de animales con RCS altos, vino acompañado de una ganancia media diaria de 1,2 Kg de leche por vaca y día a lo largo de los 5 meses posteriores a la vacunación (medias de mínimos cuadrados: 21.0 y 19.8 para los grupos vacunado y control, respectivamente: P<0,02), que representa un incremento de producción del 6,1%.

El significado biológico (con repercusión en la producción y la economía) que acompañó al efecto observado tras la vacunación parece ser muy positivo. La protección conferida por la vacuna se atribuye, en el caso de la mastitis, a que las bacterias serían mejor opsonizadas tras la vacunación, con lo cual disminuiría el número de bacterias al ser éstas mejor fagocitadas, causando con ello una menor inflamación mamaria y, como consecuencia, una mayor producción lechera.

Merece destacarse la problemática encontrada al intentar demostrar un efecto de esta vacuna en condiciones de campo. De hecho, se hizo imprescindible tener en cuenta tanto los valores medios de RCS y producción de cada vaca previos a la vacunación, como el efecto de variación mensual, para corregir los datos de RCS y producción posteriores a la vacunación. Sin estas correcciones no se hubiera podido demostrar la significación estadística del efecto de la vacuna sobre los parámetros estudiados.

Las condiciones en las que se realizó la experiencia conllevaban: la presencia de elevado RCS y menor producción en animales infectados previamente a la vacunación, una varianza elevada en el RCS y en la producción lechera (además de la existente propia de la capacidad productiva y fisiología del individuo), la presencia de infección debida a distintos géneros bacterianos, una sensibilización natural en algunos animales previo a la vacunación, la aplicación de la vacunación a animales en distinto mes de lactación o de secado y en distina época del año, diferencias entre animales en cuanto a condiciones higiénicas y de ordeño y en cuanto al estadío de infección y gravedad de la misma, una dificultad en la detección de crónicos y, en definitiva, una dificultad en observar un efecto neto de la vacuna.

En este sentido, conviene recordar que en mamas infectadas (por estafilococos u otras bacterias), el RCS puede ascender a varios millones de células por mililitro, especialmente si el patógeno implicado es un patógeno mayor como *S. aureus*. Por ello, tanto en los procesos agudos esporádicos como en los procesos crónicos, se observan grandes fluctuaciones de RCS entre meses (Figs. 1 y 2). Esta es una de las mayores diferencias entre la realización de un ensayo realizado en condiciones naturales de explotación, según lo especificado en el presente estudio y un ensayo de evaluación de vacuna en condiciones idóneas. En este último caso, si la disponibilidad económica lo permitiera, podría plantearse para futuros estudios el ensayo del siguiente modo: se realizarían determianciones bacteriológicas mensualmente durante el período pre-vacunal; de los animales libres de estafilococias (animales del *grupo a*) se vacunarían el 50 por ciento, quedando el otro 50 por ciento sin vacunar (animales control); todos los animales vacunados y los animales control se pondrían tras la fecha de vacunación en contacto con otros animales, todos ellos con estafilococias (animales del *grupo b*) por lo que en el período post-vacunal los animales sanos tendrían el riesgo de infectarse con estafilococos. Se liminarían del estudio los animales del grupo b, procediéndose al estudio de los animales del grupo a en el período pre-vacunal y post-vacunal.

Este planteamiento, si bien es deseable desde el punto de vista científico para determinar el efecto profiláctico de la vacuna sobre animales sanos con alto riesgo de infección, sería posiblemente inviable desde el punto de vista de la colaboración del ganadero, ya que exigiría una alteración del manejo de los animales en la explotación y en muchos casos el ganadero no se prestaría a arriesgar voluntariamente sus animales a

infecciones estafilocócicas, aun cuando se le compensara su riesgo económicamente. Específicamente, para lograr el contagio de los animales del *grupo b* habría que transgredir voluntariamente las normas de desinfección en el ordeño, permitiendo que las bacterias procedentes de animales sanos infectaran a ubres sanas por efecto reflujo en las pezoneras y que los animales con estafilococias fueran ordeñados antes de los sanos, con lo cual se vulnerarían las normas principales de manejo higiénico que se realizan para controlar la mastitis asociada al ordeño mecánico.

## Posibles implicaciones económicas

Desde el punto de vista económico, en las condiciones de la experiencia, el hecho de que un animal, al estar vacunado, produzca por término medio 1,2 kg de leche adicionales diariamente durante el período post-vacunal estudiado, significaría (asumiendo un precio de 47 pts/l de leche) 8.460 pts (1,2 x 47 x 150) de beneficio por vaca en dicho período, al que habría que descontar el coste de la vacuna (asumiendo que oscila entre 150 y 250 pts por dosis, dos dosis = 500 pts, máximo por animal) y el de su aplicación (50 pts/vaca/dosis, total = 100 pts). Es decir, el beneficio neto se situaría en unas 7.860 pts, lo que supondría una relación beneficio:coste de 13:1 para los respectivos supuestos, sin contabilizar los beneficios derivados de: a) la disminución de leche penalizada por el elevado RCS, b) evitar los costes de medicamentos y de cuidados veterinarios para paliar el efecto o el establecimiento de infecciones tras la vacunación; y c) evitar resistencias a los antibióticos en las bacterias. Respecto del punto b), conviene recordar que, según se demuestra en un estudio nuestro anterior (AMORENA *et al.*, 1994), tras una infección experimental en la que se inocula un número conocido de bacterias en la mama a animales libres de infección previamente inmunizados con la vacuna anteriormente descrita por este grupo, se observa un efecto protector de dicha vacuna importante, disminuyendo la gravedad de la mastitis y su prevalencia.

La relación beneficio:coste mencionada, si bien habría que comprobarla con un mayor número de animales, es del mismo signo que la observada (5,2:1) en ganado ovino tras la aplicación de la vacuna análoga a la utilizada en este estudio (MARCO *et al.*, 1995). Así, en ganado ovino lechero, se ha observado que, si bien el efecto de la vacuna sobre el RCS es relativamente reducido, dicho efecto es notable sobre la producción lechera (9 litros por animal vacunado en el total del período de lactación), en la raza Latxa; así, la vacuna, además de suponer un beneficio económico considerable, según apunta MARCO (1994), representaría una vía complementaria a otras vías de control de mastitis, como son la mejora de la higiene, la regulación de la máquina de ordeño, el orden de ordeño o la aplicación de terapia al secado.

Hubiera sido deseable en este estudio la utilización de un mayor número de animales, de animales sincronizados, o que hubieran recibido la vacunación en un mismo mes de lactación o de secado, en una misma época del año y en un mismo período de lactación. Asimismo, en alguna de las explotaciones, las prácticas de higiene y ordeño necesarias para evitar la mastitis (por ejemplo, la desinfección de pezones) no se realizaron correctamente, favoreciendo el paso de gérmenes entre ubres de manera incontrolada e impredecible. Sin embargo, las condiciones en que se realizó la experiencia impidieron aplicar la sincronización, el manejo y las prácticas higénicas de manera generalizadamente idónea, con todo lo cual

la detección del efecto de la vacunación pudo verse seriamente interferida.

## Conclusiones

En este estudio se evidencia la importancia de la realización de pruebas de inocuidad en la especie bovina previo a la aplicación (o a las pruebas de evaluación) de la vacuna en una explotación. También se demuestra que, cuando el estudio se realiza en las condiciones naturales de las explotaciones comerciales, sin alteración del manejo de los animales, con aprovechamiento de los datos obtenidos en el control de producciones (producción de leche y RCS) y con escasos medios, el ganadero suele prestarse con facilidad a la colaboración y pueden obtenerse datos de interés sobre el efecto de la vacuna, pero la variabilidad atribuible al RCS y a la producción de leche dificultan la observación del efecto neto de la vacuna, según los datos obtenidos en este estudio. A pesar de esta dificultad, se ha observado en este estudio preliminar que los animales vacunados presentan un menor RCS y una mayor producción, siendo rentable la vacunación a la vista del posible beneficio productivo resultante. Algunos de los problemas de variabilidad en RCS como parámetro indicador de mastitis podrían resolverse, si los medios lo permitieran, realizando un análisis bacteriológico de la leche que sustituyera a las determinaciones de RCS. Idóneamente, para poder aislar el efecto debido a la vacunación de otros efectos, la evaluación de la vacuna ha de realizarse en animales que en el momento de la vacunación estén libres de estafilococias. También, deberían utilizarse animales con unos mismos niveles de producción, en un mismo estadío de lactación, que tuvieran un mismo número de lactaciones y un mismo tipo de manejo y que, tras la vacunación, estuvieran expuestos a contagios "naturales" por estafilococos procedentes de vacas que no entrarían en el estudio. La colaboración del ganadero y la financiación de la experiencia serían los puntos decisivos para llevar a cabo este tipo de evaluación en explotaciones comerciales. De lo contrario, habría de utilizarse un gran número de animales, si han de detectarse los efectos de la vacuna a partir de los datos de RCS y producción lechera.

## Agradecimientos

Financiado por INIA (proyecto Demostración PD 93-010). Agradecemos la colaboración de los ganaderos que han participado en el estudio y al ITGV de Navarra, especialmente a los equipos de dirección e informáticos, por facilitarnos los datos de producción.

## Bibliografía

ADLAM C., WARD P.D., MCCARTNEY Ch., ARBUTHNOTT J.P., THORLEY C.M., 1977. Effect of immunization with highly purified alpha and beta toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. Infection and Immunity, 17, 250-256.

AMORENA, B., ALBIZU, I., BASELGA, R., 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. Vaccine, 12, 243-249.

BASELGA, R., ALBIZU, I., DEL CACHO, E., BARBERÁN, M. AMORENA, B., 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*, implication in colonization and virulence. Infection and Immunity, 61, 4857-4862.

BASELGA, R., ALBIZU, I., AMORENA, B., 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in mastitis. Veterinary Microbiology, 39, 195-204.

BROCK J.H., STELL E.D., Reiter B., 1975. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. Research in Veterinary Science. 19. 152-158.

CULLOR, J.S., 1991. The *Escherichia coli* J5 vaccine: Investigating a new tool to combat coliform mastitis. Veterinay Medicine. 86. 836-844.

FATTOM A., SHILOACH J., BRYLA D., FITZGERALD D., PASTAN, I., KARAKAWA, W.W., ROBBINS, J.B., SCHNEERSON, R., 1992. Comparative immunogenicity of conjugates composed of the *Staphylococcus aureus* type-8 capsular polysaccharide bound to carrier proteins by adipic acid dihydrazide or N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate. Infection and Immunity. 60. 584-589.

FOSTER, T.J., 1991. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. Vaccine. 9. 221-227.

FROST, A.J., MAFTILA, T., 1988. The effect on inflammation of the bovine mammary gland on vaccination with a cell wall extract of *Staphylococcus aureus*. Journal of Veterinary Medicine, Series B. 35. 688-694.

GILBERT F. B., POUTREL, B., SUTRA, L. 1993. Immunogenicity of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide ovalbumin conjugate. Vaccine, 10, 389-394.

GREENBERG D.P., BAYER A.S., CHEUNG A.L., WARD, J.I., 1989. Protective efficacy of protein A-specific antibody against bacteremic infection due to *Staphylococcus aureus* in an infant rat model. Infection and Immunity. 57. 1113-1118.

GUIDRY, A.J., PAAPE, M.J:, PEARSON, R.E., et al., 1980. Local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils. American Journal of Veterinary Research. 41: 1427-1431.

HUNT, E., ANDERSON, K.L., 1993. Update on bovine mastitis. The Veterinay Clinics of North America. 9, 421-620

KLEINSCHROTH, E., RABOLD, K., DENEKE, J., 1990. La mastitis, diagnóstico, prevención y tratamiento. Ed. Grünland. 78 pp

MACKIE, D.P., POLLOCK, D.A., MENEELY, D.J., LOGAN, E.F., 1983. Clinical features of consecutive intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in vaccinated and unvaccinated heifers. Veterinary Record, 112: 472-476.

MARCO, J.C., 1994. Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.

MARCO, J.C., ROMEO, M., ESNAL, A., GONZÁLEZ, L., AMORENA, B., 1995. Ensayo de vacunación frente a las mastitis estafilocócicas en rebaños comerciales. ITEA vol. extra Núm 16 (II): 221-223.

PANKEY J.W., BRODIE N.T., WATTS J.L., NICKERSON, S.C., 1985. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. Journal of Dairy Science. 68. 726-731

POUTREL, B., 1985. Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidemiologie, diagnostic, méthode de contrôle. Recherche en Médecine Véterinaire. 161 (Num. especial) 497-511.

RAINARD, P., 1992. Isotype antibody response in cows to *Streptococcus agalactiae* group B polysaccharide ovalbumin conjugate. Journal of Clinical Microbiology, 30, 1856-1862.

SAS, 1989. SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide. Fouth Edition, 4th printing, June 1994. Volume 2, SAS Institute Inc.,Cary, North Carolina 846 pp.

TYLER, J.W., SPEARS, H., NELSON, R., 1992. Antigenic homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain. *Escherichia coli* 0111 - B4 (J5). Journal of Dairy Science 75. 1821-1825.

WATSON D L., 1984. Evaluation of attenuated, live staphylococcal vaccine in lactating heifers. Journal of Dairy Science 67. 2608-2613.

WATSON, D.L., 1988 Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. Research in Veterinary Science. 45. 16-21.

YOSHIDA, K. ICHIMAN, Y., NARIKAWA, S. et al., 1984. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. Journal of Dairy Science, 67. 620-627.

ZORRAQUINO, M.A. (1986) Mamitis. Bovis. núms. 10 y 11.E. Luzán. Madrid. España.

(Aceptado para publicación el 7 de marzo de 1996)