

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DEL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS,  
TASA DE NEOINFECCIÓN INTRAMAMARIA Y PRODUCCIÓN DE  
LECHE EN VACAS SELENIO-DEFICIENTES Y SUPLEMENTADAS  
CON SELENIO.**

Memoria de Título presentada como parte de  
los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO

**DANIEL ADOLFO URIBE CORTÉS**

**VALDIVIA-CHILE**

**2003**

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dr. Juan Kruze V. \_\_\_\_\_

**PROFESORES CALIFICADORES:** Dr. Pedro Contreras B. \_\_\_\_\_

Dr. Bernardo Fraser L. \_\_\_\_\_

FECHA DE APROBACIÓN: \_\_\_\_\_

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>12</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>34</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>40</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>53</b>

## 1. RESUMEN

El selenio (Se) es un nutriente mineral esencial para los animales y una deficiencia nutricional de este elemento ha sido asociada a diversas patologías en el bovino, entre las cuales se incluye la mastitis. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con Se sobre los mecanismos defensivos de la glándula mamaria en vacas lactantes mantenidas en condiciones naturales de manejo.

En un rebaño comercial de la provincia de Valdivia (X Región) con deficiencia nutricional de Se, se conformaron dos grupos experimentales de 25 animales cada uno; un grupo fue suplementado con Se (inyección subcutánea de 1 mg/Kg p/v de selenato de bario) y el otro grupo se mantuvo con la dieta deficiente en Se (Se-D). Los niveles de Se se evaluaron indirectamente a través de la determinación de la enzima GSH-Px en la sangre en muestras recolectadas 60 días antes del parto y, posteriormente, a los 30 días, 90, 180 y 270 días post parto. El efecto del selenio sobre los mecanismos defensivos de la glándula mamaria se evaluó a través del recuento de células somáticas a intervalos mensuales, la incidencia de mastitis clínica al parto y durante la lactancia y la tasa de neoinfección intramamaria en muestras duplicadas de leche recolectadas asépticamente a intervalos quincenales durante toda la lactancia a partir de los quince días post parto. Además se evaluó el efecto del selenio sobre la producción de leche. Los resultados se analizaron utilizando estadística descriptiva y la prueba “t” de Student como estadística inferencial con  $P < 0,05$ .

La suplementación con Se provocó un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de la enzima GSH-Px en el grupo Se-S, contrastando con el grupo Se-D que mantuvo sus niveles deficientes. Los RCS en el grupo Se-S promediaron 313.630 céls./ml, en comparación a los 428.110 céls./ml alcanzados en el grupo Se-D. La incidencia de mastitis clínica post-parto fue muy baja (3 casos en Se-D) y (2 casos en Se-S) lo que no permitió evaluar este parámetro. La tasa de neoinfección intramamaria fue similar en los grupos Se-S y Se-D (8,8% v/s 8,0%), causadas en su mayoría por *C. bovis* (44% y 32%) y SCN (21% y 34%). El porcentaje de cuartos mamarios infectados promedió un 24,4% en el grupo Se-D y 27,2% en el grupo Se-S. Los índices de producción de leche calculados fueron de 20,2 lt/vaca/día en el grupo Se-D, en contraste con los animales Se-S que fue de 18,8 lt/vaca/día.

Se concluye que la suplementación con Se, aunque aumenta los niveles sanguíneos de GSH-Px, no tiene efecto sobre los RCS, tasa de neoinfección intramamaria ni producción láctea. Es probable que, bajo condiciones naturales de manejo, la suplementación con Se se encuentre enmascarada por otros factores como genética, medio ambiente y manejo.

## 2. SUMMARY

Selenium (Se) is an essential mineral nutrient for animals and a nutritional deficiency of this element has been associated to several clinical pathologies in cattle, including bovine mastitis. The aim of this research was to evaluate the effect of Se supplementation on the defense mechanisms of the mammary gland in lactating dairy cows kept under natural management conditions.

Two experimental groups of 25 animals each were randomly selected in a commercial dairy herd located in the province of Valdivia (X<sup>th</sup> Region) known to be Se deficient; sixty days before calving, one group (Se-S) was supplemented with Se (subcutaneous injection of 1 mg/Kg/b.w. of barium selenate) and the other group (Se-D) was kept under Se deficient conditions throughout the experimental period. Blood levels of Se were indirectly evaluated by means of the Se-dependent enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood samples collected 60 days before calving and then at 30, 90, 180, and 270 days post partum. The effect of Se supplementation on the defense mechanisms of the mammary gland was evaluated based on somatic cell counts in milk recorded at 30 days intervals during the whole lactation, the incidence of clinical mastitis both at calving and in the lactation period, and the rate of new intramammary infection determined in duplicate quarter milk samples aseptically collected at fortnight intervals starting 15 days after calving. In addition, composite milk samples were collected monthly to record milk production in both groups of animals.

Selenium supplementation led to a significant increase ( $P < 0,05$ ) of the blood levels of the GSH-Px enzyme in the Se-S group in contrast to the Se-D group which showed deficient levels throughout the lactation period. Average SCC in the Se-S group was 313.630 cel/ml compared to 428.110 cel/ml of the Se-D group ( $P > 0,05$ ). The effect of Se supplementation on the incidence of clinical mastitis at calving could not be assessed as there were only three clinical cases among Se-D and two among Se-S animals. The rate of new intramammary infection during lactation was higher in the Se-S group (8.8% v/s 8.0%), but this difference was not significant; in both experimental groups most of these infections were caused by *C.bovis* (44% in Se-S and 32% in Se-D) and CNS (21% in Se-S and 34% in Se-D). The percentages of infected mammary quarters throughout the lactation period were 24,4% and 27,2% for Se-D and Se-S animals, respectively ( $P > 0,05$ ). Average milk production was 20,2 Lt/cow/day among Se-D and 18,8 Lt/cow/day among Se-S animals ( $P > 0,05$ ).

According to these results it is possible to conclude that selenium supplementation in dairy cows increases blood activity of GSH-Px but does not causes a mayor effect on the somatic cell count in milk, the rate of new intramammary infection during lactation nor on milk production. Under natural farm conditions there may be other factors which may probably mask the effect of Se supplementation such as genetic, environment and management.

### 3. INTRODUCCIÓN

La mastitis, probablemente, ha sido reconocida desde que el hombre domesticó a la vaca y es, actualmente, una enfermedad compleja, prevalente y costosa del ganado lechero, estando presente en todos los rebaños del mundo. La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria con alteración histopatológica del tejido secretor; generalmente producida por microorganismos, y donde la principal manifestación es el aumento anormal del contenido de células somáticas de la leche y que, a diferencia de otras enfermedades infecciosas del bovino, no se puede erradicar (Philpot y Nickerson, 1991; Kruze, 1992a).

En la mayoría de los casos la etiología de la mastitis es de origen bacteriano y alrededor de un 95 % de todos los casos son producidos principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*; el 5 % restante son producidas por bacterias coliformes especialmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y otros agentes como *Pseudomonas*, *Corynebacterium spp*, *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) entre otros (Kruze, 1992b).

De acuerdo con el origen de la infección y el modo de transmisión, las mastitis se pueden clasificar en contagiosas y ambientales. Las mastitis contagiosas son producidas fundamentalmente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *C. bovis* y SCN, agentes cuyo hábitat primario es la glándula mamaria infectada y su transmisión ocurre principalmente durante el período de ordeña. Las mastitis ambientales, en cambio, son causadas por microorganismos del medioambiente tales como: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y la transmisión ocurre fundamentalmente en los períodos de interordeña (Philpot y Nickerson, 1991).

La mastitis produce cuantiosas pérdidas económicas para el productor, el 70 % de las cuales se debe a una menor producción de leche, especialmente por las mastitis subclínicas crónicas de larga duración que dañan el tejido secretor (Kruze, 1992c).

La mastitis es una enfermedad que, en mayor o menor grado, está siempre presente en los rebaños lecheros; en consecuencia, es necesario implementar medidas básicas de control para reducir la prevalencia de la enfermedad, ya sea evitando las neo-infecciones intramamarias y/o eliminando las infecciones pre-existentes. Entre muchos otros factores, la alimentación juega un rol importante en el control de la mastitis, ya que se ha demostrado que la deficiencia o exceso de ciertos nutrientes son capaces de desencadenar numerosas

enfermedades, entre las cuales la mastitis es sólo una de ellas. Un componente importante de la ración de las vacas lecheras son los elementos minerales, nutrientes esenciales para un adecuado desarrollo y mantenimiento del organismo animal. De acuerdo con los requerimientos cuantitativos de los animales estos elementos se clasifican en “macronutrientes” (azufre, calcio, cloro, fósforo, magnesio, sodio y potasio) y “micronutrientes” (arsénico, boro, cobalto, cobre, cromo, flúor, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, silicio, vanadio y zinc) (Ceballos 1997).

Uno de estos micronutrientes estrechamente relacionado con la mastitis es el selenio (Se), metaloide descubierto por Berzeliuz y Gham en 1817 (Levander, 1987). El selenio se encuentra en todas las células del organismo, pero la concentración varía según el tipo de tejido y el aporte del mineral ingerido en la dieta, dependiendo de la forma química en que se encuentre (Levander, 1987), ya que el selenio en forma de selenatos y selenitos se absorbe intestinalmente mejor que el selenio elemental. El Se es necesario para el adecuado crecimiento y una mejor fertilidad en los animales y una deficiencia en la dieta puede causar una gran variedad de patologías (Cuadro 1).

**Cuadro 1** Enfermedades relacionadas con deficiencia de selenio en rumiantes\*

<b>Sistema afectado</b>	<b>Tejido afectado</b>	<b>Signos o enfermedad</b>
Muscular	Músculo esquelético	Enfermedad del músculo blanco
	Músculo esquelético (terneros, corderos)	Debilidad Neonatal
Cardiovascular	Corazón	Miopatía cardiaca
Reproductivo	Útero- placenta Útero- embrión Testículos	Retención de placenta Abortos Degeneración testicular
Fagocítico-endotelial	Células mono y polimorfonucleares	Inmunosupresión
Mamario	Glándula mamaria	Mastitis

\* Ceballos y Wittwer (1996).

El Se es parte integral de una enzima denominada glutatión peroxidasa (GSH-Px) que se ha aislado en gran cantidad de tejidos de numerosas especies animales (Lopez Alonso y col., 1997). La GSH-Px tiene un peso molecular de aproximadamente 80.000 daltons, está conformada por 4 unidades, contiene 4 átomos gramos de Se por mol, representa el 75% del Se sanguíneo, y está contenida en el interior de los glóbulos rojos a los que se incorpora

durante la eritropoyesis (López Alonso y col., 1997). Esta enzima en la actualidad se determina rápidamente en la sangre y con procedimientos sencillos, constituyendo una importante medida indirecta en el diagnóstico de procesos carenciales de Se (Wheatley y Beck, 1988; Mackintosh y col., 1989).

La GSH-Px es uno de los principales antioxidantes del organismo y su función es catalizar la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de glutatión reducido (GSH) cediendo un átomo de hidrógeno (H<sup>+</sup>) y transformándose en glutatión oxidado (GSSG), de acuerdo con la siguiente reacción (Rotruck y col., 1973):



La inactivación del metabolito oxigenado al transformarse en agua evita los daños producidos sobre la integridad celular, de modo que esta enzima es el primer responsable de la protección celular en ambientes aeróbicos (Miller y col., 1993). La deficiencia nutricional de Se induce una disminución de la actividad de la GSH-Px dejando la célula expuesta a la acción nociva de los metabolitos oxigenados reactivos (MOR), lo que conlleva a alteraciones orgánicas. Esta deficiencia se presenta en bovinos cuando el contenido del mineral en la ración es inferior a 0,1 ppm. Actualmente en vacas lecheras se recomienda una concentración de Se en la ración de 0,3 ppm (NRC, 2001). Al respecto, es importante destacar que un estudio realizado con forrajes del sur de Chile demostró que el 60% de las muestras analizadas presentaban una concentración de Se inferior a 0,1 ppm (Ceballos y col., 1998). Además de las bajas concentraciones de Se observada en los forrajes del sur de Chile demostrada a través de la determinación de GSH-Px en bovinos lecheros, se ha observado un aumento de la frecuencia de animales con valores deficitarios. Es así como Wittwer (1997) detectó en las provincias de Valdivia y Bio-Bio, un 31% y 83% respectivamente, de vaquillas con valores deficientes de este mineral, valores que fueron, respectivamente, 6% y 0% en vacas en las mismas zonas.

De esta forma se ha establecido que una actividad superior a 130 U/g Hb indica un aporte adecuado de Se en la ración, mientras que valores inferiores a 60 U/g Hb señalan una deficiencia en el aporte nutricional de este mineral; valores entre estas cifras indican un balance nutricional marginal de Se (Ceballos y Wittwer, 1996; Ceballos y col., 1998) (Cuadro 2).



**Cuadro 2** Actividad sanguínea de GSH-Px y su relación con la concentración sérica y sanguínea de selenio.

<b>Balance de Selenio</b>	<b>Sangre μmol/lt.</b>	<b>GSH-Px en sangre U/g deHb</b>	<b>Efecto de la suplementación con selenio</b>
Deficiente	<0,63	<60	Beneficioso
Bajo/Marginal	0,63-1,05	61-100	Beneficioso
Marginal	1,06-1,39	101-130	A menudo beneficioso
Adecuado	>1,39	>130	Sin efecto

\* Ceballos y Wittwer (1996).

Una de las consecuencias de la deficiencia de Se en vacas lactantes es la mayor susceptibilidad a cuadros de mastitis. La primera asociación entre esta patología y dietas Se-deficiente fue descrita por Boyne y Arthur (1979), quienes estudiando el efecto de este nutriente esencial sobre la performance reproductiva, observaron que las vacas suplementadas con Se y vitamina E durante el período seco tienen una menor incidencia de mastitis en el período de post parto. Otros investigadores han observado, además, que las vacas Se-deficientes tienen una mayor incidencia de mastitis clínica al parto, mayor duración de los signos clínicos, mayor porcentaje de cuartos mamarios infectados, especialmente en vaquillas, mayor incidencia de neoinfecciones intramamarias durante la lactancia y mayor recuento de células somáticas en la leche (Smith y col., 1985; Erskine y col., 1987; Ropstad y col., 1987; Weiss y col., 1990).

La primera barrera defensiva de la glándula mamaria contra las infecciones lo constituye el epitelio pluriestratificado y queratinizado del conducto del pezón, que se encuentra completamente rodeado por fibras musculares lisas, entre ellas la roseta de Fürstenberg, estructura que tiene por función cerrar el conducto del pezón cuando cesa el flujo lácteo (Giesecke y col., 1994). La deficiencia de Se podría afectar la función de esta estructura muscular (Smith y col. 1988), ya que la GSH-Px interviene en la cascada de reacciones que catalizan la formación de prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina y tromboxanos a partir del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (Stadtman, 1990), donde las prostaglandinas actúan a nivel de la musculatura lisa y con ello el inadecuado cierre del conducto del pezón, que facilitaría la entrada de gérmenes patógenos aumentando el riesgo de infección intramamaria, especialmente por patógenos ambientales (Philpot y Nickerson, 1991).

El mecanismo de defensa inespecífico más efectivo de la glándula mamaria es la barrera leucocitaria constituida, fundamentalmente, por neutrófilos que pasan de la sangre al tejido glandular (Sandholm, 1995) y cuya principal función es combatir la infección fagocitando y matando bacterias invasoras. Los neutrófilos de la leche de vacas Se deficientes mantienen su capacidad fagocítica pero muestran un menor poder bactericida sobre las

bacterias fagocitadas y una menor viabilidad (Grasso y col., 1987; Grasso y col., 1990). El mecanismo específico que explica esta menor capacidad para matar bacterias no es conocido con exactitud aunque se sabe que el metabolismo aerobio de los neutrófilos y macrófagos presentes en la leche es una de las fuentes generadoras de metabolitos oxigenados reactivos; por lo tanto, el Se ayuda a los neutrófilos y macrófagos a sobrevivir a los efectos tóxicos que se producen en el interior de las células a consecuencia del estallido producido por el aumento del metabolismo del O<sub>2</sub> durante la fagocitosis, prolongando la viabilidad de estas células fagocíticas (Babior, 1984; Smith y col., 1988).

Al emplear dos antioxidantes (Se y vitamina E) en la suplementación, se mejora la respuesta de los leucocitos poliformonucleares frente al estímulo por sustancias mitógenas; además, hay una mayor producción de leucocitos y superóxidos y aumenta la producción y migración hacia agentes quimiotácticos. El aumento en la producción de agentes quimiotácticos induce una mayor movilización de neutrófilos hacia la glándula mamaria, lo que constituye la primera línea de defensa frente a la mastitis producidas por *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae* (Ndiweni y Finch, 1996).

Si bien está claro que la mayoría de los estudios de la deficiencia de selenio se han realizado en bovinos y en especial buscando una mejor sanidad y defensa inmunológica de la glándula mamaria, no se debe dejar de lado que un aumento en la producción de prooxidantes induce una inmunodepresión en el individuo, dejando expuesta cualquier especie animal al desarrollo y aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas.

Hoy en día, la información disponible sobre los efectos del Se sobre la sanidad mamaria de los bovinos señala los beneficios de su suplementación, aunque la variabilidad de los resultados sugiere la necesidad de mayores estudios para establecer adecuadas condiciones de uso. En nuestro país, a pesar de la variada oferta de suplementos minerales, no existe mayor información al respecto.

En base a los antecedentes expuestos, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La alimentación deficiente en selenio, en vacas en lactancia, aumenta la susceptibilidad de la glándula mamaria a contraer infecciones intramamarias.
2. La alimentación deficiente en selenio disminuye significativamente la producción de leche.

Para poner a prueba las hipótesis planteadas, se realizó el estudio con los siguientes objetivos:

- 1) Evaluar el recuento de células somáticas (RCS) durante la lactancia en vacas con dietas deficitarias en selenio y vacas suplementadas con selenio.
- 2) Determinar la incidencia de mastitis clínica post-parto en vacas selenio deficiente y selenio suplementadas.
- 3) Determinar la tasa de neoinfección intramamaria durante la lactancia en vacas selenio deficiente y selenio suplementadas.
- 4) Evaluar el efecto del selenio sobre la producción de leche en vacas selenio deficiente y selenio suplementadas.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 REBAÑO LECHERO

Se utilizó un rebaño lechero comercial con antecedentes de dietas deficientes en selenio (valor promedio de GSH-Px 40,71 U/g Hb al inicio del ensayo), ubicado en la comuna de Máfil, provincia de Valdivia (X región), con 180 vacas masa de raza Frisón negro, manejadas con estabulación al anochecer y partos de otoño-invierno entre los meses de mayo y octubre. El sistema de encaste está basado en monta dirigida e inseminación artificial. La alimentación está basada principalmente en pradera, ensilaje y trigo quebrado que se suministra durante la ordeña.

Los animales se ordeñaban dos veces al día con un equipo de ordeña mecánica de línea alta de 8 unidades tipo espina de pescado. La rutina de ordeño se inicia con el lavado de ubres y pezones, examen de primeros chorros de leche (en el suelo), colocación de pezoneras sin secar previamente los pezones, y *dipping* post ordeña con una solución yodada diluida 1:1 (Ubrex, con 8000 ppm. de yodo disponible). Además, se realizaba terapia de secado a todas las vacas al término de la lactancia.

El plantel cuenta con asistencia médico Veterinaria permanente (una visita mensual) y, aunque no tiene control lechero oficial, lleva su propio registro de producción mensual. La producción de leche se entrega a la planta procesadora LONCOLECHE, cuyos informes mensuales de RCS indicaban un promedio de 259.000 céls./ml durante los últimos 12 meses, antes de iniciado el ensayo.

### 4.2 ANIMALES

Se conformaron dos grupos experimentales de 25 animales cada uno: un grupo fue suplementado con selenio (grupo Se-S) y el otro se utilizó como control (grupo Se-D). Por motivos de fuerza mayor, en el grupo Se-S se eliminaron dos animales antes del término de ensayo. La selección de los animales en cada grupo se realizó al azar, según el orden cronológico de la fecha probable de parto y la identificación se hizo de acuerdo al número del autocrotal de cada animal, permaneciendo los animales seleccionados junto al resto de las vacas del predio. Una vez asignados los animales a los dos grupos experimentales, se colocó

un autocrotal adicional de diferente color para cada grupo para facilitar la identificación de los animales.

#### 4.3 SUPLEMENTACIÓN CON SELENIO

Aproximadamente 2 meses antes de la fecha probable de parto los animales del grupo Se-S fueron suplementados por vía subcutánea con una dosis única de selenato de bario ( $\text{BaSeO}_4$ ) (1mg Se/Kg/pv) utilizando 1ml/50kg/pv del producto comercial DEPOSEL<sup>®</sup> (Young Animal Health, N. Zealand) (Fig.1), cuyo efecto perdura por prolongados períodos de tiempo manteniendo el balance de selenio en niveles considerados adecuados (Oblitas, 1997; Wittwer, 1997; Street, 2000; Chihuailaf, 2002 ). Las vacas del grupo control (Se-D) no fueron suplementadas, y se continuó con la alimentación normal del rebaño (deficiente en selenio) hasta el término del período experimental.



**Fig. 1** Presentación del producto comercial DEPOSEL<sup>®</sup> (selenato de bario)

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN PEROXIDASA (GSH-Px).

La actividad antioxidante se evaluó mediante la determinación de la enzima GSH-Px en muestras sanguíneas recolectadas por punción de la vena coccígea de todos los animales de ambos grupos 60 días antes del parto y, posteriormente, a los 30, 90, 180 y 270 días post parto. Los análisis se realizaron en el laboratorio del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, utilizando la técnica cinética NADPH de Paglia y Valentine modificada por Ceballos y col. (1999) (Fig. 2).



**Fig. 2** Equipo analizador Cobas® para la determinación sanguínea de GSH-Px.

#### 4.5 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

**4.5.1 Incidencia de mastitis clínica al parto:** se determinó mediante el examen clínico de la glándula mamaria y de la secreción láctea (fondo oscuro) (Fig. 3) de los cuartos mamarios individuales de todos los animales inmediatamente después del parto (hasta 6 días post parto), y mediante examen bacteriológico de muestras duplicadas de leche recolectadas asépticamente inmediatamente antes de la ordeña, siguiendo procedimientos estandarizados recomendados por el National Mastitis Council, USA (Harmon y col., 1990).



**Fig. 3** Examen de fondo oscuro para el diagnóstico de mastitis clínica.

**4.5.2 Tasa de neoinfección intramamaria:** se determinó mediante exámenes bacteriológicos de muestras duplicadas de leche de cuartos individuales durante toda la lactancia, a intervalos de 14 días a partir de la primera semana post parto. Se consideró como neoinfección intramamaria cuando se aisló un patógeno en un cuarto previamente no infectado o cuando en un cuarto previamente infectado se aisló un patógeno diferente en el muestreo siguiente.

**4.5.3 Recuento de células somáticas (RCS):** a partir de los 15 días post parto, y posteriormente cada 30 días, se recolectaron muestras compuestas de leche de vacas individuales en ambos grupos experimentales. Las muestras fueron obtenidas en frascos con dicromato de potasio inmediatamente antes de la ordeña de la tarde, previa eliminación de los primeros chorros de leche y fueron enviadas en condiciones de refrigeración al laboratorio de calidad de leche de COOPRINSEM, Osorno, para su análisis mediante un equipo Fossomatic (Combifoss 5300) (Fig. 4), dentro de las 72 horas de su recolección.



**Fig. 4** Equipo Fossomatic para el recuento electrónico de células Somáticas (Laboratorio Calidad de Leche, Cooprinsem, Osorno).

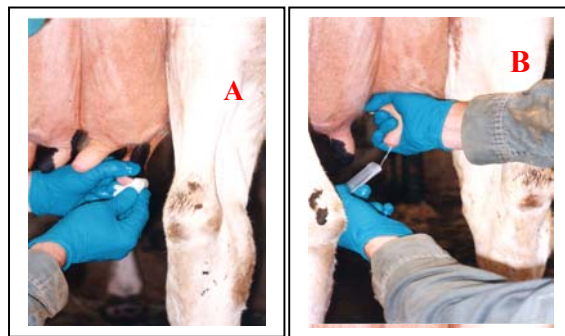
## 4.6 EXAMEN BACTERIOLÓGICO

Para el análisis bacteriológico de todas las muestras de leche se siguieron las técnicas y procedimientos recomendados por el National Mastitis Council, USA (Harmon y col., 1990) y la International Dairy Federation (1981).

**4.6.1 Recolección de las muestras:** se utilizaron tubos estériles de 15 ml de capacidad, con tapa rosca, debidamente rotulados, siguiendo los siguientes pasos secuenciales:

a) Desinfectar el orificio del pezón con algodón humedecido en alcohol al 70 % (Fig. 5 A).

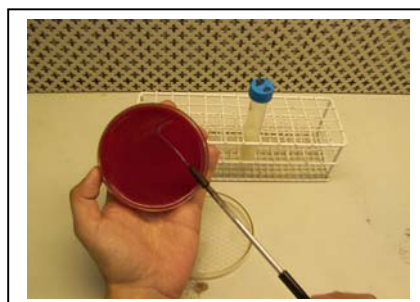
- b) Sujetar el tubo con los dedos índice y pulgar, manteniendo la tapa en el “bolsillo” que se forma al cerrar parcialmente los otros dedos de la mano.
- c) Mantener la boca del tubo lo más alejada del contacto de la mano y en una posición lo más horizontal posible para minimizar la contaminación (Fig. 5 B).
- d) Desinfectar primero los pezones mas alejados del operador y recolectar primero las muestras de los pezones más próximos.
- e) Con la otra mano eliminar los primeros chorros de leche a fin de evitar recolectar organismos que habitan en el conducto y cisterna del pezón.
- f) Tomar las muestras constriñendo la base del pezón y presionando posteriormente la cisterna en lo posible de una sola vez, sin restregar el pezón.
- g) Evitar que la punta del pezón toque la punta del tubo y no llenar más de 2/3 de su capacidad.
- h) Lavar las manos del operador después de la obtención de cada muestra.
- i) Mantener las muestras en condiciones de refrigeración hasta su procesamiento.



**Fig. 5** Recolección aséptica de muestras de leche. A) desinfección del orificio del pezón B) Obtención de la muestra de leche.

**4.6.2 Aislamiento de los patógenos mamarios:** previa agitación de la muestra en un vortex por 10 segundos, mediante un asa calibrada se traspasó 0,025 ml de leche a una placa de agar sangre ovino al 7 % con 0,1 % de esculina, y se distribuyó sobre un cuarto de la superficie de la placa (Fig.6), inoculando 4 muestras por placa; posteriormente se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se incubaron a 37 °C en aerobiosis por 24 - 48 hrs.





**Fig. 6** Inoculación de las muestras de leche en agar sangre-esculina.

**4.6.3 Identificación de los patógenos mamarios:** se realizó de acuerdo a las recomendaciones del National Mastitis Council, USA (Harmon y col., 1990) y métodos convencionales de diagnóstico bacteriológico.

En el caso de los *Staphylococcus* se consideraron las características morfológicas y hemolíticas, la prueba de la coagulasa lenta en tubo con plasma de conejo diluido 1:3 (OXOID) y la prueba de la DNAsa en placas de agar DNA (DIFCO). La prueba de la coagulasa se incubó a 37 °C realizando lecturas cada 30 minutos hasta las 4 horas y posteriormente cada hora hasta las 12 horas de incubación; cualquier grado de coagulación del plasma hasta las 4 horas de incubación se consideró como *Staphylococcus aureus*. La interpretación de la prueba de la DNAsa se realizó agregando a la placa, después de un periodo de incubación de 48 hrs. a 37 °C, cantidad suficiente de HCl 1N para cubrir toda la superficie de la placa; la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia de *Staphylococcus* se consideró como reacción positiva.

La identificación de los estreptococos mamarios (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*) se basó en las propiedades morfológicas, hemolíticas, producción de catalasa, crecimiento a 45 °C, test de CAMP y propiedades bioquímicas; para la diferenciación bioquímica se utilizó un kit comercial (SVA Strept®)\*, consistente en una microplaca con sustratos para investigar doce reacciones bioquímicas: hidrólisis de hipurato de sodio, arginina, esculina y almidón; fermentación de inulina, rafinosa, manitol, sorbitol, salicina, trealosa, lactosa y sacarosa.

\* (SVA. Uppsala, Suecia)

Para la identificación de las bacterias coliformes, se consideraron las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas. Para la identificación rápida de *E. coli* se utilizó un kit comercial (PI test) \* específico para esta especie; las cepas negativas al PI test fueron sometidas a un número más amplio de pruebas bioquímicas mediante el sistema API 20 E (Bio Mérieux S.A. Francia), específico para la identificación de bacterias gramnegativas.

Otros patógenos ocasionales como *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, fueron identificados siguiendo procedimientos convencionales estandarizados (Cowan, 1974; Mac Faddin, 1982).

#### 4.7 PRODUCCIÓN LÁCTEA

El efecto de la suplementación con selenio sobre la producción de leche se evaluó en ambos grupos experimentales midiendo la producción mensual con un medidor proporcional de leche (Waikato) a partir de los 30 días post parto, hasta el término de la fase experimental (una lactancia completa).

#### 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron y presentaron mediante el uso de estadística descriptiva e inferencial. La correlación entre las variables se realizó mediante la prueba de correlación de Pearson y la actividad sanguínea promedio ( $\pm$  D.E.) de GSH-Px por grupo, se midió previo a la suplementación con selenio preparto y posteriormente durante la lactancia a los 30, 90, 180 y 270 días post parto. La significación de las diferencias se estableció por Andeva y cuando indicó diferencias significativas se utilizó el test de comparación múltiple de Tukey. También se evaluó la significancia de las diferencias entre grupos mediante la prueba “t” de Student, considerándose significativo un valor de  $P < 0,05$  para lo cual se utilizó el programa computacional Graph-Pad-Prism, versión 3.0.

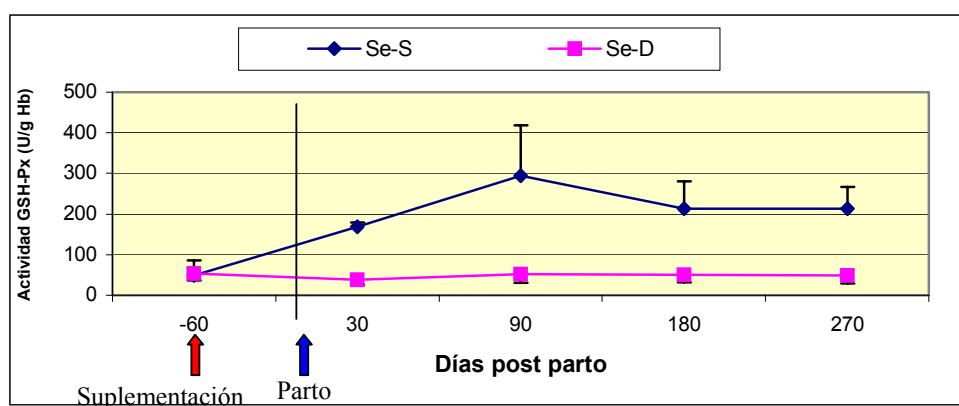
---

\* (SVA. Uppsala, Suecia)

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ACTIVIDAD SANGUÍNEA DE GSH-Px.

Los valores promedios de actividad de GSH-Px al inicio del experimento (60 días antes del parto) eran  $<60$  U/g Hb en ambos grupos experimentales, con valores promedios de 49,14 U/g de Hb para los animales del grupo Se-S y 53,56 U/g de Hb para los animales del grupo Se-D. Mientras el grupo no suplementado (Se-D) mantuvo niveles considerados como deficientes de GSH-Px a través de toda la lactancia, el grupo suplementado con selenato de bario (Se-S), mostró niveles sanguíneos crecientes de GSH-Px, alcanzando el nivel máximo a los 90 días post-parto (293,95 U/g Hb) y, aunque disminuyó al término de la lactancia, los niveles de GSH-Px se mantuvieron siempre dentro de los rangos considerados adecuados ( $>130$  U/g Hb) (Gráfico 1). La diferencia significativa ( $P<0,05$ ) entre los valores promedios de ambos grupos se estableció a los 30 días post-parto (90 días post suplementación) y se mantuvo hasta los 270 días de la etapa experimental.

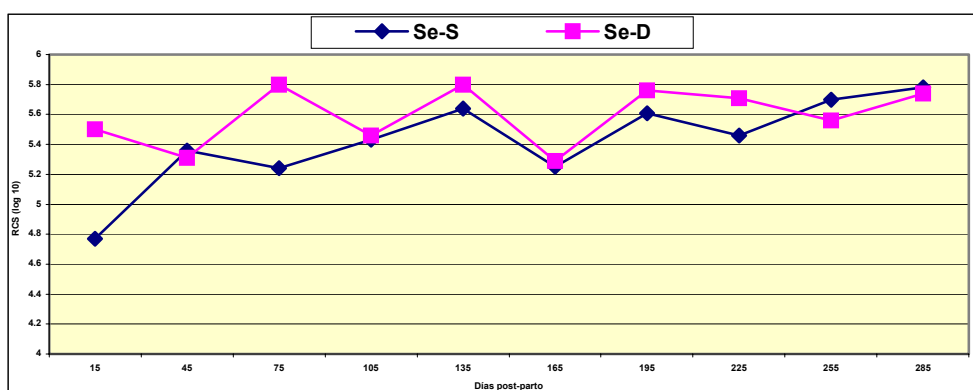


**Gráfico 1** Valores promedios ( $\pm$  D.E.) de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) en vacas suplementadas y no suplementadas con selenio (DEPOSEL<sup>®</sup>) 60 días preparto y su actividad a través de los 270 días de lactancia.

Los valores promedios de GSH-Px obtenidos en los animales del grupo Se-S desde el día 30 post suplementación hasta el término de la etapa experimental, fueron significativamente mayores al promedio inicial preparto; las medias de los valores sanguíneos de GSH-Px calculadas entre los días 30 y 270 post-parto fueron 222,18 U/g Hb para el grupo Se-S y 47,5 U/g Hb para el grupo Se-D ( $P<0,05$ ) (Anexo 1).

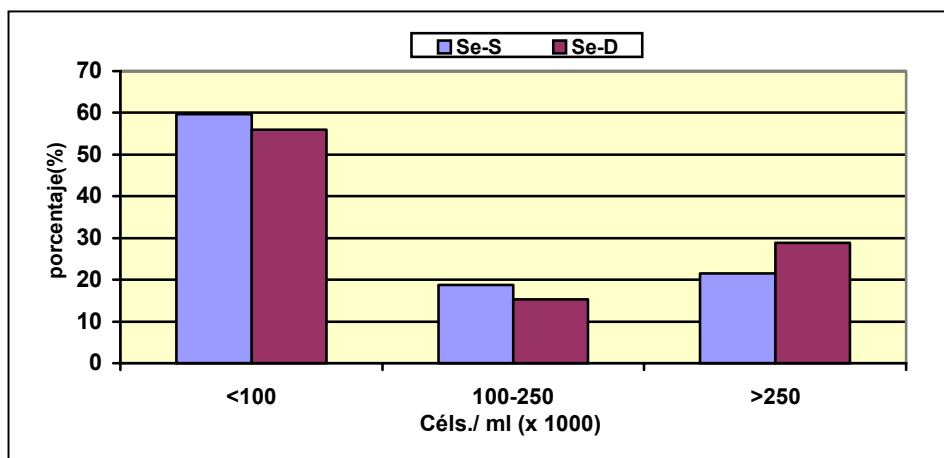
## 5.2 RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (RCS)

Los promedios mensuales de los RCS obtenidos durante los 285 días de lactancia controlados fueron 313.630 céls/ml para el grupo Se-S y 428.110 céls/ml para el grupo Se-D ( $P>0,05$ ) (Anexo 2, Gráfico 2).



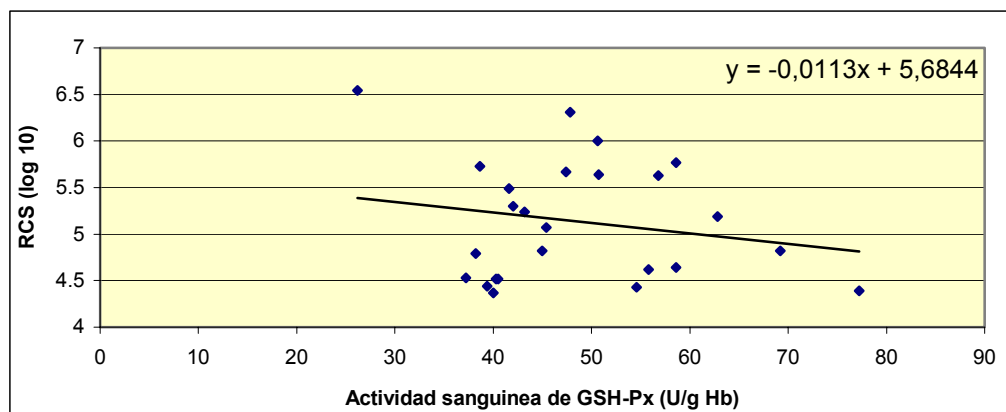
**Gráfico 2** Promedios mensuales de recuento de células somáticas ( $\log_{10}$ ) en vacas Se-S y Se-D durante 285 días de lactancia.

Al analizar los RCS por rangos de contenido celular se pudo comprobar que la proporción de vacas con recuentos celulares  $<100.000$  céls./ml fue, en la mayoría de los meses, mayor en el grupo de animales Se-S, con una media de 59,7% comparado con una media de 55,9% del grupo Se-D ( $P>0,05$ ). Del mismo modo, aunque tampoco hubo diferencias significativas, el grupo de animales Se-D presentó un mayor porcentaje de vacas con RCS  $>250.000$  céls./ml a través de toda la lactancia, con una media de 28,8% comparado con una media de 21,5% del grupo Se-S (Gráfico 3, Anexo 3)

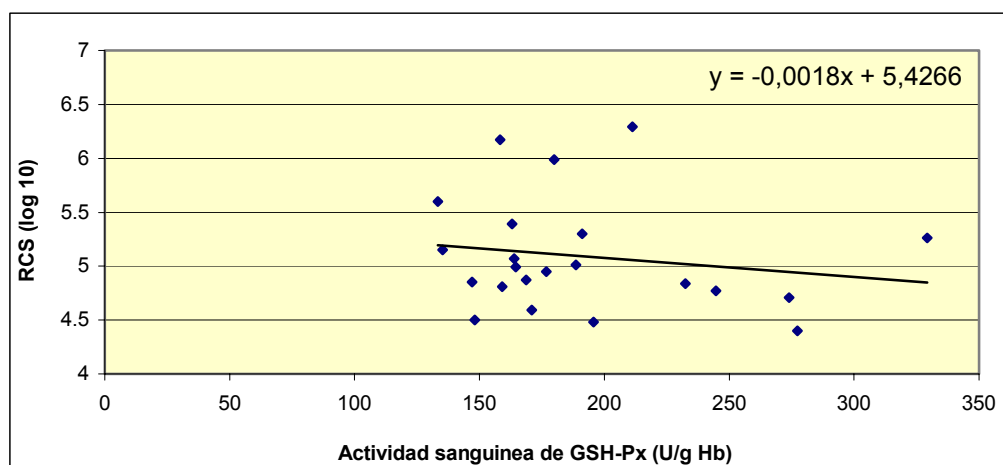


**Gráfico 3** Distribución promedio de vacas Se-D y Se-S en tres categorías según su contenido de células somáticas durante los 285 días de lactancia.

La correlación entre RCS y actividad sanguínea de GSH-Px fue negativa tanto en el grupo de animales Se-D ( $r = -0,199$ ) como en el grupo Se-S ( $r = -0,169$ ), no existiendo diferencias entre ambos grupos experimentales (Gráfico 4 y Gráfico 5).



**Gráfico 4** Recta de regresión entre la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) y el recuento de células somáticas en el grupo Se-D.



**Gráfico 5** Recta de regresión entre la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) recuento de células somáticas en el grupo Se-S.

### 5.3 INCIDENCIA DE MASTITIS CLÍNICA

La incidencia de mastitis clínica en los primeros 6 días post-parto fue muy baja en ambos grupos de animales en estudio, con sólo 3 y 2 casos clínicos para los grupos Se-D y Se-S, respectivamente (Cuadro 3). En el grupo Se-D de los tres casos clínicos, 2 fueron de mastitis asépticas y 1 causado por *Staphylococcus aureus*, mientras que en el grupo Se-S los dos casos clínicos fueron mastitis asépticas.

La incidencia de mastitis clínica durante la lactancia también fue baja con un total de 9 casos en el grupo Se-D y 10 en el grupo Se-S (Cuadro 3); en el grupo Se-D, 4 casos correspondieron a mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*, 1 por *Staphylococcus coagulasa negativo*, 1 por *Streptococcus spp.* y 3 bacteriológicamente negativas; en el grupo Se-S, 5 fueron causados por *Staphylococcus aureus*, 2 por *Streptococcus dysgalactiae*, 1 *Streptococcus agalactiae*, 1 *Staphylococcus coagulasa negativo* y 1 aislamiento fue negativo. El total de casos clínicos fue 12 para cada grupo de un total de 2092 cuartos mamarios expuestos en las vacas Se-D y 1976 cuartos mamarios en los animales Se-S, no estimándose la significancia entre ambos grupos por la escasa presentación de casos durante la etapa experimental.

**Cuadro 3** Incidencia de mastitis clínica post-parto y a través de los 270 días de lactancia.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Mastitis clínica post-parto</b>	<b>Mastitis clínica período de lactancia</b>	<b>Total de casos clínicos</b>
<b>Se-D</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>12/2092</b>
<b>Se-S</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>12/1976</b>

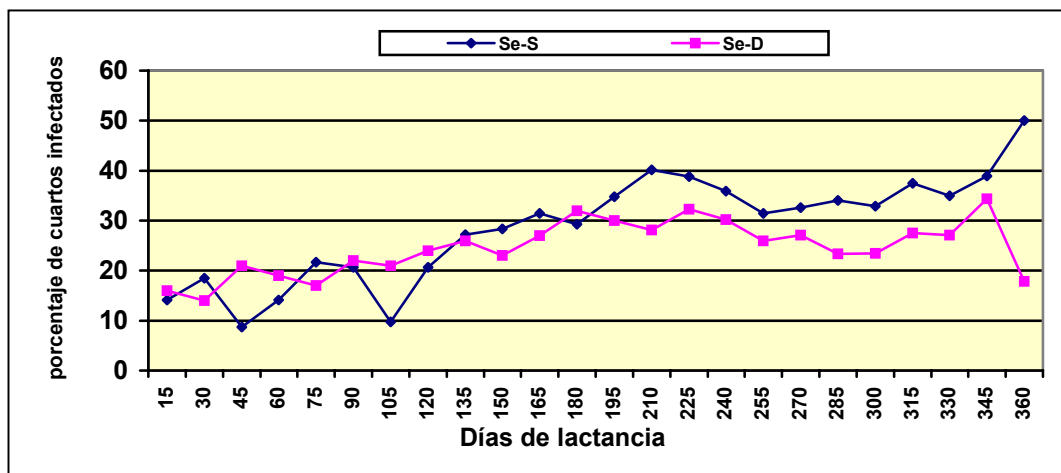
## 5.4 INFECCIÓN INTRAMAMARIA DURANTE LA LACTANCIA

**5.4.1 Prevalencia de infección intramamaria:** los resultados de los exámenes bacteriológicos de muestras duplicadas de leche obtenidas de cuartos mamarios individuales a intervalos quincenales durante todo el período de la lactancia en ambos grupos experimentales demostró que, en promedio, el porcentaje de cuartos mamarios infectados fue de 24,4% en el grupo Se-D y 27,2% en el grupo Se-S, no existiendo diferencias entre ambos grupos experimentales ( $P>0,05$ ) (Anexo 4).

Al analizar los resultados según la etapa de la lactancia, se demostró que al inicio de la lactancia (hasta los 120 días), el grupo de animales Se-S presentó un menor porcentaje promedio de cuartos mamarios infectados (16,0%) comparado con el grupo Se-D (19,0%) ( $P>0,05$ ) (Cuadro 4, Gráfico 6). Sin embargo, tanto en la lactancia media (121-240 días) como en la lactancia tardía (>240 días), aunque el porcentaje de cuartos mamarios aumentó hacia el término de la lactancia en ambos grupos experimentales, siempre la prevalencia de infección fue mayor en el grupo de animales Se-S.

**Cuadro 4** Distribución porcentual de cuartos mamarios infectados durante la lactancia en animales Se- D y Se-S, según etapa de la lactancia.

<b>Etapa de la lactancia (días)</b>	<b>Porcentaje de cuartos mamarios infectados</b>	
	<b>Grupo Se-D</b>	<b>Grupo Se-S</b>
<b>Inicial (1-120)</b>	19,2	16,0
<b>Media (121-240)</b>	28,5	33,1
<b>Tardía (241-360)</b>	25,8	36,5



**Gráfico 6** Porcentaje de cuartos mamarios infectados en vacas Se-D y Se-S en selenio durante 360 días de lactancia

**5.4.2 Etiología de las infecciones intramamarias:** tanto en el grupo Se-D como en el grupo Se-S los patógenos mamarios aislados con mayor frecuencia a través de toda la lactancia fueron *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Staphylococcus aureus*, representando, respectivamente, el 49,6%, 22,2% y 20,6% del total de aislamientos en el grupo Se-D y el 53,7%, 22,9% y 16,2% en el grupo Se-S (Cuadro 5).

**Cuadro 5** Agentes etiológicos aislados de cuartos mamarios durante la lactancia en vacas Se-D y Se-S.

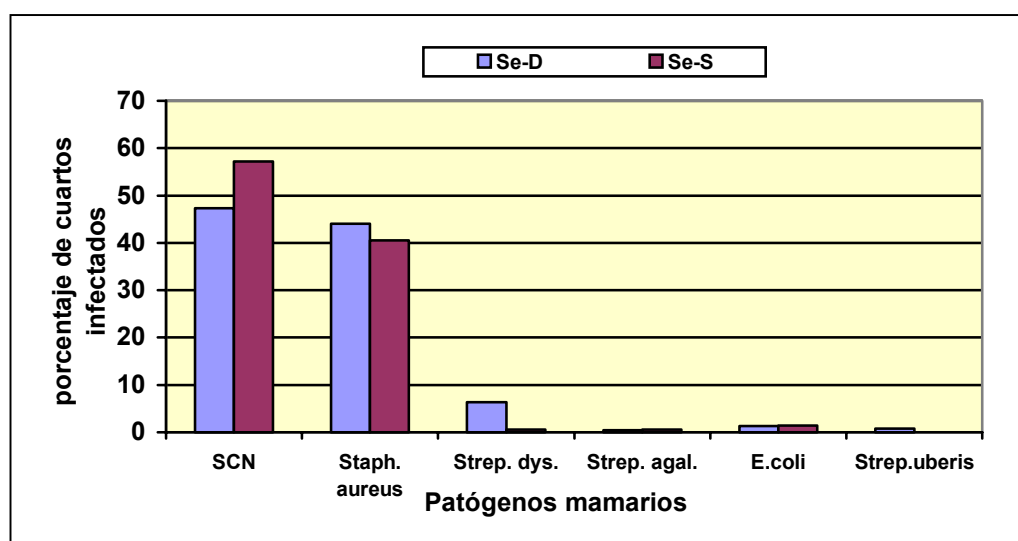
Agente etiológico	Grupo Se-S		Grupo Se-D	
	N°	%	N°	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	289	53,7	253	49,6
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	123	22,9	113	22,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	87	16,2	105	20,6
<i>Streptococcus spp.</i>	17	3,2	10	2,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0,2	15	3,0
<i>Corynebacterium spp.</i>	5	0,9	2	0,4
<i>Bacillus spp.</i>	5	0,9	1	0,2
<i>Streptococcus bovis</i>	4	0,7	1	0,2
<i>Escherichia coli</i>	3	0,6	3	0,5
<i>Staphylococcus coagulasa positivo</i>	3	0,6	1	0,2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,2	1	0,2
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0,0	2	0,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,0	1	0,2
<i>Actinomyces spp.</i>	0	0,0	1	0,2
<i>Levadura</i>	0	0,0	1	0,2
<b>TOTAL</b>	<b>538</b>	<b>100 %</b>	<b>510</b>	<b>100 %</b>



Al considerar sólo las infecciones intramamarias causadas por patógenos mayores, en ambos grupos experimentales los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron: *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Staphylococcus aureus*, siendo el primero más prevalente en el grupo Se-S (57,2%) que en los animales Se-D (47,3%) (Cuadro 6, Gráfico 7).

**Cuadro 6** Frecuencia de aislamiento de patógenos mayores de cuartos mamarios infectados durante la lactancia en vacas Se-D y Se-S.

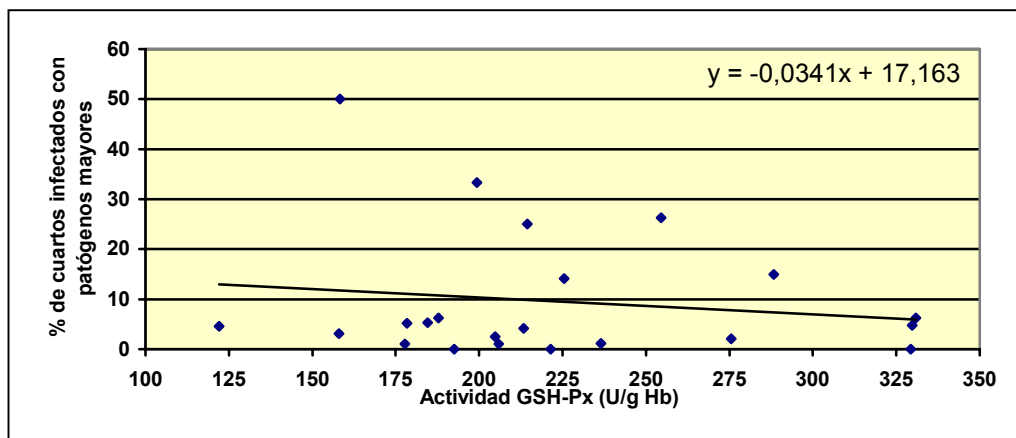
Patógeno mamario	Grupo Se-D		Grupo Se-S	
	n°	%	n°	%
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	113	47,3	123	57,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	105	44,0	87	40,5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	15	6,3	1	0,5
<i>Escherichia coli</i>	3	1,3	3	1,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,4	1	0,5
<i>Streptococcus uberis</i>	2	0,8	0	0,0
<b>Total</b>	<b>239</b>	<b>100</b>	<b>215</b>	<b>100</b>



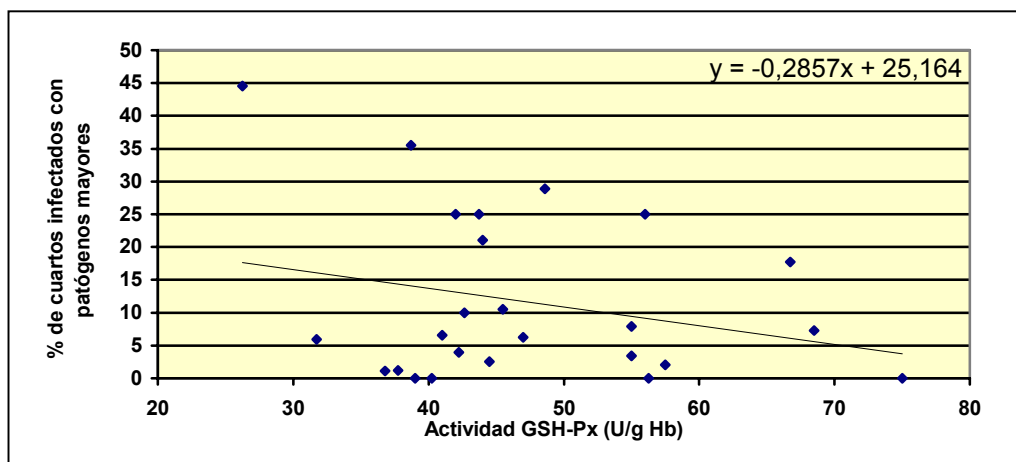
**Gráfico 7** Porcentaje de cuartos mamarios infectados por patógenos mamarios mayores aislados durante la lactancia en vacas Se-D y Se-S.

Al analizar la correlación entre los cuartos mamarios infectados con patógenos mayores y los niveles sanguíneos de GSH-Px se demostró que mientras mayor es el nivel sanguíneo de GSH-Px; menor es el porcentaje de cuartos mamarios infectados tanto en el

grupo Se-D ( $r = -0,068$ ) como en el grupo Se-S ( $r = -0,0023$ ) sin significancia entre ambos grupos ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 8 y Gráfico 9).

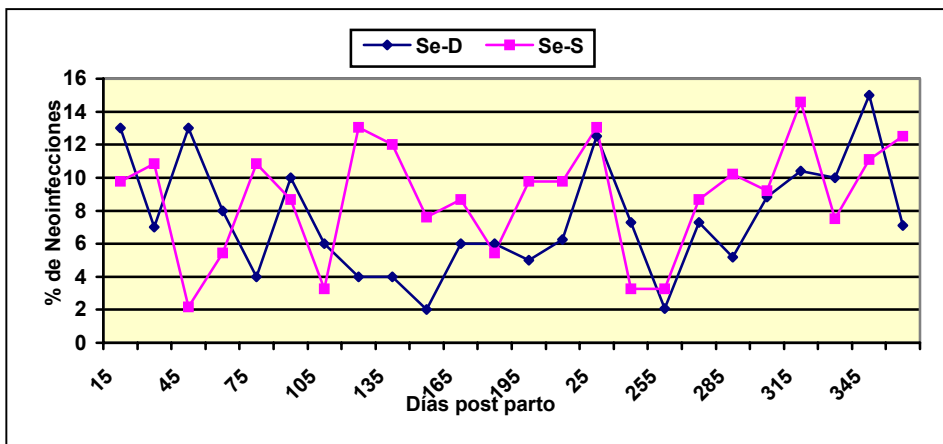


**Gráfico 8** Recta de regresión entre el porcentaje de cuartos mamarios infectados con patógenos mayores y la actividad sanguínea de GSH-Px en vacas Se-S.



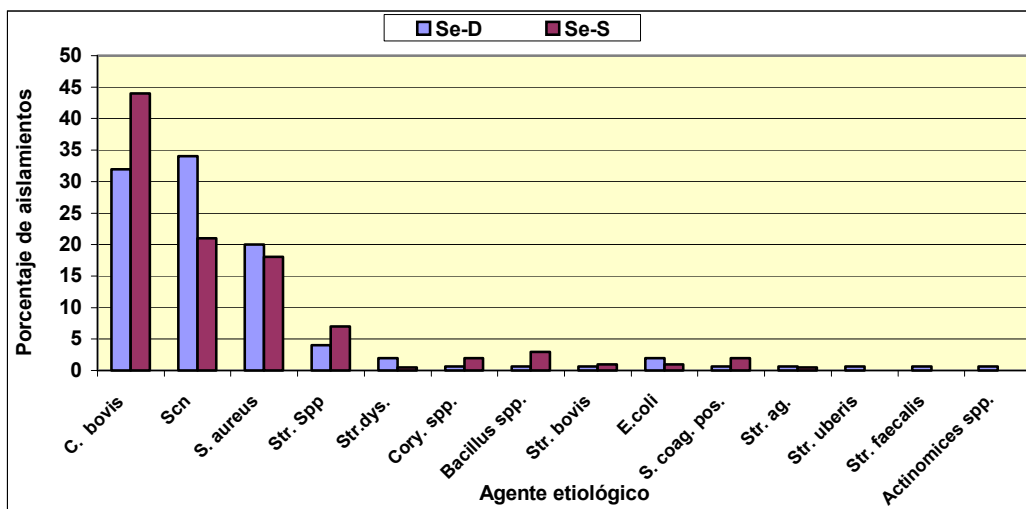
**Gráfico 9** Recta de regresión entre el porcentaje de cuartos mamarios infectados con patógenos mayores y la actividad sanguínea de GSH-Px en vacas Se-D.

**5.4.3 Tasa de neoinfección intramamaria:** la tasa de neoinfección intramamaria durante los 360 días de lactancia fue de un 8,0% en el grupo de vacas Se-D y de un 8,8% en el grupo Se-S ( $P > 0,05$ ) (Anexo 5). La tasa de neoinfección intramamaria en los diferentes intervalos de muestreo a través de la lactancia no presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ambos grupos de animales (Gráfico 10).



**Gráfico 10** Porcentaje de neoinfecciones intramamarias en vacas Se-S y Se-D en selenio durante 360 días de lactancia

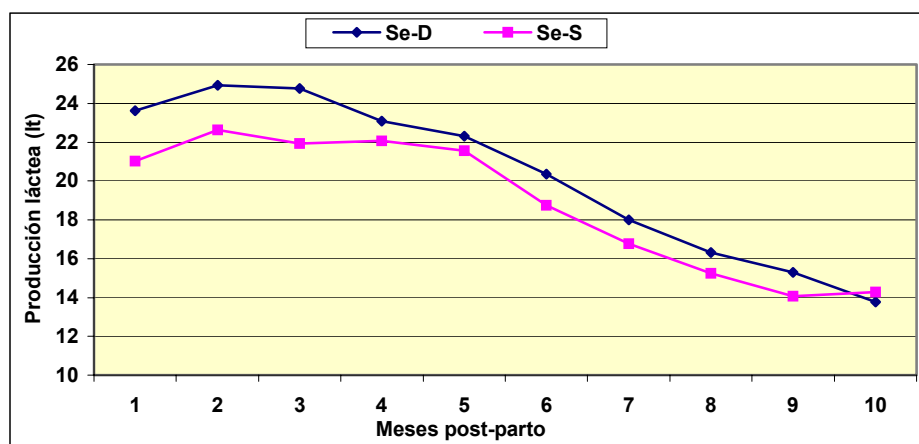
**5.4.4 Etiología de las neoinfecciones intramamarias:** los agentes etiológicos responsables del mayor número de neoinfecciones intramamarias en ambos grupos experimentales fueron *Corynebacterium bovis* (44,0% y 32,0%), *Staphylococcus coagulasa negativo* (21,0% y 34,0%) y *Staphylococcus aureus* (18,0% y 20,0%); El primero fue más frecuente en los animales selenio suplementados, mientras que las infecciones estafilocócicas fueron más frecuentes en los animales selenio deficientes ( $P>0,05$ ) (Anexo 6, Gráfico 11).



**Gráfico 11** Agentes etiológicos causantes de neoinfecciones intramamarias en vacas Se-S y Se-D durante la etapa experimental.

## 5.5 PRODUCCIÓN DE LECHE

El control mensual de la producción láctea a través de toda la lactancia en ambos grupos experimentales demostró que no existe diferencias entre animales Se-D y Se-S ( $P>0,05$ ), siendo la producción promedio levemente superior en el grupo de animales selenio deficientes (20,2 lt/vaca v/s 18,8 lt/vaca) (Anexo 7, Gráfico 12).



**Gráfico 12** Producción mensual promedio de leche en vacas Se-S y Se-D (lt/vaca/mes).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 ACTIVIDAD SANGUINEA DE GSH-Px

La prevención de la mastitis es un trabajo complejo, llevándose a cabo numerosas investigaciones con el fin de aumentar la capacidad de defensa de la glándula mamaria frente a las infecciones bacterianas, ya que si bien se ha aumentado la capacidad de producción lechera, no ha ocurrido lo mismo con el sistema defensivo glandular (Zurich, 2001).

Actualmente se sabe que el selenio (Se) cumple un rol protector en la defensa de la glándula mamaria, ya que activa la enzima GSH-Px que tiene por función destruir los peróxidos de hidrógeno, evitando con ello daños estructurales y funcionales a las células; por ello el conocimiento del balance nutricional de los minerales, entre ellos el Se, permite monitorear si los animales presentan balances deficitarios, adecuados o excesivos, y con ello realizar medidas correctivas en la dieta (Wittwer, 1997).

La determinación del Se en los animales se realiza indirectamente a través de los niveles sanguíneos de GSH-Px, siendo una medida útil para evaluar el estado metabólico nutricional de Se. En Chile, en rebaños de la Novena y Décima región se han encontrado valores de correlación entre 0,76 y 0,97 ( $P < 0,05$ ) (Ceballos, 1997; Wittwer y col, 1997), reflejando una alta correlación entre la actividad de GSH-Px y los niveles sanguíneos de Se. Adicionalmente, trabajos de Wittwer (1997); Ceballos y col. (1998) y Araneda (2000) han demostrado una deficiencia de este mineral en suelo, forrajes y animales de estas zonas.

Por otra parte, la concentración de este mineral en la sangre responde en gran medida a los cambios en los niveles de consumo por parte del animal (Levander, 1987), o a una suplementación con Se, como la realizada en este estudio, donde la actividad antioxidante evaluada a través de la enzima GSH-Px manifestó una diferencia significativa sólo después de la suplementación con selenato de bario en comparación a los animales que no recibieron suplementación.

Resultados similares han sido obtenidos por otros autores que demuestran que la suplementación con selenato de bario aumenta la actividad de la enzima GSH-Px a los 30-45 días post-suplementación (Levander, 1987; Weiss y col., 1990; Coe y col., 1993; Retamal, 1999; Street, 2000; Mella, 2001); sin embargo, en el presente estudio la actividad de la enzima GSH-Px se presentó aumentada a los 90 días post suplementación (primer muestreo), lo que

no significa que no haya ocurrido antes (Gráfico 1). La actividad máxima de GSH-Px en la sangre se obtuvo a los 120 días posterior a la inyección subcutánea con selenato de bario, lo cual indicaría que la respuesta a la suplementación no es inmediata presentando variaciones individuales (D.E.= 124,71). Los valores sanguíneos de GSH-Px se mantuvieron dentro de niveles adecuados (>131 U/g Hb) (Ceballos y Wittwer, 1996) hasta los 270 días de lactancia (último muestreo), respuesta atribuible exclusivamente a la suplementación parenteral con Se, ya que la alimentación de todos los animales era deficiente en este mineral durante todo el período experimental.

Estos resultados permiten concluir que los niveles sanguíneos de GSH-Px en animales suplementados con selenato de bario perduran por períodos prolongados de tiempo, constituyendo una buena alternativa para ser utilizado como método de suplementación. Wittwer y col., (2001) han demostrado que la actividad sanguínea de GSH-Px se mantiene en niveles adecuados, incluso hasta 1,5 años post suplementación con selenato de bario, a diferencia de lo que ocurre con el selenito de sodio, el producto más utilizado, pero de efecto menos prolongado (Oblitas, 1997; Wittwer, 1997).

## **6.2 INCIDENCIA DE MASTITIS CLINICA**

El selenio ha sido considerado un elemento importante en los mecanismos defensivos de la glándula mamaria contra las infecciones (Smith y col., 1984; Weiss y col., 1990; Philpot y Nickerson, 1991) y su deficiencia predispone a cuadros de mastitis (Boyne y Arthur, 1979; Smith y col., 1984; Ropstad y col., 1987).

La incidencia de mastitis clínica tanto en el período post-parto como durante la lactancia en este estudio fue muy escasa en ambos grupos, totalizando 12 casos para cada grupo experimental; en consecuencia, no fue posible comparar estos resultados con otras investigaciones en las cuales se ha demostrado que la incidencia de mastitis clínica es menor en animales selenio suplementados comparado con animales deficientes (Weiss y col., 1990); sin embargo es importante mencionar que la suplementación con Se no siempre disminuye la incidencia de los casos clínicos, aunque si disminuye la severidad de los signos clínicos; es importante destacar, sin embargo, que este efecto protector no sólo es consecuencia de la participación del Se sino, además, de la vitamina E (Smith y col., 1984).

Aunque se ha demostrado que la vitamina E también tiene un efecto beneficioso sobre la salud de la glándula mamaria, investigaciones realizadas por Batra y col. (1992) demostraron que la suplementación solo con vitamina E no tiene efecto sobre la salud de la glándula mamaria en animales con concentraciones séricas bajas de selenio; esto indicaría que tanto la vitamina E como el Se actuarían en forma conjunta a través de la enzima GSH-Px

cumpliendo la misma función, y la suplementación con ambas substancias sería más benéfico que la administración de ellas por separado (Putnam y Comben 1987).

### 6.3 RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

El recuento electrónico de células somáticas es sin duda el método más utilizado en todos los países para evaluar el grado de inflamación de la glándula mamaria tanto en muestras de vacas individuales como en muestras de leche de estanque (FIL/IDF, 1991; Both, 1998). Este método fue introducido en Chile en 1994 y actualmente es utilizado por todas las plantas lecheras en los esquemas de pago por calidad (Kruze, 2000; Kruze, 2002).

En consecuencia, este fue el método utilizado en el presente estudio para evaluar la respuesta de la glándula mamaria frente a la suplementación con Se. Varios estudios han demostrado que los recuentos de células somáticas aumentan a medida que transcurre la lactancia en los animales con deficiencia de Se (Smith y col., 1984). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no son concluyentes, ya que a pesar que el promedio de RCS fue mayor en los animales deficientes en Se, esta diferencia no fue significativa (Anexo 3). Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos por Kruze y col. (2000), quienes utilizando el mismo procedimiento de suplementación en un rebaño experimentalmente infectado con *Staphylococcus aureus*, obtuvieron un significativo aumento de los RCS en los animales Se-D comparado con el grupo Se-S.

Es probable que existan otros factores que influyeran o enmascaren el efecto del Se sobre el RCS, entre los cuales es importante mencionar la vitamina E (Smith y col., 1984; Smith y col., 1988). Otro factor que influye notablemente el RCS en la leche es la presencia de infecciones crónicas, especialmente las causadas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. En ambos grupos experimentales del presente estudio existían animales con infecciones crónicas con recuentos celulares elevados y persistentes durante gran parte de la lactancia (Anexo 14 y Anexo 15), sobre los cuales la suplementación con Se no tendría efecto notorio, debido a que en estos cuartos mamarios la irrigación sanguínea y la quimiotaxis leucocitaria estarían disminuidas, ya que el tejido noble de la glándula mamaria se encuentra fibrosado.

El recuento celular es una medida indirecta para evaluar la reacción inflamatoria dentro del tejido mamario de las vacas en un rebaño (Coe y col., 1993; Booth, 1998) y es generalmente aceptado que los recuentos celulares en las vacas libres de infecciones intramamarias sean <200.000 céls./ml y que la mayoría tienen, en la mayor parte de la lactancia recuentos <100.000 céls./ml (Booth, 1998). Los resultados obtenidos en este estudio confirman estas conclusiones ya que el 60% de las vacas del grupo Se-S y el 56% del grupo Se-D tuvieron recuentos celulares <100.000 céls/ml (Anexo 3).

Los resultados obtenidos indican que no existe una relación entre RCS y niveles sanguíneos de GSH-Px ( $P>0,05$ ), sugiriendo que en condiciones naturales de manejo, una mayor actividad de esta enzima no necesariamente disminuiría los niveles de los recuentos celulares, lo cual también fue descrito por Oblitas (1997), en un ensayo similar realizado en el sur de Chile. Estos resultados contrastan con trabajos de otros autores (Coe y col., 1993; Wichtel y col., 1994) quienes han encontrado diferencias significativas entre animales Se-D y Se-S.

En general, la falta de correlación entre la actividad sanguínea de GSH-Px y RCS pueden ser explicado, en parte, por la alta variabilidad de los recuentos celulares individuales de los animales que integraron ambos grupos, por lo que no fue posible establecer estadísticamente una correlación favorable entre GSH-Px y RCS, asimismo otra explicación a estos resultados es que los recuentos celulares pueden ser influenciados por el tipo de patógeno, estado de la lactancia, traumas y estrés (Booth, 1998).

#### **6.4 TASA DE NEOINFECCION INTRAMAMARIA**

Los mecanismos defensivos inespecíficos de la glándula mamaria constituyen una barrera importante contra las infecciones bacterianas, especialmente, la barrera leucocitaria. Está ampliamente demostrado que la deficiencia nutricional de selenio afecta negativamente la función de los neutrófilos, principal representante de la barrera leucocitaria (Boyne y Arthur, 1979). En efecto, se ha demostrado que los neutrófilos de animales con deficiencia nutricional de Se tienen menor poder fagocítico y bactericida aunque no afecta su viabilidad (Gerloff, 1992; Mella 2001); además este efecto negativo sobre los neutrófilos varía con el tipo de patógeno causante de la infección (Gerloff, 1992; Jukola, 1996).

Estos antecedentes podrían explicar, en parte, porqué en el presente estudio *C. bovis* fue aislado con mayor frecuencia en los animales Se-D (Cuadro 5), ya que según Jukola, (1996) se requerirían niveles más elevados de Se para prevenir infecciones causadas por *Corynebacterium spp.*, que para prevenir infecciones causadas por *S. aureus* y SCN.

La suplementación con Se no tuvo un efecto significativo sobre la tasa de neoinfección intramamaria ya que, aunque el porcentaje de cuartos mamarios infectados fue menor en los animales Se-S durante el primer tercio de la lactancia (Cuadro 4), esta diferencia no fue significativa respecto a los animales Se-D ( $P>0,05$ ). Estos resultados difieren con los obtenidos por otros autores quienes han demostrado que los animales Se-S tienen una menor tasa de neoinfección causadas tanto por los patógenos mayores como por los patógenos menores (Smith y col., 1985; Smith y col., 1988 Erskine y col., 1987).



Los patógenos contagiosos (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) fueron los principales agentes etiológicos aislados en cuartos mamarios infectados en ambos grupos experimentales, con una frecuencia levemente superior en los animales Se-D (Cuadro 12); esto demuestra una vez mas, que bajo las condiciones naturales de manejo la suplementación con Se no tuvo un efecto importante para prevenir las neoinfecciones de la glándula mamaria. El patógeno aislado con mayor frecuencia a través de toda la lactancia fue *C. bovis* (Cuadro 12), debido a la existencia de infecciones crónicas de larga duración; este resultado podría explicarse por deficiencias en la práctica del *dipping* ya que este microorganismo coloniza fácilmente el conducto del pezón siendo eliminado en forma eficiente por el *dipping* post ordeña cuando se aplica en forma correcta y con un producto desinfectante probadamente eficaz (Philpot y Nickerson, 1991).

## 6.5 PRODUCCIÓN DE LECHE

La producción de leche está directamente influenciada por la salud general del animal y por la salud de la glándula mamaria (Smith y col., 1984); aunque la literatura señala que la suplementación con selenio desempeña un papel en la mayor producción láctea (Fraser y col., 1987), la curva de producción de leche obtenida en este estudio no se vio incrementada en el grupo suplementado (Anexo 12, Anexo 13), resultados similares han sido reportados por otros investigadores (Coe y col., 1993), y es probable que la suplementación con Se tenga un efecto mas favorable sobre parámetros de calidad mas que la cantidad de leche producida (Mella, 2001).

## 6.6 CONCLUSIONES

1. El pastoreo en praderas deficientes en selenio mantuvo la actividad sanguínea de GSH-Px dentro de valores considerados como deficientes.
2. La suplementación con selenio (1mg Se/Kg/Pv) aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) la actividad de la enzima GSH-Px en el parto en relación al periodo de lactancia y se mantuvo dentro del rango considerado adecuado, durante todo el periodo de estudio.
3. En las vacas deficientes en selenio no se observó un mayor RCS, tasa de neoinfección intramamaria ni producción de leche con relación a las vacas suplementadas con selenio.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ARANEDA, P. 2000.** Balance metabólico nutricional en bovinos lecheros de 12 predios de la IX Región de la Araucanía. Tesis, Licenciatura en Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile. pp 61.
- BABIOR, B. M. 1984.** The respiratory burst of phagocytes. *J.Clin.Invest.* **73**: 599-601.
- BOOTH, J. 1998.** Recuento de células somáticas como indicador de mastitis. Control de Mastitis y Calidad de Leche. 2<sup>da</sup> Jornada Conamascal. Osorno. Chile, pp.13-18.
- BATRA, T. R.; M. HIDIROGLOU; W. S. SMITH. 1992.** Effect of vitamin E on incidence of mastitis in dairy cattle. *Can.J.Anim.Sci.* **67**: 775-788.
- BOYNE, R; J. R. ARTHUR. 1979.** Alterations of neutrophil function in selenium deficient cattle. *J.Comp. Pathol.* **89**: 151-158.
- CEBALLOS, A. 1997.** Evaluación del estado nutricional antioxidante. **En:** Curso-seminario Antioxidantes en Nutrición y Salud Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp 48.
- CEBALLOS, A.; F. WITWER. 1996.** Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* **28**:5-18.
- CEBALLOS, A.; F. WITWER; P. A CONTRERAS; H. BÖHMWALD. 1998.** Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. *Arch. Med. Vet.* **30**: 13-22
- CEBALLOS, A.; F. G. WITWER; P. A. CONTRERAS; E. QUIROZ; H. L. BÖHMWALD. 1999.** Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq. Agropec. Bras . Brasilia* **34**:2331-2338.

- CHIHUAILAF, R. 2002.** Efecto de una ración seleno deficiente y la suplementación con selenio en la capacidad antioxidante e intensidad de daño por estrés oxidativo en bovinos. Tesis M. Sc., Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. pp 116.
- COE, P.; J. MAAS; J. REYNOLDS; I. GARDNER. 1993:** Randomized field trial to determine the effects of oral selenium supplementation on milk production and reproductive performance of Holstein heifers. *J.Amer.Vet.Med.Ass.***202:**875-881.
- COWAN, S. T. 1974.** Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria, 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, London England. pp 238
- ERSKINE, R.J.; R. J. EBERHART; L. H. HUTCHINSON; R. W. SCHOLZ. 1987.** Blood selenium concentration and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* **190:** 1417-1421
- FIL/IDF. 1991.** Mastitis Control. (Results of Questionnaire 1889/A). International Dairy Federation Bull 226. Brussels, Belgium. pp 15-21.
- FRASER, A. J.; T. J. RYAN; R. A. SPROULE; R.G. CLARK; D. C. ANDERSON ; E. O. PEDERSON. 1987.** The effect of selenium supplementation on milk production in dairy cattle. *Proc. of the New Zealand Society of Animal Production.* pp. 61-64.
- GERLOFF, B. 1992.** Effect of selenium on dairy cattle. *J. Anim. Sci.* **70:**3934-3940.
- GIESECKE; W. H.; J. H. DU PREEZ; L. M. PETZER. 1994.** Practical mastitis control in dairy herds. Butterworth publishers (Pty) Ltd. Cape Town, South Africa.p.317.
- GRASSO, P. J.; R. W. SCHOLZ; R. J. EBERHART; R. J. ERSKINE. 1987.** Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of mammary neutrophils from selenium-supplemented and selenium-deficient dairy cows (Abstr). *J.Dairy Sci.* **70 (Suppl. 1):** 166-167.
- GRASSO, P. J.; R. W. SHOLZ; R. J. ERSKINE; R. J. EBERHART. 1990.** Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. *Am. J. Vet. Res.***51:** 269-274

**HARMON, R. J.; R. J. EBERHART; D. E. JASPER; BE. LANGLOIS; R. A. WILSON. 1990.** Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 3<sup>rd</sup> ed., National Mastitis Council, Inc., Arlington, VA., USA, pp,34.

**INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1981.** Laboratory methods for use in mastitis work FIL/IDF Bull., doc. 132. Brussels , Belgium. pp 27.

**JUKOLA, E. ; J. HAKKARAINEN; H. SALONIEMI; S. SANKARI. 1996.** Blood selenium, Vitamin E, Vitamin A, and b- carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *J. Dairy Sci.* **79**:838-845

**KRUZE. J. 1992a.** Definición y clasificación de la mastitis. *Rev. Holstein Chile.* **33**: 22-23.

**KRUZE. J. 1992b.** Etiología y epidemiología de la mastitis. *Rev. Holstein Chile.* **34**: 14-15.

**KRUZE. J. 1992c.** Pérdidas económicas por mastitis. *Rev. Holstein Chile.***40**: 27-28.

**KRUZE. J. 2000.** Milk Quality in Chile: Progress towards reducing SCC and TBC in raw milk during the last twenty years. *Proc. Pacific Congress on Milk Quality and Mastitis Control*, Nagano, Japan. pp. 113-120.

**KRUZE, J. 2002.** Major factors influencing the improvement of bacteriological quality of raw milk in Chile. *Proc. 2<sup>nd</sup> Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control*, Ribeirao Preto, Brazil. p. 56.

**KRUZE, J.; A. MELLA; P. CONTRERAS; V. LEYAN; R. MATAMOROS; F. WITWER. 2000.** Experimental *Staph. aureus* mastitis in selenium-deficient and selenium-supplemented dairy cows. *Proc. Pacific Congress on Milk Quality and Mastitis Control*, Nagano, Japan. p. 614.

**LEVANDER. 1987.** Trace elements in human and animal nutrition. 5<sup>th</sup> ed. Walter Mertz (Eds.). San Diego. V. 2. pp. 209-279.

- LOPEZ ALONSO, M.; M. MIRANDA; J. HERNANDEZ; C. CASTILLO; J. L. BENEDITO. 1997.** Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.***29**:171-180.
- MACFADDIN, J. 1982.** Biochemical Tests in Identification of Medical Bacteria. 2<sup>nd</sup> ed., Williams and Wilkins, London, UK pp. 257.
- MACKINTOSH, C. G.; J. GILL; K. TURNER. 1989.** Selenium supplementation of young red deer (*cervus elephus* ), *N. Z. Vet. J.* **37**:143 – 145.
- MELLA, A. 2001.** Efectos de la deficiencia de selenio sobre los mecanismos de defensa inespecíficos de la glándula mamaria de vacas lactantes. Seminario de Titulación y Licenciatura en Tecnología Médica, Universidad Austral de Chile, Facultad de Medicina, Valdivia, Chile. pp 52.
- MILLER, J. K.; E. BRZEZINSKA - SLEBODZINSKA; F.C. MADSEN. 1993.** Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J.Dairy Sci.* **76**:2812-2823 .
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 2001.** Nutrient requirements of dairy cattle 7<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington, D.C..U.S.A . pp 381.
- NDIWENI, N.; J. M. FINCH. 1996.** Effects of in vitro supplementation with  $\alpha$ -tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions:implication for resistance to mastitis. *Vet. Immunol. Immunopat.* **51**: 67-78.
- OBLITAS, F. 1997.** Evaluación de la suplementación con selenio en los bovinos lecheros a pastoreo. Tesis M. Sc., Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. pp 115.
- PHILPOT, W. N.; S. C. NICKERSON. 1991.** Mastitis: Counter attack. A strategy to combat mastitis. Babson Bros., Naperville, Illinois, USA. pp. 150.
- PUTNAM, M. E.; N. COMBEN. 1987.** *Vitamin E.* *Vet. Rec.* **121**: 541-545.

- RETAMAL, F. 1999.** Evaluación de la suplementación con bolos intraruminales de selenio en vaquillas a pastoreo. Tesis, Licenciatura en Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile. pp. 40.
- ROPSTAD, E.; G. OVERNES; A. REFSDAL. 1987.** Selenium levels in Norwegian dairy herds related to reproductive and health performance. *Acta Agric. Scand.* **37**: 397-405 (Abstr.).
- ROTRUCK, J. T.; A. L. POPE; H. E. GANTHER; A. B. SWANSON; D. G. HAFEMAN; W. G. HOEKSTRA. 1973.** Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* **179**: 588-590.
- SANDHOLM, M. 1995.** Inflammation in mastitis. En: **M. SANDHOLM; T. HOKANEN-BUZALSKI; L. KAARTINEN y S. PYÖRÄLÄ.** The Bovine Udder and Mastitis. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Helsinki, Finland. p 59-75.
- SMITH, K. L.; J. S. HOGAN; H.R. CONRAD. 1988.** Selenium in dairy cattle: its role in disease resistance. *Food Anim. Pract. vet. Med. Jan.* :72-78.
- SMITH, K. L. ; H. R. CONRAD.; B. AMIET; D. A. TODHUNTER. 1985.** Incidence of environmental mastitis as influenced by dietary vitamin E and Selenium. *En*: Seminar IDF "Progress in the Control of Bovine mastitis". Kiel. Alemania. pp 482-486.
- SMITH, K. L.; J. H. HARRISON; D. D. HANCOCK; D. A. TODHUNTER; H. R. CONRAD. 1984.** Effect of vitamin E and selenium dietary supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J.Dairy Sci.* **67**: 1293-1300.
- STADTMAN, T. C. 1990.** Selenium biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **59**:111-127.
- STREET, E. 2000.** Efecto de una dieta deficiente en selenio sobre la capacidad antioxidante y la magnitud del daño producido por el estrés oxidativo en vacas frisón negro. Tesis, Licenciatura en Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile. pp 30.

- WEISS, W. P.; J. S. HOGAN; K. L. SMITH; K. H. HOBLET. 1990.** Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in comercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* **73**: 381-390.
- WEATLEY, L. E.; F. G. BECK. 1988.** The influence of season and husbandry on the selenium status of sheep in a deficient area. *Br. Vet. J.* **144**: 246-251.
- WICHTEL, J.; A. L. CRAIGIE; D. A. FREEAN; H. VARELA ALVAREZ; N. B. WILLIAMSON. 1994.** Effect of selenium and iodine supplementation on growth rate and on thyroid and somatotropic function in dairy calves at pastures. *J. Dairy Sci.* **79**:1865-1872.
- WITTWER, F. 1997.** Antecedentes del balance nutricional del selenio en Chile y su suplementación en el ganado. **En:** Curso-seminario Antioxidantes en Nutrición y Salud Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. pp. 48.
- WITTWER, F.; A. CEBALLOS; P. A. CONTRERAS; H. BÖHMWALD. 1997.** Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en bovinos a pastoreo y correlación con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. **En:** XXII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Valdivia, Chile. pp. 241.
- WITTWER, F.; P. A. CONTRERAS; R. MATAMOROS; J. KRUZE; V. LEYÁN; H. BÖHMWALD. 2001.** Erythrocyte glutathione peroxidase response to selenium supplementation using selenium selenite, barium selenate or selenium intraruminal bullets in grazing cattle. X International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Parma, Italy, pp. 266-267.
- ZURICH, L.; 2001.** Mastitis séptica bovina: Prevención y futuro. *Rev. Lechería* **10**: 11.

## **8. ANEXOS**



**Anexo 1** Valores promedios de la actividad sanguínea de GSH-Px (U/g Hb) desde los 60 días pre-parto hasta los 270 días de lactancia en los grupo Se-S y Se-D.

Días de lactancia	Grupo Se-S	Grupo Se-D
60 días preparto	49,14	53,56
30	168,40 *	38,16
90	293,95 *	52,20
180	212,86 *	51,20
270	213,50 *	48,42
<b>media (lactancia)</b>	<b>222,18 *</b>	<b>47,50</b>

\* (P<0,05)

**Anexo 2** Promedios mensuales de recuento de células somáticas y estimación logarítmica en vacas Se-D y Se-S durante 285 días de lactancia.

	RCS	Días post parto										Media
		15	45	75	105	135	165	195	225	255	285	
Se-D	(Céls/ml) x 1000	317.0	203.4	636.8	290.3	635.8	195.0	571.8	511.3	367.0	552.7	428.11
	log <sub>10</sub>	5,50	5,31	5,80	5,46	5,80	5,29	5,76	5,71	5,56	5,74	
Se-S	(Céls/ml) x 1000	59.2	229.8	172.4	266.4	433.0	176.6	411.6	288.5	498.2	600.6	313.63
	log <sub>10</sub>	4,77	5,36	5,24	5,43	5,64	5,25	5,61	5,46	5,70	5,78	

**Anexo 3** Distribución porcentual de vacas Se-D y Se-S por rangos de contenidos de células somáticas a través de toda la lactancia.

RCS (X10 <sup>3</sup> )	DÍAS DE LACTANCIA										
	grupo Se-S										media
	15	45	75	105	135	165	195	225	255	285	
< 100	90	77	74	69	44	65	52	39	52	35	59,7%
100-250	5	5	9	9	30	17	22	30	26	35	18,8%
>250	5	18	17	22	26	18	26	31	22	30	21,5%
	grupo Se-D										
< 100	76	60	56	52	44	60	56	50	50	55	55,9%
100-250	12	16	16	16	24	12	8	13	21	15	15,3%
>250	12	24	28	32	32	28	36	37	29	30	28,8%

**Anexo 4** Porcentaje de cuartos mamarios infectados a través de toda la lactancia en vacSe-D y Se-S.

<b>Días de lactancia</b>	<b>Se-S</b>	<b>Se-D</b>
<b>15</b>	14,1	16,0
<b>30</b>	18,5	14,0
<b>45</b>	8,7	21,0
<b>60</b>	14,1	19,0
<b>75</b>	21,7	17,0
<b>90</b>	20,7	22,0
<b>105</b>	9,8	21,0
<b>120</b>	20,7	24,0
<b>135</b>	27,2	26,0
<b>150</b>	28,3	23,0
<b>165</b>	31,5	27,0
<b>180</b>	29,3	32,0
<b>195</b>	34,8	30,0
<b>210</b>	40,2	28,1
<b>225</b>	38,0	32,3
<b>240</b>	35,9	30,2
<b>255</b>	31,5	26,0
<b>270</b>	32,6	27,1
<b>285</b>	34,1	23,4
<b>300</b>	32,9	23,5
<b>315</b>	37,5	27,5
<b>330</b>	35,0	27,1
<b>345</b>	38,9	34,4
<b>360</b>	50,0	17,9
<b>media</b>	<b>27,2%</b>	<b>24,4%</b>

**Anexo 5** Tasa de neoinfección intramamaria en los grupo Se-D y Se-S durante 360 días de lactancia.

<b>Días de lactancia</b>	<b>Se-S</b>	<b>Se-D</b>
<b>15</b>	9,8	13,0
<b>30</b>	10,9	7,0
<b>45</b>	2,2	13,0
<b>60</b>	5,4	8,0
<b>75</b>	10,9	4,0
<b>90</b>	8,7	10,0
<b>105</b>	3,3	6,0
<b>120</b>	13,0	4,0
<b>135</b>	12,0	4,0
<b>150</b>	7,6	2,0
<b>165</b>	8,7	6,0
<b>180</b>	5,4	6,0
<b>195</b>	9,8	5,0
<b>210</b>	13,0	6,3
<b>225</b>	3,3	12,5
<b>270</b>	3,3	7,3
<b>285</b>	10,2	5,2
<b>300</b>	9,2	8,8
<b>315</b>	14,6	10,4
<b>330</b>	7,5	10,0
<b>345</b>	11,1	15,0
<b>360</b>	12,5	7,1
<b>media</b>	<b>8.8%</b>	<b>8,0%</b>

**Anexo 6** Etiología de las neoinfecciones intramamarias en vacas lactantes Se-D y Se-S.

Etiología	Grupo Se-S		Grupo Se-D	
	N°	%	N°	%
<i>Corynebacterium bovis</i>	74	44,0	49	32,0
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	35	21,0	52	34,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	18,0	30	20,0
<i>Streptococcus spp.</i>	12	7,0	6	4,0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0,5	3	2,0
<i>Corynebacterium spp.</i>	3	2,0	1	0,7
<i>Bacillus spp.</i>	5	3,0	1	0,7
<i>Streptococcus bovis</i>	2	1,0	1	0,7
<i>Escherichia coli</i>	2	1,0	3	2,0
<i>Staphylococcus coagulasa positivo</i>	3	2,0	1	0,7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,5	1	0,7
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0,0	1	0,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,0	1	0,7
<i>Actinomyces spp.</i>	0	0,0	1	0,7
<i>Levadura</i>	0	0,0	1	0,7
<b>TOTAL</b>	<b>168</b>	<b>100%</b>	<b>152</b>	<b>100%</b>

**Anexo 7** Producción mensual promedio de leche en vacas Se-S y Se-D (lt/vaca/mes).

	Meses post parto										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	media
<b>Se-S</b>	21,03	22,36	21,93	22,07	21,57	18,76	16,77	15,24	14,06	14,28	<b>18,81</b>
<b>Se-D</b>	23,63	24,72	24,76	23,08	22,31	20,35	17,99	16,32	15,30	13,78	<b>20,22</b>

**Anexo 8.** Recuento de Células Somáticas en Vacas Se-D (cél./ml x1000).

Vaca n°	Días post parto									
	15	45	75	105	135	165	195	225	255	285
483	701	101	189	257	239	1151	430			
520	5429	1595	3563	1946	7434	71	2935	5911	378	5938
529	15	16	1681	206	306	172	1542	406	1014	39
601	36	23	7940	1203	1075	717	5311	2076	436	2060
602	11	15	26	56	67	61	36	246	70	77
610	26	19	39	83	111	46	61	72	34	130
615	12	9	75	25	24	19	13	16	11	31
624	34	18	22	60	58	14	22	33	39	
628	7	8	62	79	122	40	134	93	39	84
633	29	11	44	97	171	51	76	228	225	269
635	17	9	77	18	18	20	26	58	52	130
657	195	798	494	438	2805	382	899	337	3143	611
661	11	21	72	59	33	27	26	39	63	90
676	13	13	22	50	51	25	31	19	17	37
679	847	950	439	405	676	312	713	489	591	
682	20	4	43	54	57	17	24	81	14	24
691	26	404	108	115	554	23	210	349	149	94
693	20	7	20	52	59	40	49	26	22	47
696	26	278	179	225	307	174	792	480	367	
776	134	325	292	259	62	150	62	128	129	230
784	47	169	129	961	1088	500	376	710	155	607
792	11	9	10	11	54	22	26	35	66	
795	234	140	98	152	232	261	42	96	243	83
799	13	12	17	45	48	30	16	13	39	16
1665	12	131	278	402	244	549	442	330	1511	456
<b>Media</b>	317.0	203.4	636.8	290.3	635.8	195.0	571.8	511.3	367.0	552.7
<b>log. 10</b>	5,50	5,31	5,80	5,46	5,80	5,29	5,76	5,71	5,56	5,74

**Anexo 9.** Recuento de Células Somáticas en Vacas Se-S (cél./ml x1000).

Vaca nº	Días post parto									
	15	45	75	105	135	165	195	225	255	285
<b>180</b>	8	10	32	76	108	31	52	82	116	239
<b>451</b>	19	6	69	41	21	71	37	578	41	149
<b>502</b>	47	11	23	435	59	192	84	30	181	136
<b>510</b>	656	770	1792	3426	4189	1303	5031	748	1001	980
<b>522</b>	24	50	71	44	76	15	105	187	128	299
<b>532</b>	44	454	212	382	243	741	149	127	45	114
<b>541</b>	10	41	70	49	601	58	260	518	108	112
<b>568</b>	47	63	90	24	98	41	162	85	55	243
<b>573</b>	23	5	18	45	50	20	28	13	16	36
<b>579</b>	186	558	333	345	1482	549	493	1441	4158	6263
<b>606</b>	12	-	84	149	25	59	69	104	47	87
<b>614</b>	18	10	20	53	61	42	44	17	30	26
<b>616</b>	9	11	27	46	152	15	33	87	27	83
<b>620</b>	10	3	21	46	147	36	101	195	34	66
<b>651</b>	18	16	19	29	111	28	188	83	43	59
<b>660</b>	45	2760	345	183	955	292	488	424	1861	2425
<b>669</b>	38	67	61	81	166	34	50	153	2223	1139
<b>677</b>	14	7	57	98	136	101	419	738	144	309
<b>680</b>	7	8	75	55	50	19	19	140	179	165
<b>684</b>	39	125	120	60	371	148	96	173	81	227
<b>717</b>	24	24	273	356	790	220	1506	647	899	582
<b>726</b>	46	50	60	23	21	13	23	20	16	33
<b>789</b>	18	6	94	81	146	34	30	45	25	42
<b>Media</b>	59.2	229.8	172.4	266.4	433.0	176.6	411.6	288.5	498.2	600.6
<b>log. 10</b>	4,77	5,36	5,24	5,43	5,64	5,25	5,61	5,46	5,70	5,78

**Anexo 10** Niveles de actividad sanguínea de la enzima GSH-Px (U/g Hb) en vacas Selenio deficiente.

Vaca n°	Días post parto				
	<b>-60</b>	<b>30</b>	<b>90</b>	<b>180</b>	<b>270</b>
<b>483</b>	57	49	51	46	-
<b>520</b>	26	21	17	20	47
<b>529</b>	-	31	43	42	-
<b>601</b>	63	31	59	51	35
<b>602</b>	47	39	44	50	45
<b>610</b>	35	24	47	47	38
<b>615</b>	53	30	42	48	27
<b>624</b>	39	44	38	41	-
<b>628</b>	72	64	111	49	50
<b>633</b>	45	45	64	43	30
<b>635</b>	54	38	44	53	90
<b>657</b>	78	39	48	37	51
<b>661</b>	63	45	55	55	75
<b>676</b>	36	42	43	46	40
<b>679</b>	69	49	44	83	48
<b>682</b>	33	39	46	43	-
<b>691</b>	-	31	32	70	35
<b>693</b>	35	16	69	32	34
<b>696</b>	39	33	36	69	31
<b>776</b>	89	28	33	28	38
<b>784</b>	49	52	54	52	30
<b>792</b>	53	37	45	90	48
<b>795</b>	47	29	100	57	81
<b>799</b>	86	57	89	86	68
<b>1665</b>	64	51	51	42	76
<b>Media</b>	<b>53,56</b>	<b>38,16</b>	<b>52,2</b>	<b>51,2</b>	<b>48,42</b>
<b>D. E.</b>	<b>17,28</b>	<b>11,55</b>	<b>21,08</b>	<b>18,66</b>	<b>18,66</b>

**Anexo 11.** Niveles de actividad sanguínea de la enzima GSH-Px (U/g Hb) en vacas Selenio Suplementadas.

Vaca n°	Días de Parto				
	<b>-60</b>	<b>30</b>	<b>90</b>	<b>180</b>	<b>270</b>
<b>180</b>	24	99	245	194	281
<b>451</b>	57	188	231	235	232
<b>502</b>	22	127	264	210	196
<b>510</b>	38	183	308	309	218
<b>522</b>	85	179	216	159	184
<b>532</b>	64	152	197	192	210
<b>541</b>	-	252	500	319	246
<b>568</b>	31	211	229	173	240
<b>573</b>	63	215	566	287	255
<b>579</b>	-	133	196	164	140
<b>606</b>	60	225	347	268	262
<b>614</b>	28	139	258	155	161
<b>616</b>	32	80	332	212	199
<b>620</b>	26	124	221	258	167
<b>651</b>	70	183	454	301	215
<b>660</b>	41	198	263	210	187
<b>669</b>	35	113	205	103	211
<b>677</b>	54	166	218	184	334
<b>680</b>	24	272	173	148	118
<b>684</b>	188	116	159	81	132
<b>717</b>	7	-	-	-	-
<b>726</b>	32	234	292	201	219
<b>789</b>	51	116	593	320	290
<b>Media</b>	<b>49,14</b>	<b>168,4</b>	<b>293,95</b>	<b>212,86</b>	<b>213,5</b>
<b>D. E.</b>	<b>37,21</b>	<b>11,55</b>	<b>124,71</b>	<b>67,78</b>	<b>53,16</b>



**Anexo 12** Producción promedio mensual de leche en vacas Selenio deficientes (litros).

Vaca n°	Meses de lactancia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
483	29,2	25,0	28,4	26,0	16,6					
520	23,0	24,4	27,4	24,0	21,8	17,0	15,8	20,0	11,6	10,6
529	17,4	21,0	20,6	20,0	21,8	18,4	15,0	13,0	10,6	
601	22,2	26,6	28,4	28,0	22,2	14,6	15,6	18,8	18,0	
602	29,4	29,4	33,0	29,2	28,4	36,0	26,6	21,6	21,8	23,2
610	28,2	28,2	30,0	25,0	23,4	25,6	20,6	20,2	18,0	15,2
615	20,0	30,4	32,8	26,8	29,8	29,0	23,0	19,8	23,4	16,6
624	26,8	26,8	37,0	25,4	23,4	21,6	23,2	14,8	13,0	12,4
628	23,8	24,0	33,0	33,8	37,0	30,2	30,2	27,0	22,8	22,0
633	22,0	22,0	17,4	17,6	18,0	19,4	15,4	9,0	10,0	11,2
635	25,2	26,0	25,0	18,8	22,6	18,4	16,4	11,4		
657	21,0	24,8	27,0	22,4	16,0	16,0	16,4	17,0	16,0	15,4
661	20,8	26,0	21,2	29,0	24,0	21,4	17,0	13,6	18,6	15,0
676	20,2	22,2	24,0	25,4	27,2	20,0	20,0	20,4	19,4	5,8
679	27,6	28,8	20,8	20,4	23,4	17,4	15,2			
682	22,2	22,2	21,6	21,0	23,4	23,8	21,6	18,0	16,0	15,4
691	27,4	28,0	21,8	23,0	23,0	22,2	17,8	17,0	18,0	14,6
693	19,2	16,4	17,8	19,2	17,6	16,6	16,0	15,2	13,4	
696	28,2	27,4	20,6	21,2	22,0	15,6	13,8	13,0	14,6	
776	23,6	27,8	28,6	21,2	20,0	18,0	15,6	12,0	9,6	7,2
784	17,8	21,8	19,4	17,6	16,4	16,0	14,2	13,6		
792	21,6	23,4	14,8	16,6	16,8	13,8	14,6	14,0	13,0	
795	28,2	27,0	24,0	24,0	24,4	22,4	16,8	16,0	12,0	17,6
799	22,8	18,0	21,4	21,4	18,4	18,6	15,0	12,6	12,2	12,4
1665	23,0	20,4	23,0	20,0	20,2	16,6	16,0	17,4	9,4	6,0
<b>Media</b>	23,63	24,72	24,76	23,08	22,31	20,35	17,99	16,32	15,30	13,78
<b>D. E.</b>	3,54	3,48	5,52	4,12	4,68	5,27	4,11	3,99	4,25	4,84

**Anexo 13** Producción promedio mensual de leche en vacas Selenio Suplementadas (litros).

Vaca n°	Meses de lactancia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
180	35,4	22,2	19,4	22,4	18,6	16,8	13,0	8,8	10,8	
451	23,0	24,8	19,0	21,2	21,2	19,0	16,1	8,6		
502	13,4	18,4	17,2	17,6	20,6	18,8	16,2	14,0	9,0	13,6
510	21,4	19,4	15,8	17,4	18,4	15,0	13,8	14,0	14,4	
522	26,6	26,0	24,4	18,2	22,2	20,0	18,0	12,4	12,2	
532	21,8	22,6	28,2	28,8	23,0	24,4	20,0	17,4	13,2	
541	17,6	18,2	18,2	15,4	17,8	15,6	14,2	13,0	12,6	9,7
568	23,8	23,4	27,4	25,2	23,2	20,0	18,2	18,0	11,6	11,8
573	16,4	21,0	20,2	28,0	22,0	22,6	21,0	20,0	18,2	13,6
579	17,0	22,2	21,4	25,0	24,6	21,2	16,6	14,0	13,6	
606	22,8	21,4	23,0	25,0	21,4	16,0	16,0	19,2	15,6	16,4
614	15,4	31,4	32,0	25,8	31,4	28,0	24,0	22,0	15,8	19,2
616	21,4	31,0	29,4	31,8	27,0	26,6	26,0	25,0	24,8	21,0
620	21,4	19,0	13,4	19,0	19,2	14,4	15,6	12,0	10,0	
651	15,2	18,2	18,0	16,0	17,0	17,0	15,0	12,0	12,2	
660	16,6	20,0	19,2	21,4	21,8	17,0	10,8	10,0	12,2	
669	22,0	21,8	22,4	19,8	19,0	15,0	13,6	15,0	10,4	10,0
677	17,4	23,4	20,8	21,0	21,4	19,8	15,6	14,0	12,4	10,8
680	20,8	21,6	21,4	24,2	26,0	21,0	19,2	20,0	22,2	16,2
684	22,4	20,8	27,6	22,4	18,8	16,0	15,4	15,6	12,4	13,8
717	26,4	19,8	15,8	20,4	19,0	13,4	16,6	15,0	15,4	15,4
726	21,2	21,0	26,6	22,4	20,2	18,0	16,2			
789	24,4	26,8	19,6	19,4	22,2	16,0	14,8	15,4	16,4	14,2
<b>Media</b>	21,03	22,36	21,93	22,07	21,57	18,76	16,77	15,24	14,06	14,28
<b>D. E.</b>	4,67	3,53	4,75	4,09	3,25	3,77	3,38	4,08	3,79	3,25

**Anexo 14** Resumen individual de RCS, nivel sanguíneo de GSH-Px, porcentaje de neoinfección intramamaria; porcentaje de cuartos infectados y porcentaje de cuartos infectados con patógenos mayores en vacas suplementadas con DEPOSEL ® durante la etapa experimental.

Vaca n°	RCS(Céls/ml) x 1000	GSH-Px	Porcentaje de Neoinfección	Porcentaje de cuartos mamarios infectados	Porcentaje de cuartos mamarios infectados con patógenos mayores
180	75.4	204,8	2,5	2,5	2,5
451	103.2	221,5	0,0	0,0	0,0
502	119.8	199,3	13,5	40,6	33,3
510	1990.0	254,5	11,3	58,8	26,3
522	100.0	184,5	11,8	21,1	5,3
532	251.1	187,8	11,3	11,3	6,3
541	182.7	329,3	25,0	53,1	0,0
568	90.8	213,3	6,3	6,3	4,1
573	25.4	330,8	7,5	8,8	6,3
579	1508.8	158,3	5,3	73,7	50,0
606	70.6	275,5	9,4	42,7	2,0
614	32.1	178,3	8,3	20,8	5,2
616	39.0	205,8	4,1	13,5	1,0
620	65.9	192,5	8,8	71,3	0,0
651	59.4	288,3	7,5	16,3	15,0
660	978.0	214,5	11,1	31,9	25,0
669	401.2	158,0	6,3	9,4	3,1
677	202.3	225,5	17,4	30,4	14,1
680	71.7	177,8	6,3	15,6	1,0
684	144.0	122,0	9,1	27,2	4,5
717	532.1	-	1,3	50,0	50,0
726	30.5	236,5	1,2	1,2	1,2
789	52.1	329,8	7,1	25,0	4,7

**Anexo 15** Resumen individual de RCS, nivel sanguíneo de GSH-Px, porcentaje de neoinfección intramamaria; porcentaje de cuartos infectados y porcentaje de cuartos infectados con patógenos mayores en vacas deficientes en Selenio durante la etapa experimental.

Vaca n°	RCS(Céls/ml) x 1000	GSH-Px	Porcentaje de Neoinfección	Porcentaje de cuartos mamarios infectados	Porcentaje de cuartos mamarios infectados con patógenos mayores
483	438.3	48,6	13,5	55,7	28,8
520	3520.0	26,2	17,4	50,0	44,5
529	539.7	38,7	9,2	48,7	35,5
601	2087.7	44,0	3,9	21,1	21,1
602	66.5	44,5	2,5	2,5	2,5
610	62.1	39,0	0,0	0,0	0,0
615	23.5	36,8	1,1	1,1	1,1
624	33.3	41,0	7,8	7,9	6,6
628	66.8	68,5	11,4	27,1	7,3
633	120.1	45,5	21,1	5,3	10,5
635	42.5	56,2	0,0	0,0	0,0
657	120.1	43,4	7,3	54,1	25,0
661	1010.2	57,5	2,1	2,0	2,0
676	27.8	40,2	0,0	0,0	0,0
679	542.2	56,0	1,3	39,5	25,0
682	33.8	42,7	10,0	10,0	10,0
691	203.2	42,0	10,4	26,0	25,0
693	34.2	37,7	2,4	2,4	1,1
696	282.8	42,3	11,8	31,6	3,9
776	177.1	31,8	8,3	8,3	5,9
784	474.2	47,0	11,2	85,0	6,2
792	24.4	55,0	9,2	15,8	7,8
795	158.1	66,7	5,2	17,7	17,7
799	24.9	75,0	2,1	2,1	0,0
1665	435.5	55,0	12,5	67,0	3,4

## AGRADECIMIENTOS

- A DIOS por permitirme concluir este trabajo y ayudarme en momentos difíciles, asimismo por guiarme a encontrar con el Dr. Juan Kruze V. Patrocinante de esta tesis, a quien le doy mis más sinceros agradecimientos por su labor pedagógica en el desarrollo de este trabajo e invaluable orientación valórica y académica que logré recibir de su persona en el transcurso de esta tesis. Gracias Dr. Kruze.
  
- Al personal del Instituto de Microbiología, comenzando por su director Dr. Germán Reinhardt, quienes me brindaron su ayuda, apoyo y un lugar agradable donde realizar este trabajo.
  
- A los docentes de la escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Austral de Chile por otorgarme los conocimientos y valores de esta noble profesión.
  
- A FONDECYT por el financiamiento brindado, quienes hacen posible el desarrollo de este tipo de trabajos.
  
- Por último a mi padre Hugo, quien de lejos me acompaña y a mi madre Anita que siempre está en todo momento, también a mis hermanos Olga, Claudio y Mercedes, quienes me cobijaron bajo su alero de amor y apoyo siempre constante en el transcurso de mi vida académica y por último también a Andrea en este tránsito final y comienzo de una nueva senda.