

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Immunmodulation durch Mutterschutzimpfung: Effekte auf Gesundheit und
Leistung von Milchkühen im geburtsnahen Zeitraum

von Caroline Kuhn

aus Freiburg i.Br.

München 2025

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Mitbetreuung durch:

Dr. Yury Zablotski

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferenten: Priv.-Doz. Dr. Michèle M.-J. D. Bergmann
Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg
Priv.-Doz. Dr. Elke Rauch

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

“Research means Search, Re-Search and Search Again”

frei nach Yury Zablotski

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Impfungen zum Schutz von Kuh und Kalb in der Milchviehhaltung...	2
1.1.	Impfmanagement in der Milchviehhaltung: Ein Überblick	2
1.2.	Sicherheit von Mutterschutzimpfungen bei Milchkühen unter Berücksichtigung speziesübergreifender Erkenntnisse	3
2.	Spezifische und nicht-spezifische Effekte von Impfungen.....	4
2.1.	Spezifische Effekte von Impfungen	4
2.2.	Nicht-spezifische Effekte von Impfungen.....	6
3.	Gesundheit und Immunsystem der Milchkuh im geburtsnahen Zeitraum.....	8
3.1.	Peripartale Gesundheit der Milchkuh.....	9
3.1.1.	Eutererkrankungen	9
3.1.2.	Gebärmuttererkrankungen.....	11
3.2.	Status des Immunsystems der Milchkuh im peripartalen Zeitraum.....	13
3.2.1.	Euterbezogene Immunmechanismen.....	14
3.2.2.	Gebärmutterbezogene Immunmechanismen	15
III.	PUBLIKATION: MUTTERSCHUTZIMPFUNG GEGEN NEUGEBORENENDURCHFALL UND IHRE AUSWIRKUNGEN AUF DIE EUTERGESUNDHEIT UND MILCHLEISTUNG VON MILCHKÜHEN	17
IV.	WEITERE ERGEBNISDATEN: MUTTERSCHUTZIMPFUNG GEGEN NEUGEBORENENDURCHFALL UND IHRE AUSWIRKUNGEN AUF DIE GEBÄRMUTTERGESUNDHEIT UND FRUCHTBARKEIT VON MILCHKÜHEN	35
V.	DISKUSSION	61
1.	Validität der Daten und der statistischen Methoden	61
1.1.	Beurteilung der Datengrundlage und Variablen.....	62

1.2.	Beurteilung der statistischen Methoden	64
2.	Nicht-spezifische Effekte der Mutterschutzimpfung bei der Milchkuh unter Berücksichtigung relevanter Einflussvariablen	65
2.1.	Bedeutung der Einflussvariablen	66
2.2.	Nicht-spezifische Effekte der Impfung, der Impfstoffkomponenten und des Impfzeitpunktes	68
3.	Fazit und Ausblick	72
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	74
VII.	SUMMARY.....	77
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	80
IX.	DANKSAGUNG	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BCG *Bacille Calmette-Guérin*

BHV-1 *Bovines Herpesvirus Typ 1*

BRSV *Bovines Respiratorisches Syncytialvirus*

IgG *Immunglobulin G*

MHC-Klasse-II-Komplex *Haupthistokompatibilitätskomplex der zweiten Klasse*

NEB *negative Energiebilanz*

NEFA *nicht-veresterte Fettsäuren*

NRR56 *Non-Return-Rate an Tag 56 post conceptionem*

NRR90 *Non-Return-Rate an Tag 90 post conceptionem*

NSE *Nicht-spezifische Effekte*

p.p. *post partum*

PBMC *mononukleäre Zellen des peripheren Blutes*

PI3 *Bovines Parainfluenza 3 Virus*

PMN *polymorphkerniger Leukozyt*

RMC *Retentio secundinarum-Metritis-Komplex*

SCC *somatische Zellzahl*

TLR *Toll-Like Rezeptor*

vgl. *vergleiche*

VIT *Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung (wirtschaftlicher Verein)*

I. EINLEITUNG

Mutterschutzimpfungen dienen in erster Linie dazu, Kälber in ihren ersten Lebenswochen vor Infektionskrankheiten zu schützen. Hierfür wird das Muttertier in den letzten Wochen vor der Geburt geimpft, um spezifische Antikörper gegen relevante Infektionserreger zu bilden und diese mit dem Kolostrum an das neugeborene Kalb weiterzugeben.

Während seit geraumer Zeit der Einsatz von Kombinationsimpfungen gegen Neugeborenenenddurchfall insbesondere auf großen Betrieben empfohlen wird, um die Kälbersterblichkeit zu senken, wurde den Effekten dieser Impfungen auf das Muttertier selbst wenig Beachtung geschenkt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Impfungen nicht-spezifische Effekte (NSE) hervorrufen und sogar die Immunreaktivität der geimpften Mutter langfristig verändern können. Solche durch Impfungen verursachte und durch die Reaktion des angeborenen Immunsystems vermittelten Effekte können zu einem sogenannten immunologischen Gedächtnis führen. In der Humanmedizin sind NSE besser als in der Tiermedizin erforscht. Allerdings konnten auch bei Rindern anhaltende NSE durch epigenetische Modifikationen nachgewiesen werden.

Das Immunsystem der Milchkuh im geburtsnahen Zeitraum gilt als moduliert, weist also gegenüber anderen Lebensphasen Besonderheiten auf. Erkrankungen der Gebärmutter und des Euters treten in der postpartalen Phase sehr häufig auf. Aus diesem Grund ist das optimale Management der Milchkuh in dieser Zeit essenziell. Dies betrifft vor allem die Bereiche Fütterung und Stoffwechsel sowie Gesundheitsüberwachung und Hygiene. Auch Mutterschutzimpfungen gehören in großen Milchviehbetrieben häufig zum Transitmanagement. Ob jedoch Impfungen in den letzten drei bis 12 Wochen vor dem Abkalbetermin NSE mit sich bringen oder nicht, und ob dies förderliche oder nachteilige Auswirkungen auf die postpartale Gesundheit und Leistung der Kuh hat, wurde bisher kaum untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, Gesundheits- und Leistungsdaten von Milchkühen mit und ohne Mutterschutzimpfung zu vergleichen. Die Ergebnisse sollen erste Erkenntnisse zum Einfluss der Impfung auf das Immunsystem und die Gesundheit des Muttertieres erbringen. Konsequenzen könnte dies für zukünftige Forschungs- und Entwicklungsarbeiten im Bereich Vakzination der Milchkuh haben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Impfungen zum Schutz von Kuh und Kalb in der Milchviehhaltung

1.1. Impfmanagement in der Milchviehhaltung: Ein Überblick

Impfungen gelten als wichtiges Element der Präventionsmedizin und des Gesundheitsmanagements in der Milchviehhaltung. Dabei eignen sich einige Impfungen (wie beispielsweise gegen Blauzungenkrankheit, bovine Herpesvirus Infektionen, Bovine Virusdiarrhoe sowie Maul- und Klauenseuche) zur Bekämpfung von Seuchenerregern (GANTER et al., 2021). Bei anderen Impfungen wiederum liegt der Fokus auf der Verbesserung der Gesundheit und Leistungsfähigkeit auf Einzeltier- und Bestandsebene. Letztere werden insbesondere bei Kälbern, Färsen und tragenden Kühen eingesetzt (VLASOVA und SAIF, 2021). So empfiehlt die Ständige Impfkommision Veterinärmedizin für Milcherzeuger den Einsatz von Impfungen gegen Bronchopneumonie, Neugeborenendurchfall und Schmallenbergvirus-Infektionen, sofern die jeweiligen Erreger regional oder betrieblich relevant sind. Im Einzelfall kann zudem die Impfung gegen Clostridiose, Coxiellose, Leptospirose, Mastitis, Salmonellose oder Trichophytie sinnvoll sein (GANTER et al., 2021).

Mutterschutzimpfungen bei Kühen dienen dazu, Kälber in den ersten Lebenswochen vor Infektionserkrankungen zu schützen. Dabei soll die Qualität des Kolostrums in Bezug auf den spezifischen Antikörpergehalt verbessert werden (CHIGERWE et al., 2015). In Deutschland sind kommerzielle Mutterschutzimpfungen gegen Neugeborenendurchfall, Bronchopneumonie und Clostridiosen erhältlich. Die Kombinationsimpfung gegen Neugeborenendurchfall enthält lebend-attenuiertes oder inaktiviertes bovines Rotavirus, bovines Coronavirus und *E. coli*-Antigen. Die Impfung wird zwischen drei und 12 Wochen vor erwartetem Abkalbetermin je nach Gebrauchsanweisung ein- oder zweimalig appliziert (BFARM, 2010, 2013, 2015).

1.2. Sicherheit von Mutterschutzimpfungen bei Milchkühen unter Berücksichtigung speziesübergreifender Erkenntnisse

Mutterschutzimpfungen von Kühen gelten als sicher. Nebenwirkungen treten dabei selten auf (SMITH et al., 2015; VIDLUND et al., 2024). Impfnebenwirkungen sind definiert als unbeabsichtigte Wirkungen, die direkt durch den Impfstoff oder dessen Bestandteile verursacht werden. Hierzu zählen Überempfindlichkeitsreaktionen, wie Fieber und lokale Schwellung sowie kurzfristige Reaktionen wie ein erhöhter Spiegel von Akute-Phase-Proteinen (INSTITUTE OF MEDICINE, 2012; MILIĆEVIĆ et al., 2018; KIM et al., 2024). Die grundsätzliche Sicherheit der auf dem Markt verfügbaren Impfstoffe wird durch die Prüfungen im Rahmen der nationalen und EU/EWR-weiten Zulassungsverfahren sowie der Pharmakovigilanz gewährleistet.

Empfehlungen für Impfungen während der Trächtigkeit oder der Schwangerschaft betonen in der Regel, dass Totimpfstoffe im Vergleich zu Lebendvakzinen sicherer sind (FREEDMAN und KROGER, 2023). So sind bei Frauen Lebendimpfungen gegen Masern während der Schwangerschaft kontraindiziert (ANSELEM et al., 2014; RÖBL-MATHIEU et al., 2021). Bei trächtigen Kühen wird ein erhöhtes Risiko für Aborte und Tot- oder Frühgeburten angeführt (CORTESE, 2010; SMITH et al., 2015). Eine erhöhte Inzidenz von Trächtigkeitsstörungen wurde nach Lebendimpfung gegen Brucellose berichtet (DOUGHERTY et al., 2013). Dies scheint jedoch auf einen bestimmten Impfstamm (RB51) begrenzt zu sein (BARBOSA et al., 2017).

Lebendvakzine bergen das Risiko, dass sich die enthaltenen Erreger, insbesondere RNA-Viren, replizieren und sowohl für die Mutter als auch für den wachsenden Fetus schädlich sein können (AZIZ-BOARON et al., 2013; LARIS-GONZÁLEZ et al., 2020). Eine transplazentare Übertragung von Pathogenen ist bei manchen Lebendimpfstoffen möglich. Dies wurde beispielsweise für die Lebendimpfung gegen das Rift Valley Fieber-Virus beim Schaf nachgewiesen (MAKOSCHEY et al., 2016). Die Fähigkeit zur Replikation des Erregers birgt außerdem das Risiko der Rückmutation zum Wildtyp und damit einhergehender Pathogenität (MUSKETT et al., 1985; NIELSEN et al., 2001). Außerdem treten bei Lebendimpfstoffen häufiger Kontaminationen auf, die durch die Verwendung von biologischen Materialien im Herstellungsprozess begünstigt werden können (AZIZ-BOARON et al., 2013).

Eine systematische Übersichtsarbeit aus der Humanmedizin zeigt, dass durch die meisten Lebendimpfstoffe kein erhöhtes Risiko für Frauen besteht. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass einem generellen Ausschluss von Lebendimpfstoffen die potentiellen Vorteile von Lebendimpfstoffen auch während der Schwangerschaft entgegenstehen (LARIS-GONZÁLEZ et al., 2020). Auch in der Veterinärmedizin wird für Lebendimpfstoffe häufig eine höhere Wirksamkeit und ein länger anhaltender Impfschutz als für Totimpfstoffe berichtet (FALKENBERG et al., 2023; HE, 2023). Eine Metaanalyse, die die Wirksamkeit der verfügbaren Tot- und Lebendimpfstoffe gegen Neugeborenenenddurchfall vergleicht, steht jedoch noch aus (MAIER et al., 2022).

2. Spezifische und nicht-spezifische Effekte von Impfungen

Neuere Studien deuten darauf hin, dass neben der spezifischen Immunantwort über die Bildung von Antikörpern in Folge einer Impfung auch nicht-spezifische Immunreaktionen auftreten. Während vor allem Lebendimpfstoffe am Menschen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen, gibt es einen Mangel an Forschung zu NSE bei veterinärmedizinischen Impfstoffprodukten (AREGA et al., 2022). NSE im Zusammenhang mit der Mutterschutzimpfung gegen Neugeborenenenddurchfall sind bisher nur unzureichend untersucht. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass auch diese Impfung in der Lage ist, NSE auszulösen. So fanden CHAMBERS et al. (2022) erhöhte Konzentrationen von unspezifischem Immunglobulin M im Kolostrum geimpfter Kühe. Die der vorliegenden Studie vorausgehende Masterarbeit von PRAEGER (2020) deutete auf höhere Metritis- und niedrigere Mastitis-Inzidenzen nach der Impfung hin.

2.1. Spezifische Effekte von Impfungen

Die vorrangige Intention von Impfungen ist der Schutz des Organismus vor Infektionen. Das Ziel ist die Auslösung einer Immunantwort, die bei einem Kontakt mit dem relevanten Erreger eine effektive Abwehrreaktion ermöglicht. Die Produktion von erregerspezifischen Antikörpern und deren neutralisierende und opsonierende Eigenschaften sind dabei von entscheidender Bedeutung (PLOTKIN, 2010; LYDYARD et al., 2011; PULENDRAN und AHMED, 2011).

Die Mutterschutzimpfung gegen Neugeborenenenddurchfall hat somit das Ziel, hohe Mengen an erregerspezifischen Antikörpern, insbesondere Immunglobulin G (IgG), im Muttertier zu induzieren (DUREL et al., 2017; GONZALEZ et al., 2021;

VIIDU und MÕTUS, 2022). So konnten hohe spezifische Antikörpertiter beim geimpften Muttertier und dessen Kalb gegen das bovine Rotavirus, das bovine Coronavirus und *E. coli* nachgewiesen werden (KOHARA et al., 1997; LORENZ et al., 2011; GONZALEZ et al., 2021).

Während bei der schwangeren Frau Antikörper in utero über die Plazenta an die Frucht weitergegeben werden, verhindert die epitheliochoriale Plazenta des Rindes den Übertritt von maternalen Antikörpern in das Blutsystem des Fetus (CHUCRI et al., 2010). Somit kommt der frühen und ausreichenden Versorgung des neugeborenen Kalbes mit Kolostrum eine besondere Bedeutung zu (BERGE et al., 2009). Das darin enthaltene IgG wird im Darm des Kalbes über die neonatalen *fragment crystallizable* (Fc)-Rezeptoren aufgenommen (TIZARD, 2013).

Die Antikörperproduktion ist Teil der humoralen Immunantwort. Im Gegensatz zu den zellulären Bestandteilen des Immunsystems befinden sich die Immunglobuline als lösliche Bestandteile im Blut und auf Schleimhäuten (LYDYARD et al., 2011). Zudem wird zwischen angeborenen und erworbenen Immunmechanismen unterschieden (BYRNE et al., 2020). Die Immunmechanismen unter Beteiligung von spezifischen Antikörpern gehören zwar zum erworbenen Immunsystem, jedoch sind das angeborene und das erworbene Immunsystem funktional eng miteinander verwoben. Dies lässt sich beispielsweise anhand der Funktion von dendritischen Zellen beobachten. Diese gehören zum zellulären angeborenen Teil des Immunsystems, nehmen im peripheren Gewebe Antigen auf und präsentieren dieses den T-Zellen über den sich an deren Oberfläche befindlichen Haupthistokompatibilitätskomplex der zweiten Klasse (MHC-Klasse-II-Komplex). Die T-Zellen, als Teil des erworbenen Immunsystems, können daraufhin die Antikörperproduktion in die Wege leiten (LYDYARD et al., 2011). Dendritische Zellen stellen somit auch die Quantität, Spezifität und Qualität der spezifischen Antikörper sicher (PULENDRAN und AHMED, 2011). Ein weiteres Beispiel der zellulären Immunantwort stellt die Produktion des antiviral wirksamen Zytokins Interferon γ durch Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems dar (FORREST et al., 2008). Den zellulären Immunmechanismen wird eine synergistische und länger anhaltende Wirkung zugeschrieben (PLOTKIN, 2010). Für einen tatsächlich anhaltenden Immunschutz benötigt es ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis. Insbesondere bei Lebendimpfstoffen kann ein teilweise lebenslang anhaltender spezifischer Schutz gegen den Erreger durch B-

und T-Gedächtnis-Zellen erreicht werden (BYRNE et al., 2020).

Es werden grundsätzlich zwei Klassen von Impfstoffen unterschieden: Lebend- und Totimpfstoffe. Lebendimpfstoffe enthalten attenuierte Viren oder Bakterien, deren Virulenz so abgeschwächt wurde, dass in der Regel keine Erkrankung mehr ausgelöst werden kann. Das Antigen ist jedoch in der Lage, eine ausgeprägte und spezifische Immunantwort im Körper zu initiieren. Bei Totimpfstoffen dagegen wurde der Erreger inaktiviert. Demnach sind lediglich noch Bestandteile des Erregers, wie etwa die Virushülle, vorhanden (LYDYARD et al., 2011). In der Regel nimmt der spezifische Impfschutz durch inaktivierte Erreger schneller ab als bei Lebendimpfstoffen. Infolgedessen ist eine häufigere Auffrischung des Impfschutzes erforderlich (AZIZ-BOARON et al., 2013).

Neben dem tatsächlichen Agens selbst (lebend oder tot) werden Impfstoffen oft Adjuvantien beigefügt. Damit wird eine verstärkte inflammatorische Antwort oder eine Depotfunktion beabsichtigt (ZHAO et al., 2023). Es sind noch nicht alle Wirkmechanismen der Adjuvantien vollständig aufgeklärt. Allerdings ist bekannt, dass eine verstärkte inflammatorische Antwort über die vermehrte Bildung und Freisetzung von Zyto- und Chemokinen erfolgen kann. Auch die Beeinflussung des MHC-Klasse-II-Komplexes ist bekannt (LYDYARD et al., 2011; AWATE et al., 2013; CIBULSKI et al., 2018). Auf den teilnehmenden Betrieben der vorliegenden Studie wurden zwei verschiedene Adjuvantien als Bestandteile der Impfstoffe eingesetzt: Aluminiumhydroxid und Montanide ISA 51. Letzteres ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion. Beide erfüllen eine Depotfunktion und erhöhen damit die Bioverfügbarkeit. Aluminiumhydroxid wirkt zudem als Immunstimulans (ZHAO et al., 2023).

2.2. Nicht-spezifische Effekte von Impfungen

Auswirkungen einer Impfung jenseits der antigenspezifischen Reaktion werden als NSE bezeichnet und können sowohl mit erworbenen als auch mit angeborenen Immunmechanismen assoziiert sein. Ein Beispiel für solche Effekte, die erworbenen Immunmechanismen unterliegen, stellt die heterologe T-Zell-Immunität dar (DE BREE et al., 2018). CHAMBERS et al. (2022) konnten bei Kühen mit Mutterschutzimpfung gegen die Erreger des Neugeborenenenddurchfalls sowie Clostridien höhere unspezifische Immunglobulin M-Konzentrationen als ohne Impfung feststellen

Bedeutungsvoller für die NSE sind offenbar aber Funktionen und Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Bis vor wenigen Jahren ging die Wissenschaft davon aus, dass ein immunologisches Gedächtnis allein durch das erworbene Immunsystem möglich ist. Dieses Verständnis wurde jedoch durch das Konzept der *trained immunity* erweitert (DAHA, 2011; NETEA et al., 2019; GECKIN et al., 2022). Mit *trained immunity* ist eine langfristige funktionelle Neuprogrammierung angeborener Immunzellen gemeint, die durch exogene oder endogene Reize hervorgerufen wird und nach der Rückkehr in den nicht-aktivierten Zustand zu einer veränderten Reaktivität auf eine zweite vergleichbare Exposition führt (NETEA et al., 2020). Die veränderte Immunantwort kann sowohl verstärkt - in diesem Fall spricht man von Training (*innate immune training*) – als auch abgeschwächt – Toleranz (*innate immune tolerance*) – ausfallen (BYRNE et al., 2020; NETEA et al., 2020). Auch konnten neben Impfungen weitere mögliche Arten eines Reizes identifiziert werden, die die *trained immunity* auslösen können, beispielsweise die Exposition mit Zellwandbestandteilen von Hefen (BYRNE et al., 2020). Zugrunde liegen dem immunologischen Gedächtnis des angeborenen Immunsystems epigenetische Modifikationen. Durch Umgestaltungen an Chromatin, Histon und Methylierung der Desoxyribonukleinsäure wird der Zugang zu dieser verändert und damit das Transkriptom und die anschließende Translation und Produktion von immunologisch wirksamen Proteinen beeinflusst. Eine Beteiligung von modifizierten posttranskriptionellen microRNA wird ebenfalls diskutiert. Diese Modifikationen können sowohl an diversen peripheren Immunzellen als auch an deren Vorläuferzellen im Knochenmark auftreten. Letzteres führt zu einer länger anhaltenden Wirkung (NETEA et al., 2019; BYRNE et al., 2020; NETEA et al., 2020).

Anhaltende NSE durch *trained immunity* sind unter anderem für den Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Impfstoff, der einen avirulenten Stamm von *M. bovis* enthält, nachgewiesen (KLEINNIJENHUIS et al., 2012; ZIOGAS und NETEA, 2022). Auch beim Rind konnten anhaltende Veränderungen des angeborenen Immunsystems für zumindest sechs Monate dokumentiert werden. Diese umfassen gesteigerte Phagozytose durch Makrophagen (JUSTE et al., 2016) sowie eine gesteigerte Transkription von proinflammatorischen Zytokinen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die mittels Toll-Like Rezeptoren (TLR) ausgelöst werden (GUERRA-MAUPOME et al., 2019).

Es wird sowohl über positive als auch über negative Auswirkungen von NSE berichtet, wobei ein wesentlicher Unterschied im Wirkungsmechanismus und insbesondere in der Art der NSE zwischen Lebend- und Totvakzinen festgestellt wurde. Eine aktuelle Übersichtsarbeit zeigt, dass Impfungen mit Lebendimpfstoffen eher gesundheitsfördernde NSE und solche mit Totimpfstoffen eher nachteilige NSE hervorrufen. Gut dokumentiert sind gesundheitsfördernde NSE beim Menschen für die Lebendimpfstoffe gegen BCG, Masern, Polio und Vaccinia. Nachteilige NSE wurden zuletzt für die Totimpfstoffe gegen Diphtherie-Tetanus-Pertussis, H1N1-Influenza, Hepatitis B, Haemophilus Influenza Typ B, Polio und Malaria nachgewiesen. Es wird vermutet, dass bei Totimpfstoffen die *innate immune tolerance*, also eine verminderte Antwort auf den zweiten Reiz, überwiegt. Lebendimpfstoffe hingegen lösen vermehrt ein *innate immune training* und damit eine verstärkte Immunantwort aus (RUBIO-CASILLAS et al., 2024).

Bisherige randomisierte kontrollierte Studien bei Milchkühen zeigten reduzierte Mastitisraten nach Impfung mit einem Lebendimpfstoff gegen Bovines Respiratorisches Syncytialvirus (BRSV), Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) und Bovines Parainfluenza 3 Virus (PI-3) (CORTESE et al., 2020) sowie veränderte Liegezeiten, Stoffwechselprofile und Mastitis-Inzidenzen nach Impfung mit einem Totimpfstoff gegen Neugeborenenenddurchfall (MENICHETTI et al., 2021b, 2021a).

3. Gesundheit und Immunsystem der Milchkuh im geburtsnahen Zeitraum

Die Transitphase, welche als der Zeitraum von drei Wochen vor bis drei Wochen nach Geburt definiert ist (GRUMMER, 1995; DRACKLEY, 1999), stellt eine besondere Herausforderung für die Gesundheit der Milchkuh dar. Die physiologischen Veränderungen durch den heranwachsenden Fetus sowie die Vorbereitungen auf die bevorstehende Geburt gehen mit einschneidenden metabolischen und endokrinologischen Veränderungen einher (LEBLANC, 2008; MULLIGAN und DOHERTY, 2008). Bei der hochträchtigen Kuh sind die täglichen Wachstumszunahmen des Fetus am größten (DRACKLEY, 1999), während die Futteraufnahmekapazität sinkt (BERTONI et al., 2009). Dies kann bereits vor der Geburt zu einer negativen Energiebilanz (NEB) führen (ESPOSITO et al., 2014). Die beginnende Laktation erhöht den metabolischen Stress durch die insulinunabhängige Glukoseaufnahme in den Euterzellen weiter. Die zunehmende

NEB führt zur Mobilisierung von Fett als Energiequelle aus dem Fettgewebe, was mit hohen Konzentrationen an nicht-veresterten Fettsäuren (NEFA) im Blut, oxidativem Stress im Gewebe und dem Risiko einer Ketose einhergeht. Darüber hinaus stellt die rasche Mobilisierung von Kalzium mit Beginn der Laktation eine Herausforderung für den Kalziumhaushalt der Milchkuh dar (ESPOSITO et al., 2014). Hinzu kommen weitere umweltbedingte Stressoren, wie beispielsweise der Stall- oder Gruppenwechsel (MULLIGAN und DOHERTY, 2008). Eine genaue Zuordnung von Ursachen und Effekten der genannten Prozesse ist aufgrund von wechselseitigen Beeinflussungen komplex (ALERI et al., 2016).

Die genannten metabolischen und endokrinologischen Herausforderungen der peripartalen Phase gehen mit einem modulierten Immunsystem mit eingeschränkter Immunkompetenz einher, geprägt von systemischen inflammatorischen Prozessen unmittelbar nach der Geburt (TREVISI und MINUTI, 2018). Die Wahrscheinlichkeit für Erkrankungen der Milchkuh ist deshalb auch besonders hoch in dieser Phase.

3.1. Peripartale Gesundheit der Milchkuh

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Effekten der Mutterschutzimpfung auf die postpartale Gesundheit von Euter und Gebärmutter. Laut den Auswertungen der Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung (VIT) für das Jahr 2023 stellten Unfruchtbarkeit mit 16,4% und Eutererkrankungen mit 13,6% insgesamt 30% aller Abgangsursachen auf Milchviehbetrieben dar (VIT, 2023). Euter- und Gebärmuttererkrankungen beeinträchtigen nicht nur das Tierwohl, sondern stellen auch einen finanziellen Schaden für Milchviehbetriebe dar (HAGNESTAM et al., 2007; SHELDON et al., 2009; PÉREZ-BÁEZ et al., 2021; SANCHEZ et al., 2024). Da Tierarzt- und Arzneimittelkosten ökonomisch deutlich weniger ins Gewicht fallen als die finanziellen Einbußen durch die reduzierte Milchleistung (WALTER, 2013), kommt einem guten Transitmanagement eine besondere Bedeutung zu (HOEDEMAKER et al., 2013; CROWE et al., 2018).

3.1.1. Eutererkrankungen

Mastitiserkrankungen treten gehäuft im geburtsnahen Zeitraum auf, insbesondere in den ersten zehn bis 14 Tagen post partum (p.p.) (BARKEMA et al., 1998; INGVARTSEN et al., 2003). Bei Mastitiden handelt es sich um eine Entzündung des Eutergewebes. Es wird zwischen klinischer und subklinischer sowie zwischen

akuter und chronischer Mastitis unterschieden (DVG, 2012).

Bei der mittel- bis hochgradigen klinischen Mastitis ist das Euter bei der Palpation auffällig gerötet, warm, verhärtet oder schmerzempfindlich. Außerdem kann es zu Ödemen des Eutergewebes und gestörtem Allgemeinbefinden kommen. Bei der geringgradigen klinischen Mastitis fehlen die klinischen Symptome am Eutergewebe. Das Milchsekret ist flockig bis blutig verändert. Bei der subklinischen Form sind keine klinischen Veränderungen feststellbar. So ist das Milchsekret unverändert, und klassische Entzündungssymptome (Rötung, Schwellung, Schmerz, Überwärmung) sind am Organ nicht feststellbar. Lediglich durch eine erhöhte somatische Zellzahl (SCC) werden die Tiere auffällig (DVG, 2012).

Aufgrund von tierindividuellen Unterschieden, wie Parität oder Milchleistung, sowie einer unterschiedlichen Erhöhung der SCC durch Erreger, ist eine eindeutige Einteilung der Mastitisformen nur bedingt anhand der SCC möglich (SCHEPERS et al., 1997; SCHUKKEN et al., 2003; ÅKERSTEDT et al., 2011). Allerdings gilt die SCC im Vergleich zu anderen Biomarkern als zuverlässiges Mittel zur Identifikation von Euterinfektionen (NYMAN et al., 2016). So wird die Eutergesundheit in der landwirtschaftlichen Praxis häufig anhand der SCC überwacht. Werte unter 100.000 Zellen/ml werden als physiologisch und Werte darüber als subklinische Mastitis gewertet (DOGGWEILER und HESS, 1983; HAMANN und FEHLINGS, 2002; HOEDEMAKER et al., 2013). Eine chronische Mastitis liegt vor, wenn der Wert von 200.000 Zellen/ml in drei aufeinander folgenden Monaten überschritten wird (HOEDEMAKER et al., 2013). Die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Mastitis gibt Aufschluss über den zeitlichen Verlauf und die Heilungschancen (RIENESL et al., 2022).

Die Mastitis ist eine Faktorenerkrankung, bei der sowohl der Erreger als auch die Umwelt sowie der Gesundheits- und Immunstatus der Kuh das Ausmaß der Infektion und einer möglichen Entzündung prägen. Das Erregerspektrum beschränkt sich dabei weitestgehend auf bakterielle Pathogene (EZZAT ALNAKIP et al., 2014). Die derzeit häufigsten in Deutschland vorkommenden Erreger sind Koagulase-negative Staphylokokken, *S. aureus*, Streptokokken (v.a. *Sc. uberis*, *Sc. agalactiae*, *Sc. dysgalactiae*), Enterokokken und *E. coli* (DVG, 2022; BECHTOLD et al., 2024). Eine geläufige Einteilung in Kuh-assoziierte (*S. aureus*, *Sc. agalactiae*) und umweltassoziierte (*Sc. uberis*, *E. coli*) Erreger wird relevant bei der

Verbreitung der Erreger. Erstere übertragen sich von Tier zu Tier, beispielsweise beim Melkprozess. Letztere sind vermehrt in der Stallumgebung zu finden (MEÇAJ et al., 2023). Die eingeschränkte Immunkompetenz, bereits während der Trockenstehphase, stellt den bedeutendsten Risikofaktor für Mastitis dar (BURTON et al., 2001; SORDILLO und MAVANGIRA, 2014; WEIKARD et al., 2015; TREVISI und MINUTI, 2018).

Klinische Mastitiden beeinträchtigen die Milchleistung, wobei Infektionen mit gram-negativen Erregern in der Regel eine stärkere Reduktion der Milchleistung zur Folge haben als Infektionen mit gram-positiven Erregern (SCHUKKEN et al., 2009). Die Gewährleistung der Eutergesundheit ist deshalb ein essenzieller finanzieller Faktor für Milchviehbetriebe. Mastitiden verursachen in Deutschland jährlich volkswirtschaftliche Schäden von etwa 1,4 Milliarden Euro (DVG, 2012; HOEDEMAKER et al., 2013).

3.1.2. Gebärmuttererkrankungen

Die postpartalen Erkrankungen der Gebärmutter können entlang der Zeitintervalle ihres Auftretens eingeteilt und beschrieben werden. Eine Nachgeburtsverhaltung liegt vor, sobald die fetalen Membranen innerhalb von 24 Stunden p.p. nicht abgegangen sind (LEBLANC, 2008). Die Metritis, als akute Form der Gebärmutterentzündung, tritt in der Regel in den ersten sieben Tagen p.p., bzw. zehn Tagen p.p. am häufigsten auf und kann bis Tag 21 p.p. festgestellt werden (SHELDON et al., 2006; LEBLANC, 2008). Entzündliche Erkrankungen der Gebärmutter ab Tag 21 p.p. sind chronische Gebärmutterentzündungen: subklinische Endometritis, klinische Endometritis oder Pyometra.

In der Histologie und der anatomischen Pathologie sind umfassende diagnostische Methoden verfügbar. So konnte auf Milchviehbetrieben in den USA eine Endometritis-Prävalenz von 53% mittels Zytologie ermittelt werden (GILBERT et al., 2005). In der Praxis jedoch werden in der Regel nur klinisch auffällige Tiere beprobt (CROWE et al., 2018). Demnach finden sich in der Literatur meist niedrigere Prävalenzangaben zwischen fünf und 25% (SHELDON et al., 2009; PÉREZ-BÁEZ et al., 2021; BARAŃSKI et al., 2022; MERLE et al., 2024; SANCHEZ et al., 2024).

Einheitliche Definitionen haben SHELDON et al. (2006) geprägt. Die puerperale Metritis wird als eine Entzündung der Gebärmutter mit systemischen

Erkrankungssymptomen innerhalb der ersten 21 Tage p.p. definiert. Dabei sind oft ein übelriechender wässrig-brauner Ausfluss, ein vergrößerter Uterus sowie akute systemische Symptome zu beobachten. Sofern keine systemischen Symptome wie Fieber oder Abgeschlagenheit vorhanden sind, spricht man von einer klinischen Metritis.

Die klinische Endometritis tritt ab Tag 21 p.p. auf und ist geprägt von purulentem oder mukopurulentem Ausfluss ohne systemische Symptome. Sofern sich der Eiter im Uteruslumen ansammelt, weil die Zervix durch ein gleichzeitiges persistierendes Corpus luteum geschlossen ist, wird dies als Pyometra definiert. Die subklinische Endometritis tritt ebenfalls ab Tag 21 p.p. auf; jedoch sind weder klinische noch systemische Symptome zu beobachten. Die zugrundeliegenden entzündlichen Vorgänge können lediglich durch den Anteil an polymorphkernigen Leukozyten (PMN) in der zytologischen Untersuchung nachgewiesen werden (SHELDON et al., 2006; SHELDON et al., 2009).

Beteiligte Erreger von Gebärmutterentzündungen sind meist bakterielle und in der Stallumgebung vorkommende *T. pyogenes*, *E. coli*, *F. necrophorum* oder *Prevotella*-Spezies (SHELDON et al., 2006; WILLIAMS et al., 2007). Eine bakterielle Kontamination kann unmittelbar nach der Geburt in fast jedem bovinen Uterus nachgewiesen werden. Deshalb kommt der Unterscheidung von Kontamination und Infektion eine besondere Bedeutung zu (SHELDON et al., 2006). Im Verlauf des Puerperiums und der einhergehenden uterinen Involution sind vor allem die angeborenen Immunmechanismen (vgl. II.3.2.2.) für die Entstehung oder die Verhinderung von (Endo-)Metritiden entscheidend.

Trotz der zeitlichen Abgrenzungen zwischen den Erkrankungen können diese nicht immer getrennt betrachtet werden, denn sie beeinflussen sich gegenseitig. So stellt die Nachgeburtsverhaltung eines der größten Risikofaktoren für die Metritis dar (LEBLANC, 2008). Allgemein wird davon ausgegangen, dass eine Nachgeburtsverhaltung immer zu einer Entzündung und damit einer akuten Metritis führt (GRUNERT, 1996). Nachgeburtsverhaltung und (Endo-)Metritis wiederum beeinflussen die Fruchtbarkeit. So haben Kühe mit vorangegangener Nachgeburtsverhaltung oder (Endo-)Metritis eine geringere Wahrscheinlichkeit auf einen Besamungserfolg. Zugrundeliegende Mechanismen dieses Carry-Over-Effektes sind noch nicht vollständig geklärt (FOURICHON et al., 2000; LEBLANC et al., 2002; POTTER et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016; LEBLANC, 2023). Die

geschätzten Kosten, verursacht durch Metritis, klinische Endometritis und Pyometra, betragen zwischen 650 und 900 Millionen USD in den USA und 1,4 Milliarden Euro in Europa. Hierbei wurden die Kosten durch Unfruchtbarkeit, Abgänge, reduzierte Milchleistung und Behandlungskosten einberechnet (PÉREZ-BÁEZ et al., 2021). Für die Beurteilung der Fruchtbarkeit und den Besamungserfolg in der Herde, wird häufig die Non-Return-Rate herangezogen. Sie gilt als zuverlässiger Parameter und gibt den Anteil der erfolgreichen Befruchtung an Tag 56 (NRR56) oder 90 (NRR90) post conceptionem an (LEBLANC, 2010).

3.2. Status des Immunsystems der Milchkuh im peripartalen Zeitraum

Erkrankungen der Transitzuh sollten nicht isoliert betrachtet werden (MULLIGAN und DOHERTY, 2008). Ursachen können nicht nur auf den Erregerdruck oder die vorangegangene Geburt zurückgeführt werden, sondern auch und vor allem auf die Kompetenz des Immunsystems. Sowohl Teile der angeborenen als auch der adaptiven Immunmechanismen gelten als dysreguliert. Eine eindeutige Abgrenzung von metabolischen und endokrinologischen Ursachen ist dabei nur begrenzt möglich (LEAN und DEGARIS, 2015; ALERI et al., 2016). Die um die Geburt herum vermehrt zirkulierenden Glukokortikoide führen zur Beeinträchtigung der Anzahl und Funktion von Leukozyten. Dies betrifft nachfolgend neutrophile Granulozyten und Lymphozyten (ALERI et al., 2016). So konnte eine eingeschränkte bakterizide Wirkung von PMN gezeigt werden (BURTON et al., 2005). Verstärkt wird dieser Effekt durch die metabolischen Herausforderungen der angehenden Laktation (KIMURA et al., 1999) und die erhöhten Glukokortikoidspiegel bei Hypokalzämie (HORST und JORGENSEN, 1982; GOFF und HORST, 1997). Während der Kolostrogenese wird IgG für das Kolostrum und die passive Immunisierung des Kalbes bereitgestellt und steht deshalb zu geringerem Maße für die Immunabwehr der Mutter zur Verfügung (ALERI et al., 2016). Ferner ist die mit der NEB einhergehenden Anreicherung von NEFA im Blut assoziiert mit einer eingeschränkten Immunkompetenz (STER et al., 2012). Diese veränderten Mechanismen spiegeln sich in der Genexpression der beteiligten Immunzellen wider. Durch Transkriptomanalysen von peripheren Leukozyten konnte festgestellt werden, dass die Aktivität der Leukozyten in der peripartalen Phase sogar erhöht ist (MINUTI et al., 2016). Dies deutet darauf hin, dass es sich nicht um eine Einschränkung der Aktivität und Funktion dieser Zellen

handelt, sondern um ein dysreguliertes Immunsystem mit erhöhter Aktivität und eingeschränkter Kompetenz (TREVISI und MINUTI, 2018).

3.2.1. Euterbezogene Immunmechanismen

Das Euter verfügt über einige lokale Abwehrmechanismen gegen Mastitiserreger. Der Sphinktermuskel und die Keratinschicht im Zitzenkanal wirken als physikalische Barriere (SORDILLO, 2005; VLASOVA und SAIF, 2021). In der Fürstenberg-Rosette befindet sich eine vermehrte Anzahl an Leukozyten. Zudem werden antimikrobiell wirksame Stoffe wie Laktoferrin, Tranferrin, Lysozym und Laktoperoxidase gebildet, die zusätzlich Schutz vor allem während der Laktation bieten (BRADLEY und GREEN, 2004; VLASOVA und SAIF, 2021).

Im Zeitraum zwischen Trockenstellen und anlaufender Laktation durchläuft das Euter verschiedene Phasen, die mit unterschiedlicher Anfälligkeit für Infektionsgeschehen einhergehen. Unmittelbar nach dem Trockenstellen sowie kurz vor der Geburt ist die Infektionsrate am höchsten (OLIVER und SORDILLO, 1988; BRADLEY und GREEN, 2004; PYÖRÄLÄ, 2008). Nach dem Trockenstellen erhöht sich zunächst der Druck im Euter und Gewebeveränderungen im Rahmen der Involution werden angeregt. Während dieser Phase schließt sich der Zitzenkanal und es bildet sich eine Keratinschicht. Dieser Prozess und der damit einhergehende schützende Effekt wird durch eine niedrigere Milchleistung vor dem Trockenstellen begünstigt (DINGWELL et al., 2004). Während der Kolostrogenese bereitet sich das Euter auf die bevorstehende Laktation vor. Einige Tage vor der Abkalbung öffnet sich bereits die Barriere durch den Sphinktermuskel und die Keratinschicht im Zitzenkanal, was zum erhöhten Eindringen von Erregern führen kann (BRADLEY und GREEN, 2004; PYÖRÄLÄ, 2008). Gegebenenfalls applizierte antibiotische Trockensteller verlieren zudem ihre Wirkung (BRADLEY und GREEN, 2004). Sowohl bereits vor Geburt als auch bei beginnender Laktation konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression für die Milchprotein- und Fettsynthese hochreguliert und die immunassoziierte Genexpression herunterreguliert wird (GAO et al., 2013).

Für die Immunantwort auf einen Infektionserreger und im Rahmen einer akuten Mastitis ist das Zusammenspiel von PMN und IgG entscheidend (BURTON und ERSKINE, 2003; SORDILLO, 2005). Wenn diese schnell lokal bereitgestellt werden können, führt IgG zur Opsonierung, also Markierung des Pathogens. Dies

begünstigt die Phagozytose von Bakterien durch PMN. Je mehr PMN und desto schneller diese im Euter nach Infektion verfügbar sind, desto besser kann auf eine Infektion reagiert werden (BURTON und ERSKINE, 2003). In diesem Zusammenspiel haben auch Makrophagen eine entscheidende Rolle. Sie besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Phagozytose. Entscheidender ist jedoch ihre Fähigkeit zur Rekrutierung von PMN aus den Blutgefäßen ins Eutergewebe und die Milchalveolen. Während um die Geburt herum Leukozyten, insbesondere PMN, massiv in die Gebärmutter einwandern (vgl. II.3.2.2.), stehen weniger Leukozyten in anderen Organsystemen zur Verfügung, so auch im Euter (PYÖRÄLÄ, 2008). Die peripartalen Funktionseinschränkungen von PMN wirken sich auch auf das Euter und dessen Fähigkeit zur Abwehr aus, wo sie beispielsweise weniger Reaktive Sauerstoffspezies produzieren können (MEHRZAD et al., 2002).

Es gibt bereits verschiedene Ansätze zur Prophylaxe von Mastitiden durch die Regulation des angeborenen Immunsystems. Hierbei ist von Relevanz, dass gram-negative Mastitiserreger in der Regel eine stärkere und schnellere humorale Antwort des angeborenen Immunsystems auslösen (CURONE et al., 2024). Allerdings ist der Influx von PMN, also den zellulären Anteilen des angeborenen Immunsystems, in das Gewebe bei gram-negativen *E. coli*-Mastitiden verzögert. Hierbei wird eine veränderte Signaltransduktion durch TLR vermutet (DE SCHEPPER et al., 2008). Eine verbesserte Endotoxintoleranz in den Endothelzellen des Eutergewebes konnte sowohl durch Lipopolysaccharide, Zellwandbestandteile von gram-negativen Bakterien, als auch durch weitere Liganden der TLR ausgelöst werden (GÜNTHER et al., 2017). Die Gabe von Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor bewirkte eine Erhöhung von Anzahl und Funktion von PMN im Knochenmark und wirkte so der eingeschränkten peripartalen Immunkompetenz entgegen (KEHRLI et al., 1991; ALLUWAIMI, 2004).

3.2.2. Gebärmutterbezogene Immunmechanismen

Bei Kühen mit Nachgeburtsverhaltung, Metritis oder Endometritis konnte nachgewiesen werden, dass eine eingeschränkte angeborene Immunkompetenz vorausgegangen war (HAMMON et al., 2006). Es wird deshalb davon ausgegangen, dass bereits präpartale Immundysregulationen (mindestens zwei Wochen vor der Geburt) hierfür verantwortlich sind und postpartale Gebärmuttererkrankungen begünstigen (LEBLANC, 2008). Dabei spielen PMN als

zellulärer Teil des angeborenen Immunsystems eine besondere Rolle. Eine frühe und ausreichende Einwanderung von PMN in den Uterus ist besonders wichtig für die uterine Involution und Phagozytose pathogener Erreger und kann somit Gebärmuttererkrankungen vorbeugen (PASCOTTINI und LEBLANC, 2020). Verschiedene humorale Faktoren wie das Zytokin Interleukin-8 sind an der Aktivierung und Infiltration der PMN beteiligt (MACHADO und SILVA, 2020). Darüber hinaus können die uterinen PMN wiederum Prostaglandine, antimikrobielle Peptide und weitere Zytokine unter Beteiligung von TLR produzieren (DAVIES et al., 2008; HEALY et al., 2014). Eine reduzierte Anzahl und Funktion von PMN, wie sie durch das eingeschränkte angeborene Immunsystem peripartal häufig vorkommt (HAMMON et al., 2006), begünstigt damit die Entstehung der Erkrankungen (PASCOTTINI und LEBLANC, 2020). PMN sind bekannt für die inflammatorische Hochregulation, jedoch wird auch vermutet, dass sie an der Auflösung von Entzündungen im Uterus beteiligt sind (PASCOTTINI und LEBLANC, 2020). RIBEIRO et al. (2016) zeigten, dass eine entzündliche uterine Situation vor der Besamung die Fruchtbarkeit beeinträchtigen kann und begründeten dies vor allem mit additiven negativen Effekten durch den Stoffwechsel, Gebärmutter- und weiterer Erkrankungen. Das Zusammenspiel von systemischen und lokalen uterinen Entzündungsprozessen ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wird davon ausgegangen, dass die Regulation von Entzündungsprozessen maßgeblich an der Adaption bzw. Maladaption der Transitkuh und dessen Anfälligkeit für uterine Erkrankungen beteiligt ist (PASCOTTINI et al., 2022).

III. PUBLIKATION: MUTTERSCHUTZIMPfung GEGEN NEUGEBORENENDURCHFALL UND IHRE AUSWIRKUNGEN AUF DIE EUTERGESUNDHEIT UND MILCHLEISTUNG VON MILCHKÜHEN

Prepartum Vaccination Against Neonatal Calf Diarrhea and Its Effect on Mammary Health and Milk Yield of Dairy Cows: A Retrospective Study Addressing Non-Specific Effects of Vaccination

**Caroline Kuhn¹; Holm Zerbe¹; Hans-Joachim Schuberth²; Anke Römer³;
Debby Kraatz-van Egmond⁴; Claudia Wesenauer⁴; Martina Resch⁵;
Alexander Stoll⁵; Yury Zablotski¹**

¹Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany;

²Institute for Immunology, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany; ³Mecklenburg-Vorpommern Research Centre for Agriculture and Fisheries, Institute of Livestock Farming, Dummerstorf, Germany; ⁴RinderAllianz GmbH, Woldegk, Germany; ⁵Intervet Deutschland GmbH, Unterschleissheim, Germany.



Article

Prepartum Vaccination Against Neonatal Calf Diarrhea and Its Effect on Mammary Health and Milk Yield of Dairy Cows: A Retrospective Study Addressing Non-Specific Effects of Vaccination

Caroline Kuhn ^{1,*}, Holm Zerbe ¹, Hans-Joachim Schuberth ², Anke Römer ³, Debby Kraatz-van Egmond ⁴, Claudia Wesenauer ⁴, Martina Resch ⁵, Alexander Stoll ⁵ and Yury Zablotzki ¹

¹ Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, 80539 Munich, Germany; h.zerbe@lmu.de (H.Z.)

² Institute for Immunology, University of Veterinary Medicine, 30559 Hannover, Germany; hans-joachim.schuberth@tiho-hannover.de

³ Mecklenburg-Vorpommern Research Centre for Agriculture and Fisheries, Institute of Livestock Farming, 18196 Dummerstorf, Germany; a.roemer@lfa.mvnet.de

⁴ RinderAllianz GmbH, 17348 Woldegk, Germany; dkraatz@rinderallianz.de (D.K.-v.E.)

⁵ Intervet Deutschland GmbH, 85716 Unterschleißheim, Germany; alexander.stoll@msd.de (A.S.)

* Correspondence: caroline.kuhn@campus.lmu.de



Academic Editor: Pedro G. Melendez

Received: 9 December 2024

Revised: 7 January 2025

Accepted: 8 January 2025

Published: 14 January 2025

Citation: Kuhn, C.; Zerbe, H.; Schuberth, H.-J.; Römer, A.; Kraatz-van Egmond, D.; Wesenauer, C.; Resch, M.; Stoll, A.; Zablotzki, Y. Prepartum Vaccination Against Neonatal Calf Diarrhea and Its Effect on Mammary Health and Milk Yield of Dairy Cows: A Retrospective Study Addressing Non-Specific Effects of Vaccination. *Animals* **2025**, *15*, 203. <https://doi.org/10.3390/ani15020203>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Prepartum vaccinations of cows are performed to boost colostral antibodies available to calves in the first weeks of life. While beneficial effects of the vaccine for calves are well known, less has been investigated on its effects on the cow during the sensitive period around calving. There is evidence that vaccines have non-specific effects, including altered susceptibility to infectious diseases other than the targeted pathogens and involve the innate immune response of the vaccinated animal. Therefore, this study analyzed data from 73,378 cows on 20 farms in Germany to evaluate the effects of prepartum vaccination against neonatal calf diarrhea on mastitis, somatic cell count, and milk production. The results demonstrated that herd management had the highest influence, while prepartum vaccination had no significant impact on mammary health and milk yield. These findings suggest that prepartum vaccination does not compromise mammary health or milk productivity. Further research is recommended to explore non-specific vaccine effects on other organ systems, diseases, and production metrics in dairy cows.

Abstract: Prepartum vaccinations against neonatal calf diarrhea pathogens are administered in late pregnancy to provide passive immunity to calves through protective colostral antibodies. Potential non-specific effects of the vaccine on maternal innate immune responses and disease susceptibility during the sensitive transition period have not been addressed so far. In this retrospective study, data from 73,378 dairy cows on 20 farms in Germany were analyzed, using linear mixed-effects regression, quantile regression, and decision-tree-algorithms, to investigate the effects of prepartum vaccination on mammary health and milk yield by comparing non-vaccinated and vaccinated transition periods. Herd management-related factors were found to be most influential for mammary health and milk yield. Vaccinated cows were not significantly more likely to develop mastitis and did not have significantly different somatic cell counts and milk yields compared to non-vaccinated cows. Healthy primiparous cows with and without vaccination had similar energy-corrected milk yields. The study concludes that prepartum vaccination against calf diarrhea has no significant effects on mammary health and milk yield. Further research is recommended to investigate potential non-specific vaccine effects on other organ systems, infectious diseases, and production metrics of the dairy cow.

Keywords: transition cow; vaccination; trained immunity; cattle; bovine mastitis; epidemiology

1. Introduction

Prepartum vaccinations of cows are primarily performed to protect calves from infectious diseases, such as neonatal calf diarrhea (NCD), in their first weeks of life. For this purpose, the cow is vaccinated during the last weeks of pregnancy to induce an adaptive immune response with high levels of pathogen-specific antibodies and obtain enriched colostrum for additional protection of the newborn calf [1–3]. Prepartum vaccination of cows is regarded as safe and usually no adverse reactions are reported [4,5]. Adverse reactions are known as any harmful or unintended outcomes that are directly caused by the vaccine or its components, including hypersensitivity, fever, local swelling, and short-term reactions such as increased levels of acute phase proteins. These reactions can differ between live and non-live vaccines, as well as between adjuvants administered [6–8]. In contrast to the adverse effects of vaccination, which are harmful, there are vaccination-induced effects beyond antigen-specific induction of adaptive immune responses, known as non-specific effects (NSEs) [9]. These can be beneficial or harmful for the individual. However, underlying mechanisms are intensely discussed [10], and possible characteristics of live, attenuated, or killed vaccines in this regard are not fully elaborated [9]. In cattle, it has been demonstrated that the immediate innate response to killed vaccines resulted in an altered gene expression of circulating immune cells [11,12]. While live vaccinations in humans are central to ongoing investigations, there is a lack of research on the NSEs of veterinary vaccine products [9]. Progress has been made in understanding NSEs, particularly in rodents and humans [13]. The inflammatory response after active vaccination can lead to an altered functionality of circulating immune cells. The innate response to vaccination during pregnancy has been demonstrated in mice where the development of the fetal immune system was modified in utero by epigenetic changes [14]. This suggests that vaccination-induced epigenetic modification also alters the immune reactivity of the vaccinated mother. Such vaccination-induced, innate-response-mediated effects can lead to a status called innate immune memory, based on epigenetic modifications [15]. Such effects have been well-studied for certain vaccines, such as the Bacille Calmette Guérin (BCG) vaccine, which contains an avirulent *Mycobacterium bovis* strain [16,17]. This vaccine resulted in a trained functional phenotype (trained immunity) of circulating myeloid cells in calves, referring to primary stimulus-augmented innate immune responses towards a secondary stimulation [15].

Whether contemporarily used veterinary vaccines, especially those applied to cows in the transition period during late pregnancy, have non-specific effects or not, has not been addressed so far. A number of studies explored variable effects of cow vaccinations with conventional vaccines on milk yield. No effect on milk yield was reported after vaccination with a core antigen vaccine against Gram-negative bacteria [18]. Lower milk yields were shown after vaccination with an inactivated *Coxiella burnetii* vaccine [19], whereas heifers vaccinated with a BCG vaccine showed higher milk yields [20]. How these effects were mediated was not addressed so far and, to the best of our knowledge, no study addressed the potential NSEs of prepartum vaccination against NCD on the prevalence of postpartum mastitis and the milk yield of cows. Therefore, the aim of this retrospective cross-sectional study was to analyze the effect of contemporary prepartum vaccines on mammary health and milk yield of the periparturient cow. It is hypothesized that the prepartum vaccination against NCD induces beneficial non-specific effects, which allow the dysregulated immune function of the periparturient cow

to better cope with mammary infections. These effects would be measurable through improved mammary health outcomes and production metrics during the very sensitive peripartum period.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population and Farm Selection

Data were obtained from test herds of the RinderAllianz (RA), a breeding organization that supervises numerous dairy farms in Mecklenburg-Vorpommern, Saxony-Anhalt, and Brandenburg. The service includes sperm sales, mating, insemination, cattle marketing, milk control, and analyses. In cooperation with the RA, comprehensive data from 20 test farms were obtained in the context of this work. At the timepoint of data collection in June 2021, prepartum vaccination was performed on ten of the participating farms. Milk yield was balanced, so that each group of farms contained five high yielding farms with mean energy corrected milk yield in 305 days of lactation (ECM 305) above 11,000 kg and five low yielding farms below 11,000 kg ECM 305. Informed consent was obtained from all participating farms. All of these farms share a common history as former Agricultural Production Cooperatives in former East Germany until 1989. Altogether, data of these 20 farms comprises herd records, reproduction data, milk recordings, health documentation, and holding registers of 73,378 dairy cows of 22 herds located across all three operating regions of the RA between January 2007 and September 2020.

2.2. On-Farm Data Collection

Each farm was visited on-site to collect contextual information and conduct an in-depth survey. The survey comprised information on vaccination history, dry-off management, housing systems, health management, monitoring during calving, milking and colostrum management, hygiene and feeding management. On-site visits took place between October 2021 and August 2022 with the herd managers. Depending on the size, infrastructure of the farms, and distribution of tasks between workers, responsible persons were consulted, if necessary. The questionnaire was always filled out by the same surveyor in order to ensure conformity of documentation. One farm was surveyed online due to pandemic precaution-measures while all others were visited on-site, allowing a deeper understanding of the conditions of the location. Participating farmers were very cooperative and, with no exception, showed the surveyors around all relevant areas of the facility, the housing of dairy cows in all stages of the production cycle—calves, heifers, dry cows, fresh and late-lactating cows—, milking installation, and the calving area, which was especially inspected carefully. Apart from data collection, the purpose of the visits ensured that at least no obvious problems in management and hygiene are apparent on the respective farms. Furthermore, the local regularly visiting veterinarians were consulted to better estimate herd management. Depending on time availability, some farm visits were attended in-person by the veterinarians, in other cases, they were consulted by phone, and in all cases, the reliability of health management was confirmed.

2.3. Data Pre-Processing

Step-by-step data were joined and cleaned according to the needs of the study using the software R version 4.3.1 and R Studio (Figure 1). Herd record data were inspected for inconsistencies before being converted into a format where each observation corresponds to one lactation, whereby chronological adaptations were made. Events during the dry period are assigned to the subsequent lactation, in order to tailor the database to the transition period of the cow. Reproduction data of 148,268 lactations, milk yields, and components from 1,561,273 recordings and 1,298,703 diagnoses from health documentation were added.

Moreover, on-site survey data were manually transferred from paper-based forms filled out on-site into ExcelTM-sheets and further integrated into the final database. Observations were excluded when on-site data or health documentation were not available. Information on vaccination management on each farm was assigned to the vaccination status on an individual cow basis and transition period. All observations with other vaccinations other than prepartum vaccination against neonatal calf diarrhea were excluded to reduce interaction with other vaccines. When a farm changed its vaccination management or did not vaccinate for a distinct time period, a buffer of one month (15 days prior to and 15 days after the date of change) was created, thus risk of false entries is minimized. Here, farm-specific time of vaccination was paid attention to in order to correctly assign vaccination periods and calving dates.

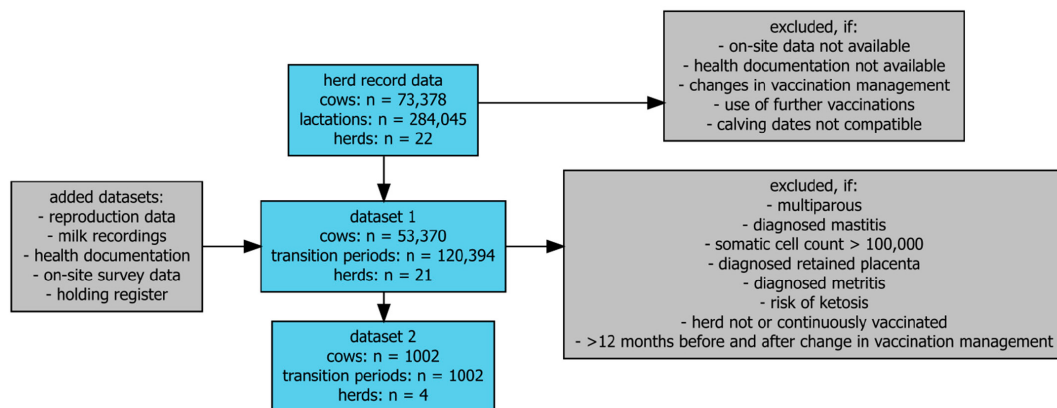


Figure 1. Simplified flow diagram of the studies' data pre-processing.

Originally 73,378 dairy cows in 22 herds across 20 farms were provided for this study, of which 53,370 dairy cows in 21 herds across 19 farms could be further included for analysis after matching herd records with health documentation, reproduction data, milk records, and the on-site survey. This first dataset consisted of 120,394 transition periods in total. The second and smaller dataset 2 represents a subset of dataset 1, containing 1002 transition periods from 1002 primiparous, utmost healthy cows from four alternately vaccinated herds. Dataset 2 allows analyses on rather ideal conditions while presuming that health and immunological status of primiparous cows differ from multiparous cows [21,22]. Furthermore, it was intended to reduce the influences of pathologic processes by excluding diseased cows. Regarding mammary health, cows diagnosed with mastitis were excluded, taking into account that mastitis can lead to lower milk yields [23]. As a somatic cell count (SCC) below 100,000 cells is considered physiological [24,25], lactations were only included when SCC of the first test day of milk recordings were below this threshold. Risk of ketosis and diagnosis of retained placenta and metritis were also eliminated from dataset 2. In alternately vaccinated herds, a timeframe of twelve months before and twelve months after change in vaccination management (from vaccination to non-vaccination or vice versa) was isolated. By this means, the comparison of vaccinated and non-vaccinated transition periods was less influenced by calving year.

2.4. Description of Vaccination Related Parameters

A supplementary table provides an overview of response and independent variables, definitions, composition, and values (Table S2). Three vaccines were used:

- Bovilis® Rotavec® Corona (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleissheim, Germany) (RC): $n = 27,769$, containing inactivated bovine rotavirus (serotype G6 P5), inactivated bovine coronavirus (strain Mebus), *E. coli* (K99 Antigen), mineral oil, and aluminum hydroxide.
- Scourguard® 3 (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany) (SG): $n = 8352$, containing live attenuated bovine rotavirus (strain Lincoln), live attenuated bovine coronavirus (strain Hansen), inactivated *E. coli* (K99 Antigen), Alhydrogel.
- Bovigen® Scour (Forte Healthcare Ltd, Dublin, Ireland) (BS): $n = 8004$, containing inactivated bovine rotavirus (serotype G6 P1), inactivated bovine coronavirus (strain C-197), *E. coli* (K99 Antigen), Montanide ISA 206 VG.

RC and BS are applied once and SG is applied twice, whereby the date of the first application was considered the time of vaccination. In 18,453 cases, the vaccine product could not be associated (not specified). On the basis of the used vaccine products, the variable adjuvant was designed grouping animals in those vaccinated with alum (RC, SG) or montanide-containing (BS) vaccines.

2.5. Description of Mammary Health and Milk Yield Parameters

Each two response variables were elaborated to represent milk performance and mammary health: *ECM 305* defines the energy corrected milk yield in 305 days of lactation and *ECM FTD* on the first test day of milk recording. For this, the milk recording parameters were consulted to calculate as follows [26]:

$$ECM = \text{milk yield (kg)} \times \frac{0.38 \times \text{fat}(\%) + 0.21 \times \text{protein}(\%) + 1.05}{3.28} \quad (1)$$

To approach an adequate representation of the mammary health status of the cows, parameters of different origins were consulted. Farm health documentation was transformed into the binary variable mastitis indicating the prevalence of mastitis diagnoses of each cow when the diagnosis mastitis was registered at least once within the time period of 10 days p.p. The analysis was completed with SCC as a further stringent variable, less influenced by personnel or documentation. It is defined as the somatic cell count on the first day of milk recording and was logarithmically transformed to stabilize variance. SCC is seen as a good parameter to identify intramammary infections [27] and is considered physiological below 100,000 [24,25]. The farms conducted milk recordings once a month. Thus, the first test day of milk recordings and therefore Days in Milk (DIM) at the time of data collection of the variables ECM FTD and SCC differs across the observations, resulting in limitations for these variables as they represent only one single point of time during the first weeks of lactation where the milk yield and cell count vary. The mean DIM was considered between the groups investigated, ascertaining comparability.

Eligible influencing variables were defined, firstly the above-mentioned vaccination-related variables, and further, farm management and cow-related variables. Management-related variables encompass the following variables: The herd itself representing the general farm management. Calving year denotes the year when cows calved, potentially impacting health due to environmental or management changes. The variables herd and calving year might not be understood in isolation but rather in combination. Although e.g., climate or pathogen diversity might vary between the years, the fluctuations of the years are probably more subject to farm management than the year itself. For this reason, they were consequently combined as random effects in the statistical models. Herd Size indicates the annual total number of cows in the herd, potentially influencing disease spread and herd dynamics. The variable was transformed from numeric to character type by segmenting the categories into small, medium and large sections with the binning-

function of the dlookr-package. The quantile method was employed to determine break points, ensuring an equitable distribution of farm sizes across the derived categories. Herd replacement rate of the previous year, affecting overall herd health and productivity in the respective year, was calculated as percentage of the number of primiparous calvings, compared to the number of secondi- or multiparous calvings. Access to pasture reflects the availability and quality of grazing areas during the dry period, impacting especially the exercise level of the cow during calving and lactation. Flooring refers to the type of flooring within the barn during the transition period, impacting cow comfort and hoof health with the two categories deeplitter or slatted floor. Score of hygiene indicates the cleanliness level of the cows and density of possible pathogens. A score between 1 and 4 was documented on the date of on-site survey [28]. Calving box describes the two options of calving in a group or in an individual box, influencing behavioral dynamics around calving. When calving in individual boxes, pen change was conducted during transition period, which can affect the cows' metabolism in combination with prepartum vaccination [29]. *Milking Frequency* defines how often cows are milked daily, affecting mammary health. Here, robot-milked cows could not be traced for this variable. Moreover, Type of dry-off describes the method used when cows are dried off from milking, impacting mammary gland health by using or not using antibiotic dry-cow therapy. Additionally, supplements such as *Energy Supplements*, *Calcium Supplements*, *Vitamin D3 Supplements*, and further *Vitamin and Trace Element Supplements* and *Monensin* given shortly before, during, or shortly after calving were provided, possibly impacting nutritional and immune status. The following aspects were assigned to cow related variables: Cows were categorized as primi-, secondi-, or multiparous in the variable parity. Length of the dry period was provided partly in weeks during the on-site survey and calculated in days and can therefore deviate slightly. The first lactation age was calculated as the difference between calving date of first calving and the cows' birthdate, providing the following categories: low first lactation age therefore is less than or equal to 700 days, medium between 701 and 750 days, and high more than 750 days, taking into consideration that milk yield and ingredients can differ between these groups [30]. The four calving seasons enable us to investigate potential seasonal variations in dairy cow health, while spring is defined as calving date between March and May, summer between June and August, autumn between September and November, and winter between December and February. This variable not only refers to the calving itself, but also allows us to explore whether specific health events were more prevalent during certain times of the year. Finally, risk of ketosis provides a conclusion on the ketotic metabolic status, determined by the milk components on the first day of milk recording. Ketotic risk was assumed if the fat-protein-ratio exceeds 1.4 and the lower limits of protein content are undercut or upper limits of fat content are passed. Limits were calculated according to Glatz-Hoppe et al. [31]. Assessing the risk of ketosis in this critical period was aimed at predicting and mitigating potential metabolic disruptions affecting the cows' health.

2.6. Statistical Analyses

The software R version 4.3.1 and R Studio were used for statistical analyses [32]. Descriptive analysis of dataset 1 for the categories transition periods without vaccination during the dry period (NON VACC) and transition periods with prior vaccination (VACC) was undertaken. All eligible variables were examined for any possible influence on the response variables mastitis, SCC, ECM FTD, and ECM 305 in univariable analysis. The variables in question were further checked for missing value patterns. Generalized mixed-effects models were executed using the lme4- package. The variables herd and calving year were considered as nested random effects. Given the nested structure of the data involving

herds and calving years, different combinations of random effects in mixed-effects models were assessed to determine the most suitable formulation based on Akaike's Information Criterion. The p -value threshold was adjusted in accordance with Goods' recommendations for large number of observations [33]. By applying the function

$$f(x) = \frac{0.05}{\sqrt{\frac{x}{100}}},$$

the p -value of each model outcome could be evaluated, resulting in significance thresholds between 0.0158 for dataset 1 and 0.0014 for dataset 2. All variables that were significant in the univariable generalized mixed-effects regression of the response variables mastitis and SCC, according to Goods' p -value threshold, were further included in the subsequent multivariable analysis. When preparing the multivariable analysis for the response variables ECM FTD and ECM 305, it soon became clear that variables other than the vaccination-related parameters overlapped with the results. Furthermore, missing value patterns foreclosed multivariable analysis. Therefore, dataset 2, a subset of dataset 1, was elaborated, reducing influencing variables. The available disease-associated variables, mastitis, SCC above 100,000, retained placenta, metritis, and ketotic risk were used to exclude diseased cows, as these are known influencing factors on milk yield [34,35]. Parity, another known influencing variable on milk yield and the periparturient cow's immune system [22,36,37] proved to be significant in the univariable analysis of the present study. Thus, parity was reduced to primiparous cows. Furthermore, the pairing of VACC and NON VACC on four alternately vaccinating farms was conducted to further control confounding effects. In addition, only data in the period of twelve months before and after change in vaccination management was selected to minimize the influence of calving year. With dataset 2, containing primiparous, utmost healthy cows from alternately vaccinated herds, univariable and multivariable analysis was carried out. Quantile regression was conducted to model the relationship between predictor variables and median of the response variable. Additional broadening of the analysis with the random forest-algorithm [38] was conducted in order to obtain a ranking of importance of influencing variables for mastitis and SCC, including herd and calving year, previously inserted as random effects.

3. Results

3.1. Descriptive Summary: Vaccination Management in Participating Herds and Key Figures

Dataset 1, consisting of 120,394 transition periods could be divided into 57,166 NON VACC and 63,228 VACC. These transition periods were distributed across non-vaccinated, continuously vaccinated, and alternately vaccinated herd (Table 1).

Despite retrospectively adapting the groups according to the specification of vaccination periods through on-farm data collection, NON VACC and VACC are comparable in mammary health and milk yield parameters (Table 2). The overall mastitis prevalence was 6.2% (VACC 6.6%, NON VACC 5.8%). Overall median SCC was 69,000 (VACC 73,000; NON VACC 65,000). In VACC cows, the median ECM FTD was 37 kg and ECM 305 was 9739 kg, compared to 36 kg ECM FTD and 9597 kg ECM 305 in NON VACC cows. The overall median ECM FTD was 37 kg, ECM 305 was 9674 kg. Dataset 2 represents a subset of dataset 1, containing 1002 transition periods from 1002 primiparous, utmost healthy cows in four alternately vaccinated herds, thereof 525 NON VACC and 477 VACC. In dataset 2, the overall median SCC is 49,000 (VACC 50,000; NON VACC 47,000), ECM 305 8748 kg (VACC 8797 kg; NON VACC 8696 kg), and ECM FTD 29.9 kg (VACC 30; NON VACC 29.8).

Table 1. Numbers of transition periods in individual herds with different vaccination management.

Dataset 1		
	NON VACC ^a (<i>n</i> = 57,166)	VACC ^b (<i>n</i> = 63,228)
Non-vaccinated herds ^c		
1a	8791	0
1b	4459	0
1c	1902	0
1d	3531	0
1e	821	0
1f	636	0
1g	3231	0
1h	5476	0
Continuously vaccinated herds ^d		
2a	0	1305
2b	0	2387
2c	0	8093
2d	0	7429
2e	0	18,453
Alternately vaccinated herds ^e		
3a	1744	1545
3b	3128	5807
3c	4137	227
3d	969	6885
3e	1478	327
3f	9182	5555
3g	5847	4007
3h	1834	1208
Dataset 2		
	NON VACC ^a (<i>n</i> = 525)	VACC ^b (<i>n</i> = 477)
Alternately vaccinated herds ^e		
3a	159	109
3d	137	142
3f	141	141
3g	88	85

^a no vaccination during the dry period; ^b vaccination between 2.5 and 8 weeks before expected calving date; ^c herds without vaccinations within the dry period; ^d herds with continuous prepartum vaccinations; ^e herds with prepartum vaccinations of parts of the herd or during defined time periods of time.

Table 2. Descriptive summary—mammary health and milk yield in herds with different prepartum vaccination statuses.

Dataset 1			
	Prepartum Vaccination Status		
	Overall (<i>n</i> = 120,394)	NON VACC ^a (<i>n</i> = 57,166)	VACC ^b (<i>n</i> = 63,228)
Mastitis, %	6.2%	5.8%	6.6%
SCC ^c , median (IQR ^d)	69 (34–184)	65 (32–174)	73 (36–196)
Unknown	27,839	10,136	17,703
ECM 305 ^e , median (IQR ^d)	9674 (7884–11,236)	9597 (7851–11,352)	9739 (7914–11,161)
Unknown	5431	2648	2783
ECM FTD ^f , median (IQR ^d)	37 (30–44)	36 (29–44)	37 (30–44)
Unknown	27,839	10,136	17,703

Table 2. Cont.

	Dataset 2		
	Prepartum Vaccination Status		
	Overall (n = 1002)	NON VACC ^a (n = 525)	VACC ^b (n = 477)
SCC ^c , median (IQR ^d)	49 (32–69)	47 (29–68)	50 (34–69)
ECM 305 ^e , median (IQR ^d)	8748 (7351–9911)	8696 (7190–9833)	8797 (7506–10,004)
ECM FTD ^f , median (IQR ^d)	29.9 (26.6–33.3)	29.8 (26.9–33.2)	30.0 (26.4–33.5)

^a no vaccination during the dry period; ^b vaccination between 2.5 and 8 weeks before expected calving date; ^c somatic cell count on the first day of milk recording (in thousand); ^d interquartile range; ^e Energy corrected milk yield in 305 days lactation in kg; ^f Energy corrected milk yield on the first day of milk recording in kg.

3.2. Prepartum Vaccination Was Not Significantly Associated with Mammary Health Parameters

To identify significant influencing parameters for the response variables mastitis and SCC, univariable mixed-effects logistic regression was performed, taking into account the available meaningful variables. In both analyses, the likewise significant variables, herd and calving year, were applied as random effects in a nested structure. Mastitis was significantly associated with parity, calving season, and access to pasture. For the SCC, the variables parity, calving season, flooring, and farm size emerged as significant. All of these significant variables were further included for multivariable mixed-effects regression to investigate the influence of prepartum vaccination on mastitis and SCC. Multivariable analyses revealed that prepartum vaccination had no significant influence on both mastitis prevalence (Table 3) and SCC (Table 4).

Table 3. Association between prepartum vaccination status and mastitis prevalence in multivariable linear mixed-effects logistic regression.

Variables	OR ^a	95% CI ^b	p-Value ^c
Prepartum vaccination status VACC ^d /NON VACC ^e	0.99	0.86, 1.14	0.869
Parity			
secondiparous/primiparous	0.73	0.66, 0.80	<0.001
multiparous/primiparous	1.30	1.20, 1.40	<0.001
multiparous/secondiparous	1.78	1.64, 1.94	<0.001
Access to pasture ^f yes/no	1.85	1.61, 2.12	<0.001
Calving season			
summer/spring	1.32	1.21, 1.44	<0.001
autumn/spring	1.00	0.91, 1.10	>0.999
autumn/summer	0.76	0.70, 0.83	<0.001
winter/spring	0.96	0.87, 1.06	0.681
winter/summer	0.73	0.67, 0.79	<0.001
winter/autumn	0.96	0.87, 1.05	0.577

^a odds ratio for pairwise contrasts; ^b confidence interval; ^c significant effects are marked in bold-threshold: 0.0014;

^d vaccination between 2.5 and 8 weeks before expected calving date; ^e no vaccination during the dry period;

^f access to pasture during dry period; herd and calving year were applied as random effects.

Table 4. Prepartum vaccination status and somatic cell count ^a in multivariable linear mixed-effects regression.

	Model Estimates	95% CI ^b	p-Value ^c
Prepartum vaccination status VACC ^d -NON VACC ^e	−0.06	−0.12, 0.00	0.036
Parity			
secondiparous-primiparous	−0.18	−0.22, −0.15	<0.001
multiparous-primiparous	0.23	0.20, 0.26	<0.001
multiparous-secondiparous	0.41	0.38, 0.44	<0.001

Table 4. Cont.

	Model Estimates	95% CI ^b	p-Value ^c
Flooring deeplitter–slatted floor	0.16	0.11, 0.21	<0.001
Herds size ^f			
small–medium	−0.20	−0.40, −0.00	0.050
large–medium	−0.31	−0.52, −0.10	0.001
large–small	−0.11	−0.36, 0.14	0.551
Calving season ^g			
summer–spring	0.15	0.11, 0.19	<0.001
autumn–spring	−0.01	−0.05, 0.03	0.971
autumn–summer	−0.16	−0.19, −0.12	<0.001
winter–spring	−0.03	−0.07, 0.01	0.171
winter–summer	−0.18	−0.22, −0.14	<0.001
winter–autumn	−0.02	−0.06, 0.01	0.339

^a somatic cell count was logarithmically transformed; ^b confidence interval; ^c significant effects are marked in bold-threshold: 0.0014; ^d prepartum vaccination during the dry period; ^e no vaccination during the dry period; ^f annual total number of cows in herd, segmented into categories small [184, 987], medium [890, 1275], and large [1276, 2625]; ^g spring (March–May), summer (June–August), autumn (September–November), winter (December–February); herd and calving year were applied as random effects.

3.3. Prepartum Vaccination Was Not Significantly with Milk Yield in Healthy Primiparous Cows

Univariable linear mixed-effects models showed higher ECM FTD and ECM 305 in VACC, compared to NON VACC (Table S1). Multivariable analysis was not possible with the same dataset due to missing values resulting from the initial joint of herd and milk records. As a solution, dataset 2 was created to reduce the number of missing values and control confounding variables. Here, available disease-associated variables, such as *mastitis*, SCC above 100,000, *retained placenta*, *metritis*, and *ketotic risk* were used to exclude diseased cows. Further, only four herds that were vaccinated alternately were taken into account to allow for a comparison between VACC and NON VACC cows in more identical environments. Additionally, the data were limited to the time period of twelve months before and after change in vaccination management. With primiparous, utmost healthy cows from alternately vaccinated herds, univariable and multivariable analysis was performed. No significant influence of prepartum vaccination on milk yield parameters could be confirmed in these more ideal conditions, neither in uni- nor in multivariable models. However, the variable *replacement rate* remained significant for ECM 305 and ECM FTD, as well as the rest period for ECM 305 (Table 5).

Table 5. Prepartum vaccination status and energy corrected milk yield in multivariable linear mixed-effects logistic regression.

	ECM 305 ^a			ECM FTD ^b		
	Model Estimates	95% CI ^c	p-Value ^d	Model Estimates	95% CI ^c	p-Value ^d
Prepartum vaccination status VACC ^e –NON VACC ^f	5.0	−224, 234	0.966	−0.42	−0.99, 0.15	0.148
Replacement rate	−65	−88, −42	<0.001	−0.15	−0.21, −0.09	<0.001
Rest period ^g	14	8.3, 21	<0.001			

^a energy corrected milk yield in 305 days of lactation; ^b energy corrected milk yield on first day of milk recordings; ^c confidence interval; ^d significant effects are marked in bold-threshold: 0.0158; ^e prepartum vaccination during the dry period; ^f no vaccination during the dry period; ^g rest period was only applied for response variable ECM 305 due to temporal overlap with ECM FTD; herd was applied as random effect.

Quantile regression models for four individual herds clarified that other factors, such as *herd* itself, have a higher influence on milk yield parameters than the prepartum vaccination status in healthy primiparous cows (Figure 2).

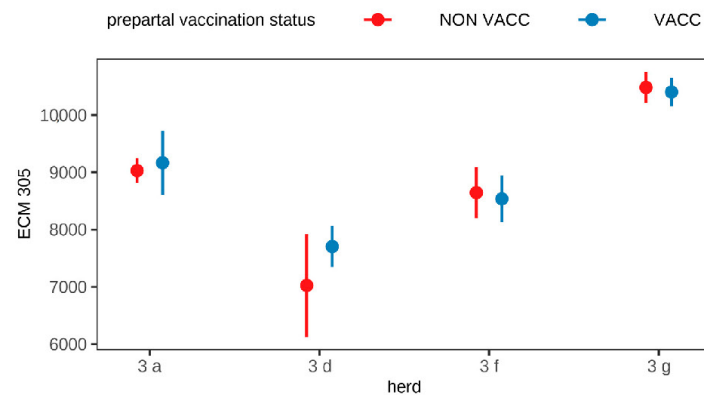


Figure 2. Median energy corrected milk yield in 305 days of lactation (ECM 305) of four herds (Table 1: 3a, 3d, 3f, 3g), comparing prepartum vaccinated (VACC) and non-vaccinated (NON VACC) cows in quantile regression. The error bars display 95% confidence intervals.

3.4. Herd Management Related Factors Were Most Relevant for Mammary Health

In order to broaden the analysis for the mammary health parameters *mastitis* and SCC, random forest-analysis was performed. With this machine-learning algorithm, influencing variables were ranked by importance, allowing for the comparison between all variables, including *herd* and *calving year*, which were applied as random effects in previous analyses of the study. Findings suggest that herd management-related parameters are the most relevant influencing factors for both response variables, either directly as *herd* or indirectly as *calving year* and *farmsize*. *Parity* proved to be among the top three influencing variables. Prepartum vaccination status, however, takes the last or second last place in this ranking (Figure 3).

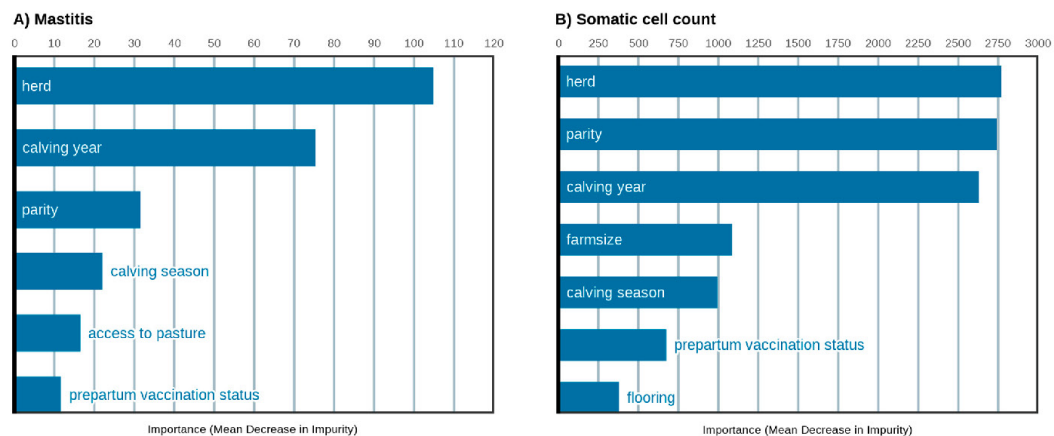


Figure 3. Ranking of importance of influencing variables on (A) mastitis prevalence and (B) somatic cell count by a random forest model. The importance of the predicted variable is represented by the mean decrease in impurity, which is the reduction in uncertainty in the model. Importance is associated with the ability to predict the response variable.

4. Discussion

The high incidence of postpartum infectious diseases of the cow poses challenges for the current dairy industry. During the transition period, defined as three weeks before until three weeks after parturition [39,40], the dairy cow's health is challenged and typical disease symptoms accumulate. Mastitis, metritis, ketosis, digestive disorders, and laminitis have their highest incidences during early lactation [41–43]. The mammary gland is particularly susceptible to pathogens during colostrogenesis [44]. Mammary disorders negatively affect animal welfare, milk yield, and the financial situation of the dairy farm, especially in early lactation [23]. Reasons for mammary disorders may originate from a poorly regulated, dysregulated, or suppressed immune system [11,45,46]. Therefore, ways are needed to modulate the immune system of the transition cow to cope better with infectious pathogens. An attractive possibility could be a vaccine-induced modulation of the immune system. The vaccination-induced mediator release after an initial activation of innate immune processes may have mid- or long-term effects on subsequent immune mechanisms depending on the duration of mediator-mediated epigenetic modifications in various cell types [15]. Although vaccine-mediated epigenetic alterations were reported for distinct vaccines, it remains unknown whether contemporarily used prepartum vaccinations against NCD are able to induce such NSEs in cows.

In this context, it was investigated whether the prepartum vaccination against NCD of pregnant cows has an impact on the prevalence of mastitis, the somatic cell count, and the short- and long-term milk production post-partum (p.p.). In univariable analysis, no significant associations between prepartum vaccination and mammary health could be found, but higher ECM FTD and ECM 305 in VACC was observed. However, multivariable analysis clearly showed that prepartum vaccination had no effect, neither on the mastitis prevalence (Table 3), the SCC (Table 4), nor the milk yield (Table 5). These findings mirror, in part, those of Scott et al. [18], who found no effect on milk yield after vaccination with a core antigen vaccine against Gram-negative bacteria, although it contained a dedicated immune-enhancing/-modulating adjuvant (ENDOVAC-Dairy® with Immune Plus, Endovac Animal Health, Columbia, USA). Our findings argue against a non-specific effect of prepartum cow vaccination with the NCD vaccines applied. Such non-specific effects were reported by others after vaccination of heifers with a live-attenuated BCG-strain [20]. Vaccination with this well-characterized, non-specific effect-inducing live vaccine resulted in higher milk yields in the first 100 days p.p. Another study reported on a farm-specific reduction in mastitis incidence after prepartum intranasal vaccination of dairy cows with a virus live vaccine [47]. The use of inactivated killed vaccine in dataset 2 suggests that the attenuated strains in the NCD vaccines may not have been able to induce the same mechanisms as the BCG vaccine or the intranasally administered modified live vaccine against BRSV and PI3. The influence of vaccine type and adjuvant was evaluated only in udder health analysis, where two different killed vaccines and one live vaccine with different adjuvant combinations were applied. However, no significant effects were observed. These findings are in contrast to Cortese et al. [47], where milk yield losses were reported after vaccination with an inactivated *Coxiella burnetii* vaccine containing no dedicated adjuvant [19]. Thus, the interaction of the cows with *Coxiella*-derived molecules could have induced a response leading to an altered secretion or synthesis capacity of mammary epithelial cells and strengthen the hypothesis that vaccine-induced mechanisms can have non-specific effects in cows. The comparison of the three mentioned studies with ours is limited as methodologies differed. In addition to different vaccine types and used adjuvants, prepartum vaccination was only performed by Retamal et al. [20], whereas Scott et al. [18] and Schulze et al. [19] vaccinated cows during lactation. A closer look at statistical methods and thorough examination of multiple predictors is substantial to

reveal possible confounding events. In the present study, methodological reduction to univariable analysis would have resulted in higher milk yields of vaccinated cows, leading to spurious correlation.

Through multivariable analysis, the effect of prepartum vaccination on milk yield was more accurately determined by excluding disease-associated variables and limiting the analysis to primiparity, which are commonly addressed variables in the analysis of herd records from transition cows [22]. Pairing lactations by matching VACC and NON VACC from the same herd allows for a more confident attribution of the differences between the groups to the actual exposure. Quantile regression provided insight into the interactions with other predictors. Here, the difference in milk yield between the herds was higher than between VACC and NON VACC. Similarly, the effect of prepartum vaccination had opposite effects depending on the herd. The random forest machine learning-algorithms, a model robust to multicollinearity of variables, facilitated the ranking of importance of influencing factors. While *herd* and *calving year* were considered random effects in regression models, random forest-analysis makes them comparable with other influencing variables. This study concludes that there were no significant effects of prepartum vaccination on milk yield. In the study of Retamal et al. [20]—according to the author’s assessment—these other influencing factors cannot be ruled out, as rather simple analysis was performed on milk yield variables with contingency tables and the Wilcoxon–Mann–Whitney test. In Schulze et al. [19] and Scott et al. [18], similar statistical methodologies as in the present study were applied with linear mixed-effects models. Multiple influencing variables were considered; therefore, results are statistically more comparable to Schulze et al. [19] and Scott et al. [18] but still limited, according to the different study designs. Generalized linear mixed models have proven to be a good and flexible method, especially for transition cow analysis [22].

A large number of observations lay the foundation for statistical power, enhances the precision of analysis, and enables thorough investigation of subgroups and variables to control confounders. Simultaneously, large datasets entail several challenges. While even small effects can be discovered, the probability of type I errors and therefore false positive significant effects is increased. For this reason, the *p*-value threshold was adjusted in accordance with Goods’ [33] recommendations, resulting in higher hurdles of significance. Herd records and their retrospective nature, especially diagnostic data, bear the potential for documentation variability. On all farms, health management is conducted in close collaboration with the attendant veterinarians, diagnostics of acute diseased animals are performed by veterinarians, but identification of frequently occurring diseases, such as mastitis, is usually subject to standard operating procedures of the farm and subsequently documented by managing or milking staff. Therefore, misclassification and differences in documentation between the farms, and, respectively, herds, cannot be ruled out and might compromise accuracy and consistency. Hence, there is a risk that, for instance, high numbers in mastitis documentation on a farm do not inevitably represent actual high occurrence of mastitis but originate in precise documentation of e.g., subclinical mastitis. Precise documentation might lead to false high diagnostic frequency, whereas not recognized diseases due to farm management or inconsistent health documentation might lead to false low incidences. The discussion also considered whether the overall quality of farm management influenced the decision to vaccinate cows. It is unclear which direction this potential bias may take. On one hand, farms with excellent health management and superior animal health status may choose to vaccinate cows as a precautionary measure. On the other hand, farms with poorer health management may vaccinate cows to address the animals’ poor health status.

Recognizing these possible variances across herds and risks of biased data as limitations of this study, comprehensive data pre-processing and validation procedures were implemented. First, to gain a deeper understanding of the data and verify the comparability of herds, on-site farm visits were conducted. These visits were usually accompanied by the local veterinarians who could provide an assessment of herd management over the past years and therefore beyond the time of the on-site-survey. It is noteworthy that all included farms share a common history as former Agricultural Production Cooperatives in the German Democratic Republic until 1989, making them more comparable than other farms in Germany but not entirely eliminating heterogeneity in management practices. Secondly, an exploratory analysis of herd management-related variables was conducted for each herd using contingency tables to better differentiate between systematic and random errors. Thirdly, the diagnostic documentation for each herd across years and months was examined, comparing different diagnostic results with overall patterns to understand and interpret the trends in health documentation and anticipate documentation variability. However, the retrospective nature of the data and the reliance on farm-level documentation practices remain limitations that could affect accuracy. On some of the farms, more detailed diagnostic data are available with subordinate terms, such as the subdivision of mastitis into forms of inflammation or pathogen etiology. It was agreed upon the utilization of the generic term mastitis as the least common denominator of diagnostic health documentation across all herds. After excluding inconsistent time periods (e.g., initial phase/first year of health documentation in a herd, allowing time for familiarization), diagnostic health documentation of mastitis was assessed reliable for analysis. Findings of overall exploratory analysis suggest that the variables *herd* and *calving year* inherit high influence on *mastitis* and other variables, consequently these were included as random effects in the subsequent linear mixed-effects regression. Nevertheless, the potential for unmeasured confounders cannot be completely ruled out. Additional to mastitis, further robust and objective variables, which are less susceptible to variations in documentation, were incorporated. Originating from automated milk testing, SCC and milk yield parameters are hardly affected by humans. Thus, the authors regard such variables as more robust than *mastitis*. Given that milk recordings occur at monthly intervals on the respective farms, the variability in DIM among data points raises concerns about the comparability of the groups. To address this issue, the average milk performance was investigated in relation to the average DIM on the day of milk testing. Our findings suggest that the observed increase in average milk performance does not exceed the contrast estimates obtained through univariable analysis. As a result, it was concluded that the differing timing of data collection did not significantly impact the results. Despite these measures, the retrospective nature and inherent variability of the dataset introduce some limitations to the study's explanatory power. Moreover, the scope of the study was limited to three specific vaccine products and to the mammary gland, which may not capture all effects of other prepartum vaccinations or impacts on other organ systems.

The findings underline the importance of herd management-related factors. This work provides insights from a large database in the field, particularly for the German dairy industry. The focus is on study design and statistical methodology. Further research is needed to explore the potential impact of vaccination on other infectious diseases, as well as any correlations with other organ systems and production metrics

5. Conclusions

The prepartum vaccination of cows with neonatal calf diarrhea using three different commercial products did not affect milk production, somatic cell count, and the incidence of mastitis. Thus, this study does not provide significant evidence for NSE of prepartum

maternal vaccination against NCD for cow mammary health and milk yield parameters. It remains to be further elaborated whether vaccination ingredients, such as live or attenuated vaccines, as well as adjuvants, play a role in NSEs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani15020203/s1>, Table S1: Prepartum vaccination status and energy corrected milk yield in univariable linear mixed-effects logistic regression; Table S2: Composition, definition and source of response and independent variables, applied in the study; File S1: survey (English translation).

Author Contributions: Conceptualization, H.Z., H.-J.S., Y.Z. and C.K.; methodology, Y.Z. and A.R.; software, C.K. and Y.Z.; validation, H.Z., H.-J.S., Y.Z. and A.R.; formal analysis, C.K. and Y.Z.; investigation, C.K.; resources, D.K.-v.E. and C.W.; data curation, C.K.; writing—original draft preparation, C.K.; writing—review and editing, H.Z., H.-J.S., Y.Z., A.R., D.K.-v.E., C.W., M.R. and A.S.; visualization, C.K.; supervision, Y.Z., H.Z. and H.-J.S.; project administration, C.K., H.Z., M.R. and A.S.; funding acquisition, H.Z., M.R. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Intervet Deutschland GmbH (Funding number: E-00065098).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank all participating farmers for their time and for providing valuable insights into their herds.

Conflicts of Interest: Authors Debby Kraatz-van Egmond and Claudia Wesenauer were employed by the company RinderAllianz GmbH. Authors Martina Resch and Alexander Stoll were employed by the company Intervet Deutschland GmbH. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Viidu, D.-A.; Mõtus, K. Implementation of a pre-calving vaccination programme against rotavirus, coronavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (F5) and association with dairy calf survival. *BMC Vet. Res.* **2022**, *18*, 59. [CrossRef] [PubMed]
- Gonzalez, R.; Elvira, L.; Carbonell, C.; Vertenten, G.; Fraile, L. The Specific Immune Response after Vaccination against Neonatal Calf Diarrhoea Differs between Apparent Similar Vaccines in a Case Study. *Animals* **2021**, *11*, 1238. [CrossRef] [PubMed]
- Durel, L.; Rose, C.; Bainbridge, T.; Roubert, J.; Dressel, K.-U.; Bennemann, J.; Rückner, A.; Vahlenkamp, T.; Maillard, R. Immune response of mature cows subjected to annual booster vaccination against neonatal calf diarrhoea with two different commercial vaccines: A non-inferiority study. *Livest. Sci.* **2017**, *204*, 52–58. [CrossRef] [PubMed]
- Smith, B.I.; Rieger, R.H.; Dickens, C.M.; Schultz, R.D.; Aceto, H. Anti-bovine herpesvirus and anti-bovine viral diarrhoea virus antibody responses in pregnant Holstein dairy cattle following administration of a multivalent killed virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* **2015**, *76*, 913–920. [CrossRef] [PubMed]
- Vidlund, J.; Gelalcha, B.D.; Gillespie, B.E.; Agga, G.E.; Schneider, L.; Swanson, S.M.; Frady, K.D.; Kerro Dego, O. Efficacy of novel staphylococcal surface associated protein vaccines against *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vaccine* **2024**, *42*, 1247–1258. [CrossRef]
- Miličević, V.; Veljović, L.; Maksimović-Zorić, J.; Žutić, J.; Kureljučić, B.; Radosavljević, V.; Jezdimirović, N.; Radojičić, S. Some adverse events following immunization in veterinary medicine. *Arch. Vet. Med.* **2018**, *11*, 67–77. [CrossRef]
- Kim, J.; Kim, D.; Noh, H.; Hong, L.; Chun, E.; Kim, E.; Ro, Y.; Choi, W. Analysis of Acute Phase Response Using Acute Phase Proteins Following Simultaneous Vaccination of Lumpy Skin Disease and Foot-and-Mouth Disease. *Vaccines* **2024**, *12*, 556. [CrossRef] [PubMed]

8. Institute of Medicine. *Adverse Effects of Vaccines: Evidence and Causality*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2012.
9. Arega, S.M.; Knobel, D.L.; Toka, F.N.; Conan, A. Non-specific effects of veterinary vaccines: A systematic review. *Vaccine* **2022**, *40*, 1655–1664. [CrossRef]
10. Benn, C.S.; Fisker, A.B.; Rieckmann, A.; Sørup, S.; Aaby, P. Vaccinology: Time to change the paradigm? *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e274–e283. [CrossRef] [PubMed]
11. Weikard, R.; Demasius, W.; Hadlich, F.; Kühn, C. Different Blood Cell-Derived Transcriptome Signatures in Cows Exposed to Vaccination Pre- or Postpartum. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136927. [CrossRef]
12. Demasius, W.; Weikard, R.; Hadlich, F.; Müller, K.E.; Kühn, C. Monitoring the immune response to vaccination with an inactivated vaccine associated to bovine neonatal pancytopenia by deep sequencing transcriptome analysis in cattle. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 93. [CrossRef] [PubMed]
13. Byrne, K.A.; Loving, C.L.; McGill, J.L. Innate Immunomodulation in Food Animals: Evidence for Trained Immunity? *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1099. [CrossRef] [PubMed]
14. Amir, M.; Zeng, M.Y. Immune imprinting in utero. *Science* **2021**, *373*, 967–968. [CrossRef] [PubMed]
15. Geckin, B.; Konstantin Föhse, F.; Domínguez-Andrés, J.; Netea, M.G. Trained immunity: Implications for vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* **2022**, *77*, 102190. [CrossRef]
16. Kleinnijenhuis, J.; Quintin, J.; Preijers, F.; Joosten, L.A.B.; Ifrim, D.C.; Saeed, S.; Jacobs, C.; van Loenhout, J.; Jong, D.; Stunnenberg, H.G.; et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17537–17542. [CrossRef] [PubMed]
17. Ziogas, A.; Netea, M.G. Trained immunity-related vaccines: Innate immune memory and heterologous protection against infections. *Trends Mol. Med.* **2022**, *28*, 497–512. [CrossRef] [PubMed]
18. Scott, H.M.; Sargeant, J.M.; Ireland, M.J.; Lissemore, K.D.; Leslie, K.E.; Kelton, D.F.; Mallard, B.A. Effects of a core antigen vaccine against gram-negative bacteria on physiologic and yield parameters of dairy cows during late lactation and the dry period. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 1928–1935. [CrossRef]
19. Schulze, L.S.C.; Borchardt, S.; Ouellet, V.; Heuwieser, W. Effect of a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine on body temperature and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 541–550. [CrossRef]
20. Retamal, P.; Ábalos, P.; Alegría-Morán, R.; Valdivieso, N.; Vordermeier, M.; Jones, G.; Saadi, K.; Perez Watt, C.; Salinas, C.; Ávila, C.; et al. Vaccination of Holstein heifers with *Mycobacterium bovis* BCG strain induces protection against bovine tuberculosis and higher milk production yields in a natural transmission setting. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 1419–1425. [CrossRef]
21. Gilbert, R.O.; Gröhn, Y.T.; Miller, P.M.; Hoffman, D.J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1993**, *36*, 75–82. [CrossRef] [PubMed]
22. Wisniewski, L.; Norby, B.; Pierce, S.J.; Becker, T.; Sordillo, L.M. Prospects for predictive modeling of transition cow diseases. *Anim. Health Res. Rev.* **2019**, *20*, 19–30. [CrossRef] [PubMed]
23. Hagness, C.; Emanuelson, U.; Berglund, B. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2260–2270. [CrossRef]
24. Doggweiler, R.; Hess, E. Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter. *Milchwissenschaft* **1983**, *38*, 5–8.
25. Hamann, J.; Fehlings, K. *Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem*, 4th ed.; Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) Fachgruppe “Milchhygiene”: Gießen, Germany, 2002.
26. Spiekens, H.; Potthast, V. *Erfolgreiche Milchviehfütterung*, 4th ed.; DLG-Verlag: Frankfurt am Main, Germany, 2004.
27. Nyman, A.K.; Emanuelson, U.; Waller, K.P. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 1440–1448. [CrossRef]
28. Cook, N.; Reinemann, D. A Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene. In Proceedings of the National Mastitis Council, Madison, WI, USA, 21–24 January 2007; pp. 31–43.
29. Menichetti, B.T.; Garcia-Guerra, A.; Lakritz, J.; Weiss, W.P.; Velez, J.S.; Bothe, H.; Merchan, D.; Schuenemann, G.M. Effect of timing of prepartum vaccination relative to pen change with an acidogenic diet on lying time and metabolic profile in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 11059–11071. [CrossRef]
30. Ettema, J.F.; Santos, J.E.P. Impact of Age at Calving on Lactation, Reproduction, Health, and Income in First-Parity Holsteins on Commercial Farms. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 2730–2742. [CrossRef] [PubMed]
31. Glatz-Hoppe, J.; Losand, B.; Kampf, D.; Onken, F.; Spiekens, H. Nutzung von Milchkontrolldaten zur Fütterungs- und Gesundheitskontrolle bei Milchkühen. Available online: <https://www.dlg.org/de/landwirtschaft/themen/tierhaltung/futter-und-fuetterung/dlg-merkblatt-451> (accessed on 9 December 2024).
32. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2023.
33. Good, I.J. The Interface Between Statistics and Philosophy of Science. *Stat. Sci.* **1988**, *3*, 386–397. [CrossRef]
34. Hagness-Nielsen, C.; Emanuelson, U.; Berglund, B.; Strandberg, E. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 3124–3133. [CrossRef]

35. Heikkilä, A.M.; Liski, E.; Pyörälä, S.; Taponen, S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 9493–9504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, J.-Y.; Kim, I.-H. Advancing parity is associated with high milk production at the cost of body condition and increased periparturient disorders in dairy herds. *J. Vet. Sci.* **2006**, *7*, 161–166. [[CrossRef](#)]
37. Ohtsuka, H.; Terasawa, S.; Watanabe, C.; Kohiruimaki, M.; Mukai, M.; Ando, T.; Petrovski, K.R.; Morris, S. Effect of parity on lymphocytes in peripheral blood and colostrum of healthy Holstein dairy cows. *Can. J. Vet. Res.* **2010**, *74*, 130–135.
38. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* **2001**, *45*, 5–32. [[CrossRef](#)]
39. Grummer, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* **1995**, *73*, 2820–2833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Drackley, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* **1999**, *82*, 2259–2273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ingvarsen, K.L.; Dewhurst, R.J.; Friggens, N.C. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* **2003**, *83*, 277–308. [[CrossRef](#)]
42. LeBlanc, S.J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Vet. J.* **2008**, *176*, 102–114. [[CrossRef](#)]
43. Mulligan, F.J.; Doherty, M.L. Production diseases of the transition cow. *Vet. J.* **2008**, *176*, 3–9. [[CrossRef](#)]
44. Pyörälä, S. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 252–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Trevisi, E.; Minuti, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *116*, 47–54. [[CrossRef](#)]
46. Sordillo, L.M.; Mavangira, V. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Anim. Prod. Sci.* **2014**, *54*, 1204. [[CrossRef](#)]
47. Cortese, V.S.; Pinedo, P.J.; Manriquez, D.; Velasquez-Munoz, A.; Solano, G.; Short, T.H.; Cleale, R.; Edwards, G.; Montgomery, T.; Pedraza, J.R.; et al. Effect of periparturient intranasal vaccination on post parturient health parameters in holstein cows. *Concepts Dairy Vet. Sci.* **2020**, *3*, 318–327. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV. WEITERE ERGEBNISDATEN:
MUTTERSCHUTZIMPFUNG GEGEN
NEUGEBORENENDURCHFALL UND IHRE
AUSWIRKUNGEN AUF DIE
GEBÄRMUTTERGESUNDHEIT UND FRUCHTBARKEIT
VON MILCHKÜHEN

**Non-specific effects of prepartum vaccination on uterine health
and fertility: A retrospective study on periparturient dairy cows.**

Caroline Kuhn^{1*}; Holm Zerbe¹; Hans-Joachim Schuberth²; Anke Römer³;

Debby Kraatz-van Egmond⁴; Claudia Wesenauer⁴; Martina Resch⁵;

Alexander Stoll⁵; Yury Zablotski¹

¹Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany; ²Institute for Immunology, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany; ³Mecklenburg-Vorpommern Research Centre for Agriculture and Fisheries, Institute of Livestock Farming, Dummerstorf, Germany; ⁴RinderAllianz GmbH, Woldegk, Germany; ⁵Intervet Deutschland GmbH, Unterschleissheim, Germany.

Abstract

Vaccination of the dam prior to parturition against newborn calf diarrhea (NCD) induces an antigen-specific adaptive immune response in dairy cows, which protects the calf during the first weeks of life via the colostrum. There is evidence that the vaccination-induced immune responses in the mother can also affect the susceptibility towards other stressors. These non-specific effects (NSE) of vaccinations can be related to both adaptive and innate immune mechanisms. Recent studies have identified both beneficial and adverse NSE of live vaccines and adverse NSE of non-live vaccines in humans and cattle, with the timing of vaccination also proving to be a significant factor. In dairy cows, the immune mechanisms that operate around calving play a pivotal role in determining postpartum uterine health and fertility. The question of whether prepartum vaccination against NCD affects the prevalence of postpartum uterine diseases and subsequent fertility has not been addressed so far.

In a retrospective cross-sectional study, we investigated the influence of prepartum vaccination on retained placenta, metritis, endometritis and non-return rate 56 (NRR56) in primiparous and multiparous dairy cows. The analysis focused on the effect of non-live versus mixed live/non-live vaccines and the timing of vaccination. Herd record data from 73,378 dairy cows from 20 farms located in eastern Germany, along with data collected through on-site surveys, were analyzed using linear mixed-effects regression and random forest machine learning algorithms.

The impact of herd management-related factors and milk yield on uterine health and fertility was more pronounced than that of prepartum vaccination. Compared to non-vaccinated cows, non-live vaccinated cows were 1.5-1.7 times more likely to develop retained placenta and metritis, and 3-6 times more likely to develop endometritis. The likelihood to be successfully inseminated was decreased by 20-24% in the non-live vaccinated cows. Among cows, vaccinated with a non-live vaccine, the NRR56 of cows vaccinated between 2.5 and 4 weeks prior to calving was significantly increased by 8% compared to cows vaccinated between 6 and 8 weeks prior to calving. Significant effects of mixed vaccination with live and non-

live components were observed only in multiparous cows, which were 1.9 times more likely to be successfully inseminated, compared to non-live vaccinated multiparous cows.

This study provides evidence of prepartum vaccination-induced NSE for the cow with small effect sizes, besides the specific antibody induction to improve neonatal calf health. Further research is required to elucidate the mechanisms of NSE in the critical periparturient phase of the dairy cow, with particular emphasis on the optimal timing for vaccination, the most efficacious vaccines and their components.

Introduction

Non-specific effects (NSE) of vaccination beyond an antigen-specific induction of antibodies and effector T cells can be related to both adaptive and innate immune mechanisms, such as heterologous T cell immunity and trained immunity [1]. The extent and nature of NSE are intensely debated, and both beneficial and adverse effects are reported [2]. Epidemiological studies of human vaccines have been well elaborated [1], and evidence of NSE have been shown especially for live-attenuated vaccines, such as Bacille Calmette-Guerin (BCG), measles, oral polio, and vaccinia [1]. In veterinary medicine, research is still lacking, especially for non-live vaccines [2]. Recently, the hypothesis, that that live vaccines have beneficial and non-live vaccines have detrimental NSE [3], has been confirmed in a systematic review [4]. In cattle, NSE have been demonstrated in calves where circulating myeloid cells displayed a trained functional phenotype after experimental BCG vaccination [5]. For non-live vaccines, an altered gene expression of circulating immune cells has been demonstrated in cows [6, 7].

Prepartum vaccinations of cows are used to protect calves from infectious diseases during the first weeks of life. They are considered safe for the dam [8, 9]. Although vaccination of pregnant women during the COVID-19 pandemic in general revealed no significant adverse effects, for the timing of vaccination remained unclear [10]. Timing of prepartum vaccination has rarely been examined, however, epidemiological data regarding measles and BCG vaccination of children suggest a crucial effect of timing for NSE [11, 12]. In dairy cows, timing of prepartum vaccination with two non-live vaccines against neonatal calf diarrhea (NCD) and mastitis and relative to pen change and acidogenic diet has been shown to affect

lying time, metabolic profile and immunoglobulins [13, 14]. Recently we showed that prepartum non-live vaccination against NCD has no significant effect on mammary health and milk yield [15]. Prepartum vaccination of cows takes place before or directly in the transition period, defined as three weeks before parturition to three weeks after parturition [16]. Thus, timing of prepartum vaccination may be an issue since the transition from a lactating cow to a dry cow is associated with altered immune cell functions [17, 18].

Depending on the time when pregnant cow immune cells change their functionality before parturition, initial innate immune responses to vaccinations may differ and hence the induced NSE after vaccination. Fine-tuned innate immune mechanisms are important already in the prepartum period [19] and dysregulated response extend into the postpartum period co-determining whether uterine contamination proceeds to recovery or to an infectious disease. The modulated immune system during the transition period is often seen as the key for postpartum uterine infectious diseases and subsequent fertility [20-23]. Retained placenta is defined as the failure to pass the fetal membranes within 24 hours, the remaining membranes are usually noticed in the first days postpartum [19]. While most metritis cases occur within the first ten days postpartum, a cut-off date between metritis and endometritis can be made on day 21 postpartum [24]. In the further discourse of the cows' production cycle, immune system and previous uterine disease co-determine if the cow was successfully inseminated [25].

If vaccinations alter the innate immune mechanisms, uterine disease susceptibility might also be affected. As timely discourse plays a role in the interface of innate immune mechanisms and uterine diseases and fertility, the time of vaccination, the timepoint of the parameter and the choice of a non-live or live vaccine could be decisive. The aim of this retrospective cross-sectional study was to analyze the effect of the prepartum vaccination against NCD on uterine health and fertility of the periparturient cow.

Materials and methods

Study population and farm selection

The breeding organization RinderAllianz (RA) obtained data from herd management programs of 20 dairy farms. Additionally, information regarding farm management practices was collected through an on-farm survey. Participation in the study was entirely voluntary, and all farms were anonymized. Prior to the initiation of the study, all farms provided written consent on farm-specific data to be used within the framework of this study. Throughout the study, the German and European data protection legislation was in effect. The questionnaires focused exclusively on farm management characteristics, and no personal or identifiable information about farmers was gathered. Consequently, the present study does not fall under the purview of human participants research, and the involvement of an ethics board and ethical approval was unnecessary at the time and in the country the study was conducted.

At the time point of data consolidation in June 2021, prepartum vaccination was performed on ten farms with each five high yielding (mean ECM 305 above 11,000kg) and five low yielding farms. The farms that were not currently vaccinating were subsequently classified according to their respective milk yield. Altogether, data comprises reproduction data of 148,268 lactations, milk recordings from 1,561,273 recordings, health documentation with 1,298,703 diagnoses and holding registers of 73,378 dairy cows of 22 herds between January 2007 and September 2020. After matching herd records with health documentation, milk records and the questionnaire conducted in this study, 53,370 dairy cows in 21 herds across 19 farms could be further included for analysis.

On-farm data collection

The questionnaire comprised information on vaccination history, dry-off management, housing system, health management, monitoring during birth, milking and colostrum management, hygiene and feeding management (Supplementary File 2, English translation). The local conditions and management practices were recorded through on-site farm visits between October 2021 and August 2022. One farm was surveyed online due to pandemic precaution-measures.

The inspection of the facilities revealed no issues pertaining to management or hygiene. Moreover, consultations were held with attending veterinarians, who confirmed the efficacy of the health management practices in place.

Data cleaning process

The software R version 4.3.1 was used to join, clean and ensure consistency in the datasets. On-site survey data were manually transferred from paper-based forms into ExcelTM-sheets and further integrated. Chronologic tailoring was applied in order to obtain the transition period of each cow as basis of observations. All further information was assigned as variables on an individual cow basis. Completeness of observations were sought by excluding those observations without available health documentation or reproduction information.

Elaboration of vaccination related parameters

Three vaccines were used for prepartum vaccinations. RC (Bovilis® Rotavec® Corona, Intervet, Unterschleißheim, Germany, containing inactivated bovine rotavirus (serotype G6 P5), inactivated bovine coronavirus (strain Mebus), E. coli (K99 Antigen), adjuvanted with mineral oil and aluminium hydroxide; n = 27,769). SG (Scourguard® 3, Zoetis, Berlin, Germany, containing live attenuated bovine rotavirus (strain Lincoln), live attenuated bovine coronavirus (strain Hansen), E.coli (K99 Antigen), adjuvanted with Alhydrogel; n = 8,352). BS (Bovigen® Scour, Forte Healthcare, Dublin, Ireland, containing inactivated bovine rotavirus (serotype G6 P1), inactivated bovine coronavirus (strain C-197), E. coli (K99 Antigen), adjuvanted with Montanide ISA 206 VG;); n=8,004). RC and BS are applied once and SG is applied twice, whereby the date of the first application was considered as time of vaccination. In 18,453 cases the vaccine product could not be associated. All observations with other vaccinations than prepartum vaccination against neonatal calf diarrhea were excluded. When a farm changed its vaccination management or didn't vaccinate for a distinct time period, the time period of one month (15 days prior to and 15 days after the date of change) was excluded from the dataset to minimize the risk of false entries. The original database, containing 73,378 cows on ten vaccinating farms and ten non-vaccinating farms, was finally adapted to 120,394 transition period of 53,370 cows on 19 farms and distributed across non-vaccinated, continuously vaccinated and alternately vaccinated herds.

Table S1 provides an overview of response and predictive variables, definitions, composition, and values.

Elaboration of uterine health and fertility parameters

Uterine health parameters were elaborated by aggregating diagnoses and based on the date of documentation. If multiple health events were documented within a time frame, the first was considered and counted. The criteria for retained placenta was met, when retained fetal membranes were documented until day 10 postpartum. Pertinent uterine diagnoses until 21 days postpartum were considered as metritis. Endometritis was defined between day 21 and 56 postpartum. Finally, retained placenta and metritis were aggregated in the variable *Retentio-metritis-complex* (RMC), as retained placenta is considered the greatest risk factor for metritis, and conversely, retained placenta often leads to metritis [19]. Summarizing uterine diagnoses is a common measure to improve diagnostic accuracy [26], furthermore, the focus on temporal course of this study suggested to summarize time-overlapping variables.

The *non-return rate on day 56* (NRR56) after first insemination was selected for response variable as a widely used fertility parameter. It is considered less biased than other fertility parameters such as the calving interval, because it includes primiparous and non-pregnant cows. It maintains comparability between herds, although the proportion of pregnant cows is usually overestimated [27].

Available cow and farm management related variables were selected and examined for influence on the response variables. Especially those, considered as well studied risk factors of uterine diseases [19, 28], were included in the analysis. Farm size, access to pasture, flooring, hygiene score, first lactation ages were tested as farm-related variables. Stillbirth, parity, time dry, ketosis risk, multiples, pen change, calf gender, calving season, ECM FTD, ECM 305 of the previous lactation, SCC, time to first service and calving interval as parameters related to the status of the cow and calving. Moreover, RMC and endometritis were incorporated as potential explanatory variables for the respective outcome variables, in accordance with their established role as significant risk factors for uterine disease and subsequent fertility [29, 30].

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with R version 4.3.1 [31]. An initial descriptive analysis was performed to provide an overview of the data structure, disease prevalence and fertility. The Random Forest algorithm [32] was conducted in order to obtain a ranking of the importance of the influencing variables. All eligible variables were examined for their influence on the response variables *RMC*, *Endometritis* and *NRR56* in the univariable generalized linear mixed effects models. Parity was one of the most significant variables, and those influencing variables originating in the previous lactation (*ECM305* and *calving interval*) were only available in multiparous cows, therefore multivariable models were divided into primiparous and multiparous. *Herd* and *calving year* were applied as random effects in mixed-effects models and examined as predictor in Random Forest models. A nested structure of these random effects was the most appropriate formulation based on the evaluations with the Akaike's information criterion. By applying the function

$$f(x) = \frac{0.05}{\sqrt{\frac{x}{100}}} [33]$$

to each model, with x = number of observations without missing values, an adapted significance threshold was created, to reduce the risk of false discoveries (type I error) due to high numbers of observations in the models. All variables, that were significant according to the adapted threshold in the univariable analysis were further included in the subsequent multivariable analysis. Manual backward selection was performed on variables below the adapted p-value threshold after multivariable analysis, while constantly comparing model performance. If Akaike's information criterion was two or more points lower, the variable was excluded.

Results

Vaccine type and time of vaccination

Out of the total 120,394 transition period in the dataset, 57,166 transition periods were without vaccination during the dry period (NON VACC). In 63,228 transition periods, the cows were vaccinated (VACC), hereof 35,773 with a non-live vaccine (NON LIVE), 8,352 with a vaccine containing live and non-live components (MIXED), and 19,103 with unknown type of vaccine (UNKNOWN). In 30,633

transition period, the vaccination was applied between 6 and 8 weeks before expected calving date (EARLY), in 14,169 transition period between 2.5 and 4 weeks before expected calving date (LATE) and in 18,426 transition period a vaccination was applied, but with unknown date within the dry period (EARLY or LATE) (Table 1).

Table 1: Numbers of transition periods by time of vaccination and type of vaccine.

Time of prepartum vaccination						
		NON VACC ^a	EARLY ^b	LATE ^c	EARLY or LATE ^d	Total
Type of vaccine	NON VACC ^a	57,166	0	0	0	57,166
			VACC ^h (N=63,228)			
	NON LIVE ^e	0	11,238	6,336	18,199	35,773
	MIXED ^f	0	519	7,833	0	8,352
	UNKNOWN ^g	0	18,876	0	227	19,103
Total		57,166	30,633	14,169	18,426	120,394

^ano vaccination during the dry period; ^bvaccination between 6 and 8 weeks before expected calving date; ^cvaccination between 2.5 and 4 weeks before expected calving date; ^dvaccination between 2.5 and 8 weeks before expected calving date; ^evaccination with vaccines containing only non-live components; ^fvaccination with a vaccine containing live and non-live components; ^gvaccination with unknown components; ^hvaccination with any type of vaccine during dry period.

Production metrics in vaccinated and non-vaccinated cows

Among primiparous cows, the proportion of vaccinated individuals was lower (41.3%) compared to multiparous cows (59.5%) (Table 2). Primiparous cows showed a lower ECM 305 yield and a shorter time to first service compared to multiparous cows. Within the primiparous group, ECM 305 yield was the same for both non-vaccinated and vaccinated cows (8,683 liters), with a slight difference in time to first service (73 days for non-vaccinated and 72 days for vaccinated cows). In the multiparous group, non-vaccinated cows had a higher ECM 305 yield (10,968

liters) compared to vaccinated cows (10,371 liters), while the time to first service was consistent at 75 days for both vaccinated and non-vaccinated groups.

Table 2: Means of milk yield and time to first service of prepartum vaccinated or non-vaccinated primiparous and multiparous cows.

	Primiparous cows		Multiparous cows	
	NON VACC ^a	VACC ^b	NON VACC ^a	VACC ^b
n:	27,081	19,028	30,085	44,200
ECM 305^c	8,683	8,683	10,968	10,371
Time to first service^d	73	72	75	75

^ano vaccination during the dry period; ^bvaccination during dry period; ^cenergy corrected milk yield in 305 days of lactation (kg); ^din days.

Milk yield, performance and herd management are most relevant for uterine health and fertility

Random Forest analysis was performed with all significant predictor variables from the univariable general linear mixed effects regression, including herd and calving year, which were previously applied as random effects. The ranking of variable importance showed that ECM 305 of the previous lactation, ECM FTD, herd, and calving interval were among the most influencing variables (Fig 1). Prepartum vaccination is among the least influential predictors. However, time and type of vaccine appeared in all three rankings above prepartum vaccination.

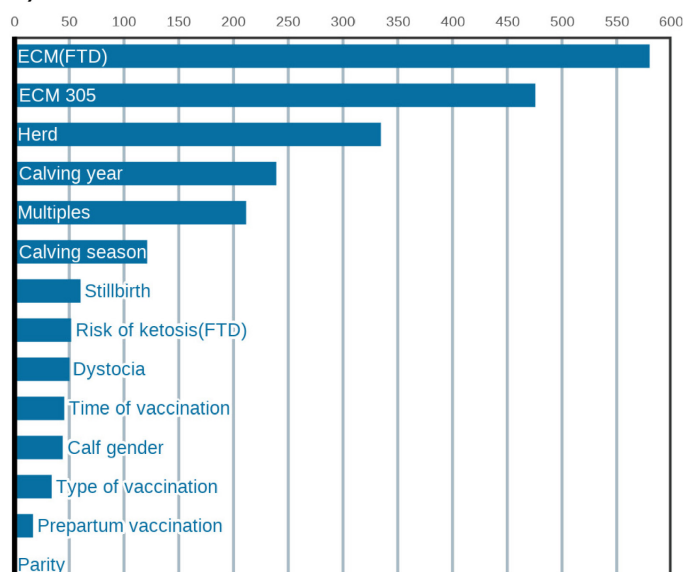
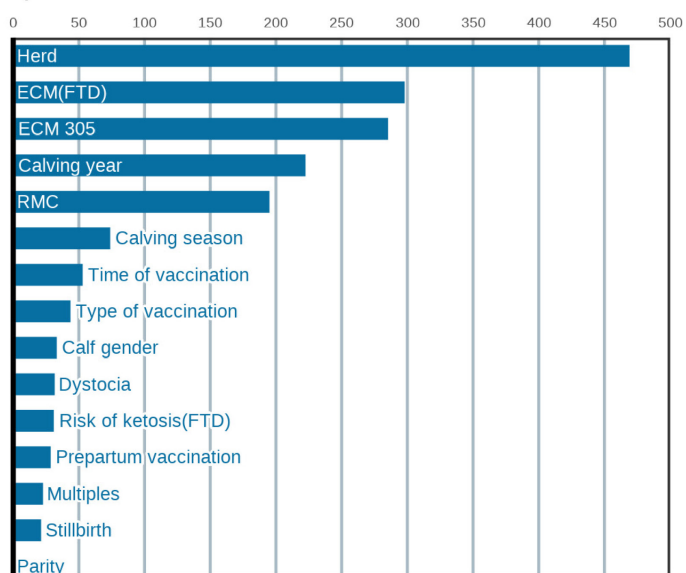
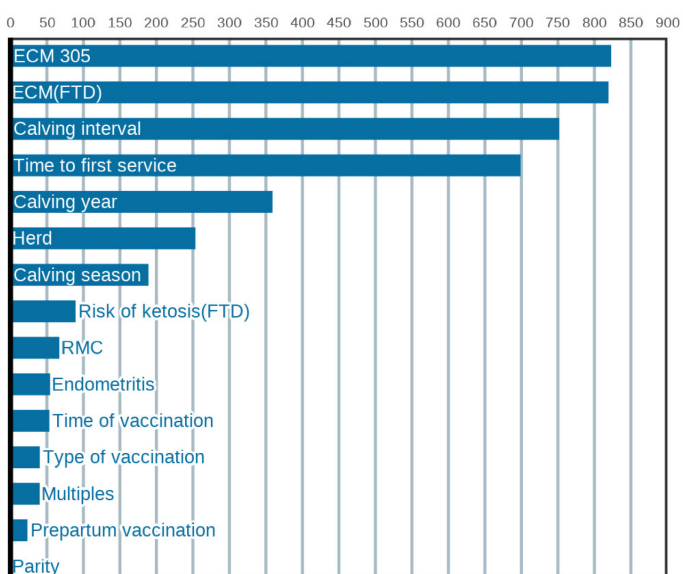
A) RMC**B) Endometritis****C) NRR 56**

Fig 1: Ranking of importance of influencing variables on prevalence of RMC (A), endometritis (B) and NRR56 (C) by a Random Forest model. Predicted variable importance is represented by the mean decrease of impurity, constituted by the reduction of uncertainty in the model. Importance is associated with the ability of risk factors to correctly predict the response variable (the higher the importance, the better the predictive power).

Prepartum non-live vaccination affects uterine health and fertility

Results of multivariable models in primiparous cows (Table 3) showed that vaccination with a non-live vaccine significantly increased the odds of RMC and endometritis, while significantly decreased the NRR56, when comparing the NON-LIVE group with the NON-VACC group. The odds ratio of 1.73 suggests that individuals who received the non-live vaccine were 1.73 times more likely to develop RMC, relative to the non-vaccinated group, after controlling for other variables. However, despite a significant p-value, which in this study might be mostly due to the huge sample size, according to Chen et al. (2010), the effect size from $OR = 1.73$ is classified as small [34]. Primiparous cows who received the non-live vaccine were 3.04 times more likely to develop endometritis. In turn, primiparous cows vaccinated with a non-live vaccine were 24% less likely ($OR = 0.76$) to be successfully inseminated on day 56 p.i. compared to non-vaccinated primiparous cows. Comparing the groups MIXED and NON-VACC, as well as MIXED and NON-LIVE however showed no significant associations.

The results of the predictors indicate that cows that experienced stillbirth were 1.88 times more likely to develop RMC. Furthermore, primiparous cows with dystocia had a 61% higher likelihood of developing RMC ($OR = 1.61$) and a 54% higher likelihood of developing endometritis ($OR = 1.54$). Cows carrying multiples were 3.90 times more likely to develop RMC. Milk yield (ECM FTD) was associated with a 4% reduction in the odds of developing RMC ($OR = 0.96$). The risk of ketosis increased the likelihood of developing RMC by 33%. Finally, the results for calf gender show that cows giving birth to male calves were 24% more likely to develop RMC.

Table 3: Multivariable models: Effects of prepartum vaccine type on uterine health and fertility in primiparous cow.

Postpartum time interval	Day 1-21		Day 22-56		Appr. > Day 100	
	RMC ^a		Endometritis ^b		NRR 56 ^c	
	OR ^d (95% CI ^e)	p-value ^f	OR ^d (95% CI ^e)	p-value ^f	OR ^d (95% CI ^e)	p-value ^f
Type of vaccine						
NON-LIVE ^g /NON-VACC ^h	1.73 (1.21-2.46)	<0.001	3.04 (1.86-4.96)	<0.001	0.76 (0.65-0.88)	<0.001
MIXED ⁱ / NON-VACC ^h	1.17 (0.34-4.05)	0.955	0.14 (0.01-2.06)	0.203	0.97 (0.65-1.46)	0.988
MIXED ⁱ /NON-LIVE ^g	0.67 (0.20-2.28)	0.729	0.05 (0.00-0.67)	0.019	1.28 (0.86-1.91)	0.305
Stillbirth	1.88 (1.70-2.09)	<0.001	1.18 (1.02-1.35)	0.024		
Dystocia	1.61 (1.50-1.72)	<0.001	1.54 (1.40-1.70)	<0.001		
Multiples	3.90 (2.88-5.29)	<0.001	1.38 (0.92-2.06)	0.114		
ECM (FTD)^j	0.96 (0.95-0.96)	<0.001	0.98 (0.98-0.99)	<0.001		
Risk of ketosis (FTD)^k	1.33 (1.23-1.44)	<0.001	1.10 (0.99-1.22)	0.083		
SCC (FTD)^l	1.02 (1.00-1.04)	0.074				
Calf gender	1.24 (1.16-1.32)	<0.001				
RMC^a			3.88 (3.52-4.28)	<0.001	0.94 (0.88-1.01)	0.075
Endometritis^b					0.94 (0.86-1.03)	0.205
Calving season^m						
spring / autumn	1.09 (0.97-1.23)	0.258			0.97 (0.88-1.07)	0.854
summer / autumn	1.04 (0.93-1.18)	0.783			0.94 (0.85-1.04)	0.357
summer / spring	0.96 (0.85-1.08)	0.792			0.97 (0.88-1.07)	0.842
winter / autumn	1.15 (1.02-1.29)	0.018			1.07 (0.97-1.17)	0.319
winter / spring	1.05 (0.93-1.18)	0.692			1.10 (1.00-1.21)	0.057
winter / summer	1.10 (0.98-1.23)	0.181			1.13 (1.03-1.25)	0.004

^aAggregation of Retained placenta and Metritis within day 1-21 postpartum; ^bEndometritis within day 22-56 postpartum; ^cNon-Return-Rate refers to day 56 after first service; ^dOdds Ratio for pairwise contrasts; ^eConfidence Interval; ^fp-values are marked bold, if below the adapted significance threshold, of 0.003; ^gvaccination during the dry period with a vaccine, consisting of only non-live components; ^hno vaccination during the dry period; ⁱvaccination during the dry period with a vaccine, consisting of live and non-live components; ^jEnergy corrected milk yield on the first day of milk testing; ^kKetotic risk was assumed, if the fat-protein-ratio exceeds 1.4 and lower limits of protein content (Emin) are undercut or upper limits of fat

content (Fmax) are passed on the first day of milk testing. $E_{min} = (4,11 - 0,023 \text{ kg milk/day}) (1 - 0,35/3,51)$. $F_{max} = (5,06 - 0,033 \text{ kg milk/day}) (1 + 0,68/4,20)$; ¹Somatic cell count of the first test day, logarithmically transformed; ^mspring (March-May), summer (June-August), autumn (September-November), winter (December-February).

The variables herd and calving year were applied as random effects. Empty fields arise because the variable was either not significant in the corresponding univariable analysis or was eliminated by manual backward selection. The vertical wiggly line separates NRR56 from the other response variables due to an inverse effect as compared to RMC and Endometritis: while higher RMC and Endometritis rates are undesirable, higher NRR56 rates represent better fertility.

Results of multivariable models with multiparous cows (Table 4) showed that prepartum vaccination with a non-live vaccine significantly increased the likelihood for endometritis and decreased NRR56 when comparing the NON-LIVE group with the NON VACC group. Multiparous cows vaccinated with a non-live vaccine were 5.61 times more likely to develop endometritis compared to non-vaccinated cows, indicating an association between the non-live vaccine and the development of endometritis with medium effect size. Multiparous cows vaccinated with a non-live vaccine were 20% less likely to be successfully inseminated compared to non-vaccinated cows. In contrast, cows vaccinated with a mixed vaccine were 87% more likely to be successfully inseminated compared to those vaccinated with the non-live vaccine, suggesting that the mixed vaccine might be associated with improved insemination success.

The results of the predictors show that those cows that had a stillbirth were 2.37 more likely to develop RMC. Moreover, the presence of dystocia increased the odds of RMC and Endometritis by 37% and 39% respectively, while also significantly decreased the NRR56 by 9%. Cow with multiples had a markedly higher risk of RMC, being 6.40 times more likely to develop the condition. These cows were also 1.31 times more likely to develop endometritis. Cows with ketosis were 16% more likely to develop RMC. When it comes to calf gender, cows that gave birth to male calves were 18% more likely to develop RMC. Risk of ketosis was associated with an increased likelihood of RMC by 16%. Milk yield (ECM FTD) had a decreasing effect on the development of RMC, but was not significantly associated with either endometritis or NRR56. Milk yield of the previous lactation (ECM 305) had a significant increasing effect on RMC and endometritis and a significant decreasing effect on the non-return rate. Furthermore, longer time to first service increased NRR56, while longer calving intervals were associated with lower NRR56. Finally,

cows that developed RMC were 4.28 times more likely to subsequently develop endometritis. Additionally, the occurrence of RMC was associated with a 10% reduction in the odds of successful insemination.

Table 4: Multivariable models: Effects of vaccine type on uterine health and fertility in multiparous cow.

Postpartum time interval	Day 1-21		Day 22-56		Appr. > Day 100	
	RMC ^a		Endometritis ^b		NRR56 ^c	
	OR ^d (95% CI) ^e	p-value ^f	OR ^d (95% CI) ^e	p-value ^f	OR ^d (95% CI) ^e	p-value ^f
Type of vaccine						
NON-LIVE ^g /NON-VACC ^h	1.45 (1.09-1.93)	0.007	5.61 (3.47-9.09)	<0.001	0.80 (0.71-0.91)	<0.001
MIXED ⁱ / NON-VACC ^h	1.45 (0.70-3.01)	0.449	1.43 (0.35-5.78)	0.822	1.50 (1.02-2.22)	0.036
MIXED ⁱ /NON-LIVE ^g	1.00 (0.51-1.98)	>0.999	0.25 (0.07-0.96)	0.041	1.87 (1.29-2.72)	<0.001
Stillbirth	2.37 (2.08-2.70)	<0.001	1.15 (0.96-1.37)	0.142		
Dystocia	1.37 (1.27-1.47)	<0.001	1.39 (1.26-1.53)	<0.001	0.91 (0.85-0.97)	0.003
Multiples	6.40 (5.69-7.22)	<0.001	1.31 (1.11-1.54)	0.001		
ECM (FTD)^j	0.95 (0.95-0.95)	<0.001	1.00 (0.99-1.00)	0.275	1.00 (0.99-1.00)	0.061
Risk of ketosis (FTD)^k	1.16 (1.09-1.24)	<0.001	1.13 (1.04-1.23)	0.004		
SCC (FTD)^l	1.01 (0.99-1.02)	0.358				
Calf gender	1.18 (1.12-1.26)	<0.001				
RMC^a			4.28 (3.92-4.67)	<0.001	0.90 (0.84-0.96)	0.003
ECM 305^m	1.00 (1.00-1.00)	<0.001	1.00 (1.00-1.00)	<0.001	1.00 (1.00-1.00)	<0.001
Calving interval					1.00 (1.00-1.00)	<0.001
Time to first service					1.00 (1.00-1.00)	<0.001
Calving seasonⁿ						
spring / autumn	1.17 (1.05-1.31)	0.002			0.89 (0.80-0.97)	0.006
summer / autumn	1.10 (0.99-1.22)	0.087			0.85 (0.78-0.93)	<0.001
summer / spring	0.94 (0.84-1.05)	0.452			0.96 (0.87-1.06)	0.736

winter / autumn	1.04 (0.93-1.15)	0.819	1.05 (0.96-1.14)	0.511
winter / spring	1.05 (0.93-1.18)	0.692	1.10 (1.00-1.21)	0.057
winter / summer	1.10 (0.98-1.23)	0.181	1.13 (1.03-1.25)	0.004

^aAggregation of Retained placenta and Metritis within day 1-21 postpartum; ^bEndometritis within day 22-56 postpartum; ^cNon-Return-Rate refers to day 56 after first service; ^dOdds Ratio for pairwise contrasts; ^eConfidence Interval; ^fp-values are marked bold, if below the adapted significance threshold, of 0.003; ^gvaccination during the dry period with a vaccine, consisting of only non-live components; ^hno vaccination during the dry period; ⁱvaccination during the dry period with a vaccine, consisting of live and non-live components; ^jEnergy corrected milk yield on the first day of milk testing; ^kKetotic risk was assumed, if the fat-protein-ratio exceeds 1.4 and lower limits of protein content (Emin) are undercut or upper limits of fat content (Fmax) are passed on the first day of milk testing. Emin = (4,11 -0,023 kg milk/day) (1 - 0,35/3,51). Fmax = (5,06 -0,033 kg milk/day) (1 + 0,68/4,20); ^lSomatic cell count of the first test day, logarithmically transformed; ^mEnergy corrected milk yield in 305 days of the previous lactation; ⁿspring (March-May), summer (June-August), autumn (September-November), winter (December-February).

The variables herd and calving year were applied as random effects. Empty fields arise because the variable was either not significant in the corresponding univariable analysis or was eliminated by manual backward selection. The vertical wiggly line separates NRR56 from the other response variables due to an inverse effect as compared to RMC and Endometritis: while higher RMC and Endometritis rates are undesirable, higher NNR56 rates represent better fertility.

Time of vaccination affects fertility in non-live vaccinated cows

In multivariable generalized linear mixed effects models with only those transition periods (17,574 transition periods of 8,268 cows) where cows were vaccinated with a non-live vaccine, significant effects of time of vaccination could be found for the response variable NRR56 (Fig 2). Here, predicted outcomes for the EARLY group were 37.6% NRR56 and for LATE group 46% NRR56, with a difference in predicted probabilities of 8.4% (Fig 2) while the odds for successful insemination of late vaccinated cows was 42% higher. No significant association with time of vaccination was found for RMC and endometritis.

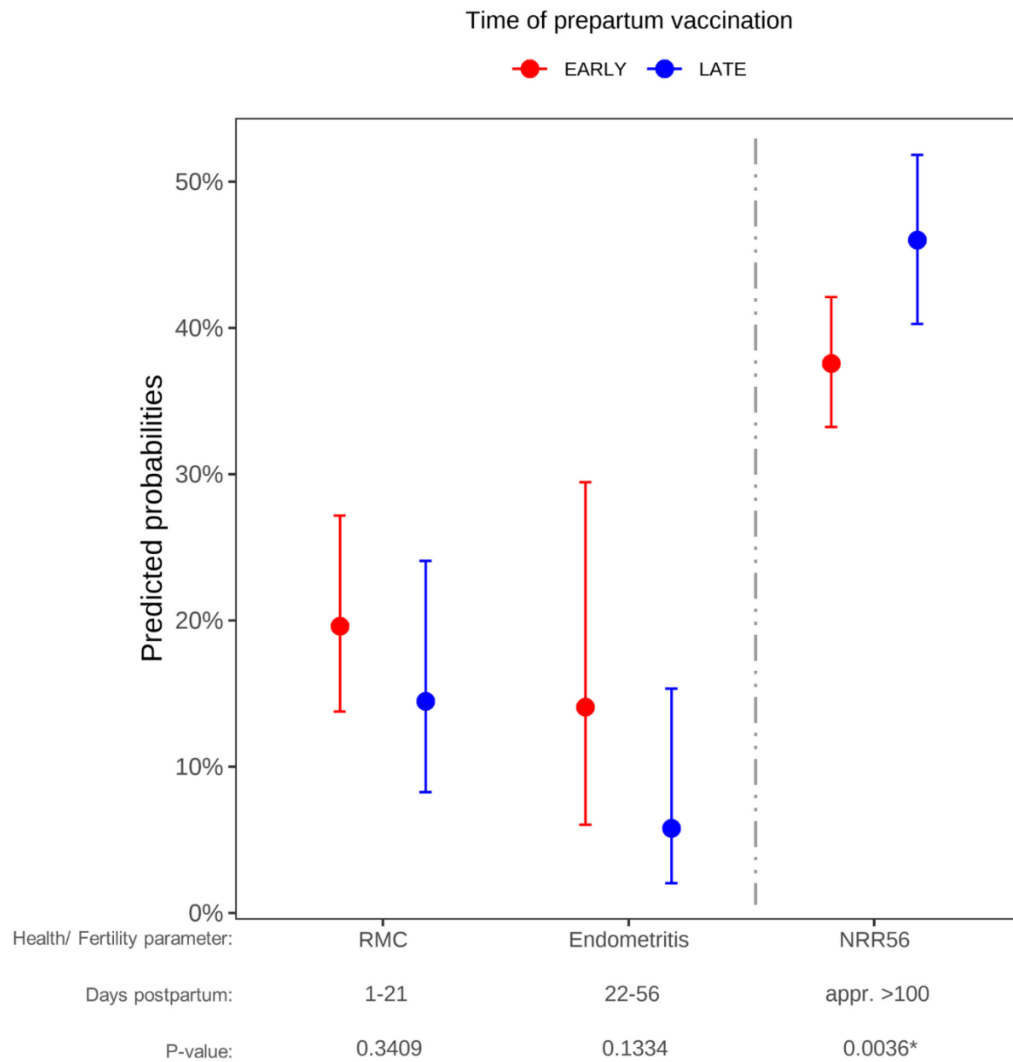


Fig 2: Association between time of prepartum vaccination and uterine health and fertility parameters in non-live vaccinated cows. All outcomes are derived from multivariable models. See Supplementary File 3 for p-values, odds ratios and confidence intervals for all predictors. P-values are marked with *if below the adapted significance threshold, depending on the number of observations between 0.0051 and 0.0054. The vertical dotted line separates NRR56 from the other response variables due to an inverse effect as compared to RMC and Endometritis: while higher RMC and Endometritis rates are undesirable, higher NRR56 rates represent better fertility.

Discussion

Innate immune mechanisms play a major role in the peripartum period. Vaccine-induced NSE, which are mainly based on innate immune mechanisms, are rarely studied in the field of uterine health and reproduction. Here, we investigated

whether prepartum vaccination against NCD in pregnant cows has an effect on the prevalence of postpartum uterine disease and fertility. This was based on the hypothesis that vaccination-induced mechanisms alter the interaction within the immune system or between cells and thus lead to enhanced resistance towards metritis pathogens and improved fertility. Special emphasis was placed the time of vaccination, whether early or late during the dry period, as well as the type of vaccine, whether live or non-live.

In multivariable models, vaccinated cows, especially those vaccinated with a non-live vaccine, had a significantly higher predicted probability of uterine disease and a lower probability of successful insemination on day 56 after the first insemination (Tables 3 and 4). Those cows vaccinated with a live vaccine component, differed significantly from non-vaccinated cows only in NRR56 and in multiparity, all other results in this regard were not significant (Table 4). These results suggest negative effects of non-live prepartum vaccination on the postpartum uterus. Usually, beneficial NSE are found in live and adverse in non-live vaccines [3, 4]. Therefore, the results align well with previous research findings, although positive effects of live vaccine components were only found in terms of NRR56 in multiparous cows. Besides, the effect size of all these predictors were small or very small (except for endometritis in multiparous cows) when interpreted according to the recommendations of Chen et al. [34]. This suggests minor impact of the observed effects. Here, also the results of the variable importance ranking need to be taken into account: herd management and the cows' milk yield have the greatest influence on uterine health and fertility in the postpartum cow. Moreover, the variable importance ranking showed a higher relevance of the time of vaccination than the simple comparison between vaccinated and non-vaccinated cows (as well as the type of vaccine). Currently, vaccine manufacturers recommend to vaccinate cows against NCD between three and twelve weeks prior to the expected calving date, to allow sufficient time for antibody production against the target pathogens and to ensure their passage into the colostrum immediately after calving. The relation between time of vaccination and time of pen change on an acidogenic diet has recently been shown to affect lying time, metabolic profile and immunoglobulins with prepartum vaccination with two non-live vaccines against neonatal calf diarrhea (NCD) and mastitis [13, 14]. Here, a beneficial effect of vaccination 4 weeks prepartum, followed by pen change and acidogenic diet 3 weeks prepartum,

compared to all of these procedures 3 weeks prepartum was attributed to additive stressors. In this study, the use and timing of acidogenic diet and pen change could not be fully determined retrospectively, and therefore not considered in the models; however, the time of vaccination was documented in most cases by the participating farms. They vaccinated their cows between 2.5 and 8 weeks prior to the expected calving date, multiparous cows usually at dry-off and heifers at regrouping. Therefore, a large time continuum of vaccination could be examined in the respective multivariable analysis. To achieve this, the number of observations in the dataset was reduced to those cows that had been vaccinated with a non-live prepartum vaccine, with only those cases where the date of vaccination was clear remaining. The results showed a significant association between time of vaccination and fertility with a very small effect size (Fig 2 and S3 Table). No significant results were found for RMC and endometritis.

Our hypothesis that vaccination-induced mechanisms lead to enhanced resistance to metritis pathogens and improved fertility was not supported by the results of this data set. Nevertheless, associations of small impact could be substantiated. Whether these associations are vaccination-induced can be approached by evaluating the criteria of causal analysis [35]. The fact that the exposure (vaccination) preceded the (uterine) disease in time and the thorough consideration of predictors and confounders in the analyses argue in favor of a causal relationship. Furthermore, the consistency of the association was demonstrated by the reproducibility of the results across the different multivariable models (e.g., primi- vs. multiparous; VACC/NON VACC vs. NON LIVE/MIXED/NON VACC). Although dose-effect relationship is not applicable in this study, because only binary explanatory and outcome variables were available. Although the effect size of the associations was mostly small, the multivariable models applied were robust, the statistical power was high and significance thresholds were adapted to the large data set. Finally, a causal relationship between vaccination and effects on uterine health and fertility seems plausible, as the findings align with related research [3, 4].

The effects observed are unlikely related to the specific effects of the antibody response of the vaccine. The NCD vaccine targets pathogens including *E. coli*, bovine corona virus and rotavirus. Although coronaviruses and rotaviruses are rarely implicated in the pathogenesis of uterine disorders, it cannot be excluded that antibody generation against *E. coli* may interfere with intrauterine *E. coli*. The

genotypic specificity of intrauterine *E. coli* is a current area of research [36] and the presence or absence of bacteria plays a part in uterine diseases, but the role of the immune system is estimated as decisive [24]. Dysregulated immune function around calving is associated with impaired and reduced polymorphonuclear leucocytes (PMN) [20, 37]. Conversely, early influx of inflammatory PMN into the uterus reduce uterine disease in the further course of uterine involution [20]. Innate immune mechanisms are important not only in the postpartum period, but already in the prepartum period [19]. Postpartum, time again makes a difference: while puerperal metritis usually occurs within ten days postpartum, endometritis is defined as occurring from day 21 postpartum [24]. Carry-over effects of uterine disease on subsequent fertility have been found, although details of the underlying mechanisms are still unclear [25, 38]. While PMN are known to upregulate inflammation, little is known about their role in the resolution of the inflammation. Pascottini et al. hypothesize, that this resolution of inflammation is a key feature of PMN in the regulation of uterine disease [20]. In dairy reproduction, Ribeiro et al. found that inflammation prior to breeding reduced fertility and suggested additive negative effects of inflammation from different sources (metabolic, NEB, uterine and non-uterine diseases) [38]. The interplay of systematic and uterine inflammation is not entirely understood, but there is a type or extent of inflammation that leads to maladaptation of the transition cow [39]. Thus, inflammation and specifically its up- and downregulation seems to play a key role in uterine health and fertility. We hypothesize that NSE interfere with these innate regulatory immune mechanisms, especially by increasing the number and competence of PMN [6] and thus affect the dysregulated immune system of the periparturient dairy cow.

Herd records are a good and time-tested tool to monitor health parameters in dairy herds [40]. Large datasets allow the detection of even small phenomena because of the high statistical power and the thorough examination of subgroups and variables to control confounders. At the same time, large datasets entail several challenges. Strategies for dealing with the challenges associated with the available herd records have been discussed in more detail in our previous work [15]. In brief, the main aspects of the measures taken to ensure the reliability of the results are pointed out. Lower significance thresholds were set to reduce the likelihood of false positive significant results. Potential documentation bias was addressed by validation

through on-site farm visits, thorough data cleaning and exploratory data analysis. Confounders were checked in contingency tables and bivariable analyses. Finally, univariable and multivariable general linear mixed-effects logistic regression and random forest analysis were selected as appropriate and comprehensive statistical methods.

Risk factors for uterine diseases are well studied and the results of this study align well with these [compare: [19, 28]]. Some parameters were not or only partly available for the model of this study, such as vulval angle or back fat thickness, bacterial infection [29, 41]. Those variables referring to the previous lactation of the cow, could only be considered in multiparous cows; thus, models were separated into primiparous and multiparous. Additional factors may also have an impact, particularly those related to the composition of the vaccine product. While there was a difference between non-live and live vaccine components, the authors suggest to examine the role of adjuvants in analytical models. In the models of this study, the highest influential factors for all response variables in this study were ECM FTD, ECM 305 of the previous lactation and herd management, as demonstrated by the variable importance ranking of the Random Forest analysis. Literature reports contradicting results regarding the influence of milk yield on reproduction [27, 42-44]. An increase in milk production due to breeding advances and a concurrent decline in reproduction measures has been observed in dairy herds worldwide. Some researchers have proposed that rising milk yields are a cause of rising infertility. However, others have criticized this conclusion or even found a positive correlation. To address this research question, Rearte et al. [45] conducted a multilevel logistic regression analysis. These findings indicated a significant association between milk yield and reproductive performance, with a small effect size. Also, the findings of this study indicate that while the significance of ECM 305 on NRR56 is high, the effect size is very small. A correlation between early milk yield and other variables was observed in both positive and negative directions [45-47]. In this study, both previous lactation and current early lactation milk yield were negatively associated with uterine health and fertility. It is noteworthy that a notable discrepancy was observed in the correlation between milk yield in the previous lactation and that of the current early lactation, while the former seemed to increase the risk of uterine diseases, and high milk yields in the current early lactation seemed to be an indicator for a good uterine health status. The authors

hypothesize that regarding uterine disease, the effect may be inverse: if the cow's uterine health is impaired, it affects the overall performance of the animal, resulting in reduced milk yields. A limitation of the study is the differing days in milk (DIM) of milk recordings, which occurred at monthly intervals on the respective farms. To identify potential biases, the relationship between the average DIM on the day of the milk test and the average milk performance was investigated. The results demonstrated that there was no significant impact on the outcomes.

Conclusion

This large-scale study confirmed that management factors and milk yield are the most important factors for the dairy cows' uterine health and fertility. Although with small effect size, but high significance, the prepartum vaccination increased the probability of retained placenta, metritis and endometritis, and reduced fertility. This strongly argues for non-specific effects of prepartum vaccination. While small effects could be seen in cows, we hypothesize that they could not outweigh the positive effects of vaccination against NCD on health and survival of neonatal calves. Instead, these findings shed light upon the current immunological discourse on NSE of vaccinations. Further research is required on the mechanisms of NSE in the critical periparturient phase of the dairy cow, with particular focus on the optimal timing of vaccination and the most suitable vaccine components (live, non-live, adjuvants).

Acknowledgments

The authors would like to thank all farmers who participated in the study.

References

1. de Bree LCJ, Koeken V, Joosten LAB, Aaby P, Benn CS, van Crevel R, et al. Non-specific effects of vaccines: Current evidence and potential implications. *Semin Immunol.* 2018;39:35-43.
2. Arega SM, Knobel DL, Toka FN, Conan A. Non-specific effects of veterinary vaccines: a systematic review. *Vaccine.* 2022;40(11):1655-64.
3. Benn CS, Fisker AB, Rieckmann A, Sørup S, Aaby P. Vaccinology: time to change the paradigm? *The Lancet Infectious Diseases.* 2020;20(10):e274-e83.

4. Rubio-Casillas A, Rodriguez-Quintero CM, Redwan EM, Gupta MN, Uversky VN, Raszek M. Do vaccines increase or decrease susceptibility to diseases other than those they protect against? *Vaccine*. 2024;42(3):426-40.
5. Guerra-Maupome M, Vang DX, McGill JL. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PloS one*. 2019;14(2):e0212751.
6. Weikard R, Demasius W, Hadlich F, Kühn C. Different Blood Cell-Derived Transcriptome Signatures in Cows Exposed to Vaccination Pre- or Postpartum. *PloS one*. 2015;10(8):e0136927.
7. Demasius W, Weikard R, Hadlich F, Müller KE, Kühn C. Monitoring the immune response to vaccination with an inactivated vaccine associated to bovine neonatal pancytopenia by deep sequencing transcriptome analysis in cattle. *Veterinary research*. 2013;44(1):93.
8. Smith BI, Rieger RH, Dickens CM, Schultz RD, Aceto H. Anti-bovine herpesvirus and anti-bovine viral diarrhea virus antibody responses in pregnant Holstein dairy cattle following administration of a multivalent killed virus vaccine. *American Journal of Veterinary Research*. 2015;76(10):913-20.
9. Vidlund J, Gelalcha BD, Gillespie BE, Agga GE, Schneider L, Swanson SM, et al. Efficacy of novel staphylococcal surface associated protein vaccines against *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vaccine*. 2024;42(6):1247-58.
10. Juliá-Burchés C, Martínez-Varea A. An Update on COVID-19 Vaccination and Pregnancy. *Journal of Personalized Medicine*. 2023;13(5):797.
11. Aaby P, Martins CL, Ravn H, Rodrigues A, Whittle HC, Benn CS. Is early measles vaccination better than later measles vaccination? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109(1):16-28.
12. Berendsen MLT, Smits J, Netea MG, Van Der Ven A. Non-specific Effects of Vaccines and Stunting: Timing May Be Essential. *EBioMedicine*. 2016;8:341-8.
13. Menichetti BT, Garcia-Guerra A, Lakritz J, Weiss WP, Velez JS, Bothe H, et al. Effects of prepartum vaccination timing relative to pen change with an acidogenic diet on serum and colostrum immunoglobulins in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2021;104(10):11072-81.
14. Menichetti BT, Garcia-Guerra A, Lakritz J, Weiss WP, Velez JS, Bothe H, et al. Effect of timing of prepartum vaccination relative to pen change with an

- acidogenic diet on lying time and metabolic profile in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2021;104(10):11059-71.
15. Kuhn C, Zerbe H, Schuberth H-J, Römer A, Kraatz-Van Egmond D, Wesenauer C, et al. Prepartum Vaccination Against Neonatal Calf Diarrhea and Its Effect on Mammary Health and Milk Yield of Dairy Cows: A Retrospective Study Addressing Non-Specific Effects of Vaccination. *Animals*. 2025;15(2):203.
 16. Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*. 1999;82(11):2259-73.
 17. Lopreiato V, Mezzetti M, Cattaneo L, Ferronato G, Minuti A, Trevisi E. Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2020;11(1):96.
 18. Horst EA, Kvidera SK, Baumgard LH. Invited review: The influence of immune activation on transition cow health and performance-A critical evaluation of traditional dogmas. *J Dairy Sci*. 2021;104(8):8380-410.
 19. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Veterinary Journal*. 2008;176(1):102-14.
 20. Pascottini OB, LeBlanc SJ. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology*. 2020;150:193-200.
 21. Sheldon IM, Molinari PCC, Ormsby TJR, Bromfield JJ. Preventing postpartum uterine disease in dairy cattle depends on avoiding, tolerating and resisting pathogenic bacteria. *Theriogenology*. 2020;150:158-65.
 22. Williams E. Drivers of Post-partum Uterine Disease in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013;48(Suppl. 1):53-8.
 23. Machado VS, Silva TH. Adaptive immunity in the postpartum uterus: Potential use of vaccines to control metritis. *Theriogenology*. 2020;150:201-9.
 24. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 2006;65(8):1516-30.
 25. LeBlanc SJ. Review: Postpartum reproductive disease and fertility in dairy cows. *Animal*. 2023;17 Suppl 1:100781.
 26. Sanchez L, Campos-Chillon F, Sargolzaei M, Peterson DG, Sprayberry KA, McArthur G, et al. Molecular Mechanisms Associated with the Development of the Metritis Complex in Dairy Cattle. *Genes (Basel)*. 2024;15(4):439.
 27. LeBlanc S. Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. *The Journal of reproduction and development*. 2010;56 Suppl:1-7.

28. Ghavi Hossein-Zadeh N, Ardalan M. Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows. *Vet Res Commun.* 2011;35(6):345-54.
29. Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology.* 2010;74(1):127-34.
30. Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology.* 2000;53(9):1729-59.
31. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Forthcoming 2021.
32. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning.* 2001;45(1):5-32.
33. Good IJ. The Interface Between Statistics and Philosophy of Science. *Statistical Science.* 1988;3(4):386-97.
34. Chen H, Cohen P, Chen S. How Big is a Big Odds Ratio? Interpreting the Magnitudes of Odds Ratios in Epidemiological Studies. *Communications in Statistics - Simulation and Computation.* 2010;39(4):860-4.
35. Kreienbrock L, Pigeot I, Ahrens W. *Epidemiologische Methoden*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012.
36. Garzon A, Basbas C, Schlesener C, Silva-Del-Rio N, Karle BM, Lima FS, et al. WGS of intrauterine *E. coli* from cows with early postpartum uterine infection reveals a non-uterine specific genotype and virulence factors. *mBio.* 2024:e0102724.
37. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;113(1-2):21-9.
38. Ribeiro ES, Gomes G, Greco LF, Cerri RLA, Vieira-Neto A, Monteiro PLJ, et al. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 2016;99(3):2201-20.
39. Pascottini OB, Leroy J, Opsomer G. Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2022;57(Suppl. 4):21-32.
40. Emanuelson U, Oltenacu PA, Gröhn YT. Nonlinear mixed model analyses of five production disorders of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1993;76(9):2765-72.

41. Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M. Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology*. 2014;82(6):857-65.
42. Niozas G, Tsousis G, Malesios C, Steinhöfel I, Boscós C, Bollwein H, et al. Extended lactation in high-yielding dairy cows. II. Effects on milk production, udder health, and body measurements. *Journal of dairy science*. 2019;102(1):811-23.
43. Niozas G, Tsousis G, Steinhöfel I, Brozos C, Römer A, Wiedemann S, et al. Extended lactation in high-yielding dairy cows. I. Effects on reproductive measurements. *Journal of dairy science*. 2019;102(1):799-810.
44. Lawson LG, Bruun J, Coelli T, Agger JF, Lund M. Relationships of efficiency to reproductive disorders in Danish milk production: a stochastic frontier analysis. *J Dairy Sci*. 2004;87(1):212-24.
45. Rearte R, LeBlanc SJ, Corva SG, de la Sota RL, Lacau-Mengido IM, Giuliadori MJ. Effect of milk production on reproductive performance in dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 2018;101(8):7575-84.
46. Cook JG, Green MJ. Use of early lactation milk recording data to predict the calving to conception interval in dairy herds. *J Dairy Sci*. 2016;99(6):4699-706.
47. Madouasse A, Huxley JN, Browne WJ, Bradley AJ, Dryden IL, Green MJ. Use of individual cow milk recording data at the start of lactation to predict the calving to conception interval. *Journal of Dairy Science*. 2010;93(10):4677-90.

Supporting Information

S1 Table. Applied variables in the study.

S2 File. English translated version of the on-farm survey.

S3 Table. Results of multivariable analysis of the association between time of prepartum vaccination and uterine health and fertility in non-live vaccinated cows.

V. DISKUSSION

Euter- und Gebärmuttererkrankungen repräsentieren einen wesentlichen Teil der postpartalen Erkrankungen der hochleistenden Milchkuh und stellen die Milchviehhaltung vor Herausforderungen, denn sie sind entscheidend für Milchleistung und Fruchtbarkeit der nachfolgenden Laktation. Ausschlaggebend für die Anfälligkeit und den Verlauf dieser Erkrankungen ist der Immunstatus der Kuh bereits vor der Geburt. Eine Modulation des Immunsystems in einer Weise, dass die Reaktion auf infektiöse Erreger verbessert werden kann, könnte eine gute Möglichkeit für die komplikationsarme Transitphase darstellen. Gleichzeitig ermöglicht der Einblick in das Zusammenspiel von Impfung und Gesundheitsstatus der Kuh einen möglichen Erkenntnisgewinn über das angeborene Immunsystem.

Während im Rahmen der ersten Publikation (III.), neben den NSE der Mutterschutzimpfung auf Eutergesundheit und Milchleistung, insbesondere die Methodik diskutiert wurde, fokussiert sich die Diskussion des zweiten Manuskripts (IV.) auf die möglichen NSE in Abhängigkeit von Impfung, Impfzeitpunkt und Impfstoffkomponenten. Die vorliegende Diskussion soll einen Bogen über beide Arbeiten spannen und dabei die Validität der Daten und statistischen Methoden vergleichend diskutieren (V.1.). Zudem werden mögliche Mechanismen der impfinduzierten NSE in beiden Organsystemen erörtert (V.2.). Dabei sollen Forschungslücken identifiziert und ein Ausblick auf mögliche zukunftssträchtige Entwicklungen im Bereich Immunmodulation und Impfmanagement diskutiert werden.

1. Validität der Daten und der statistischen Methoden

Die Auswertung von Herdendaten stellt ein bewährtes Instrument zur Überwachung von Gesundheitsparametern in Milchviehherden dar. Im Vergleich zu den meisten Feldstudien in diesem Bereich (SCOTT et al., 1998; SCHULZE et al., 2016; MENICHETTI et al., 2021b, 2021a; RETAMAL et al., 2022) hat die Auswertung von retrospektiven Herdendaten in der Regel einen bedeutenden Vorteil: die hohe Menge an Daten, bei denen selbst kleine Veränderungen sichtbar gemacht werden können. Gleichzeitig geht die Auswertung von großen Herdendatensätzen mit einigen Herausforderungen einher, wie beispielsweise die erhöhte

Wahrscheinlichkeit von Typ-1-Fehlern oder dem Dokumentationsbias (vgl. III., S. 30). Um diesen zu begegnen, bedarf es valider Methoden der Datenbereinigung, -überprüfung und -modellierung sowie geeigneter statistischer Methoden. Einige der für diese Arbeit zentralen Methoden werden im Folgenden diskutiert.

1.1. Beurteilung der Datengrundlage und Variablen

Qualitativ hochwertige Daten, geeignete Zielgrößen und Prädiktoren sind die Grundlage für die Zuverlässigkeit der finalen statistischen Modelle und die Aussagekraft der Ergebnisse. Im Umgang mit großen Datensätzen in R wird ein Modell zur Datenverarbeitung vorgeschlagen, bei dem das Verstehen der Daten im Vordergrund steht und die Schritte Transformation, Visualisierung und Modellierung umfasst. Diese werden in einer Art hermeneutischem Zirkel wiederholt durchgeführt, bis ein zufriedenstellendes Verständnis der Daten angenommen wird (WICKHAM und GROLEMUND, 2016).

Die Basis für Modellierungen sind zunächst geeignete Zielgrößen. Bei den in dieser Studie verwendeten Herdendaten war davon auszugehen, dass Ungenauigkeiten und Inkonsistenzen der Diagnosen vorliegen. Dieser Annahme liegt die vorausgegangene Studie mit Daten desselben Ursprungs zugrunde (PRAEGER, 2020). Uneinheitliche Definitionen klinischer Krankheiten und der Dokumentationsbias sind ein lang bekanntes Problem bei Milchkühen (KELTON et al., 1998). In einer Studie zur Bewertung von Gesundheitsdaten aus Herdenmanagementprogrammen in den USA wurden erhebliche Defizite in der Dokumentation von Gesundheitsdaten nachgewiesen (WENZ und GIEBEL, 2012). Wie in der vorliegenden Studie (vgl. III., S. 31), wurde auch bei Wenz und Giebel (2012) hervorgehoben, dass eine weitgehend einheitliche Struktur zur Dokumentation auf den jeweiligen Betrieben besteht, jedoch von eingeschränkter Vergleichbarkeit zwischen den Betrieben auszugehen ist. Zur Minimierung dieses Dokumentationsbias wurde daher eine Kombination aus Diagnosen, Milchleistungs- und Reproduktionsdaten zur Bildung der Zielgrößen verwendet. Die Diagnosen Metritis, Nachgeburtsverhaltung und Mastitis wurden durch die belastbareren und messbaren Parameter SCC, energiekorrigierte 305-Tagesmilchleistung, energiekorrigierte Milchleistung am ersten Tag der Milchleistungsprüfung und NRR56 ergänzt. Zudem wurden Nachgeburtsverhaltung und Metritis zu einer gemeinsamen Zielgröße „Retentio secundinarum-Metritis-Komplex“ (RMC) gebündelt. Die Kombination von

uterinen Diagnosen stellt eine gängige Methode zur Steigerung der Präzision bei der Analyse von Herdendaten dar (SANCHEZ et al., 2024). Aus biologisch-medizinischer Perspektive ist die Zusammenlegung der Variablen zudem sinnvoll, da die Folgeerkrankungen, die aus einer Nachgeburtsverhaltung und Metritis resultieren, vergleichbar sind (vgl. II.3.1.2.). Gleichzeitig erfolgte die Überprüfung der Zeitabstände zwischen Besamung, Geburt und nächster Geburt sowie der Krankheitsverläufe anhand von Stichproben einzelner Kühe und die Visualisierung der Häufigkeit von Diagnosen auf betriebs- und tierindividueller Laktationsebene. Trotz dieser Maßnahmen zur Optimierung der Datenqualität und der sorgfältigen Auswahl der Zielgrößen bleibt die Verwendung retrospektiver Daten, die im Gegensatz zu experimentellen Studien nicht selbst erhoben wurden, eine wesentliche Einschränkung dieser Studie.

Explorative Modellierungen dienen nicht nur zum besseren Verständnis der Daten, sondern auch zur Entdeckung erster Zusammenhänge und Generierung von Vermutungen (KREIENBROCK et al., 2012; WICKHAM und GROLEMUND, 2016). Zur Ermittlung der Zusammenhänge zwischen Prädiktoren und Zielgrößen wurden deshalb zunächst geeignete Prädiktoren mit Hilfe von Kreuztabellen und logistischen Regressionsmodellen gefunden. Eine besondere Herausforderung hierbei war die Identifikation von Ursache-Wirkungs-Beziehungen. Insbesondere in der Transitphase der Milchkuh ist dies eine Herausforderung, denn in dieser Phase gibt es viele Wechselwirkungen (MULLIGAN und DOHERTY, 2008; ALERI et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2022). Confounder, Störvariablen, die gleichzeitig mit der zu analysierenden Expositionsvariablen, als auch mit der Zielvariablen assoziiert sind, können Ergebnisse verzerren (KREIENBROCK et al., 2012). Zur Veranschaulichung dient an dieser Stelle die Beispielvariable *risk of ketosis* in den Modellen dieser Studie (vgl. III., S. 23; IV., S. 41). Der Ketonkörperspiegel im Blut ist in der Lage, Immunmechanismen der Transitkuh zu beeinflussen (ESPOSITO et al., 2014), folglich könnte dieser ebenfalls einen Einfluss auf die durch die Mutterschutzimpfung ausgelöste Immunantwort haben. Gleichzeitig ist bekannt, dass Hyperketonämie unabhängig von der Impfung die Gebärmuttergesundheit und Fruchtbarkeit negativ beeinflussen kann (RABOISSON et al., 2014). In der vorliegenden Studie konnte der Ketonkörperspiegel anhand der Milchleistungsdaten berechnet werden und stand als Variable *risk of ketosis* zur Verfügung. Diese Variable und weitere mögliche

Confounder wurden sorgfältig geprüft und in die Modelle integriert. Die Auswahl der Prädiktoren und die Überprüfung von Confoundern beruhte auf der Signifikanz der Prädiktoren in den univariablen Modellen unter der steten Überprüfung der Modelleleistungen. Dabei lag der Schwellenwert des p-Wertes nach GOOD (1988) niedriger als der üblicherweise angenommene Wert von 0,05 und konnte somit Typ-1-Fehler ausgleichen. Die finale Zusammensetzung der Prädiktoren in den Modellen stärkt die Ergebnisse und Schlussfolgerungen dahingehend, dass sie weitestgehend kohärent mit bekannten Risikofaktoren sind. Diese Kohärenz soll in V.2.1. näher diskutiert werden.

1.2. Beurteilung der statistischen Methoden

Unterschiedliche statistische Modelle können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (CURTIS et al., 1993). Aus diesem Grund und um multikollineare Prädiktoren zu vermeiden, ist die Auswahl geeigneter statistischer Modelle besonders wichtig. In dieser Studie wurden gemischte lineare Regressionsmodelle verwendet, wobei zunächst univariable Analysen durchgeführt wurden, um die signifikanten Prädiktoren in die nachfolgenden multivariablen Analysen aufzunehmen und gegebenenfalls durch manuelle Rückwärtsselektion unter Berücksichtigung der Modellleistung anzupassen. Von allen vergleichbaren Studien, die Effekte von Impfungen auf Gesundheits- und Leistungsdaten von Rindern untersucht haben, wurden in fünf Studien gemischte Modelle verwendet (SCOTT et al., 1998; CORTESE et al., 2020; MENICHETTI et al., 2021b, 2021a; VIIDU und MÖTUS, 2022). In drei Studien erfolgte die Auswahl der Prädiktoren durch manuelle Rückwärtsselektion (JUSTE et al., 2021; MENICHETTI et al., 2021b, 2021a). Weitere statistische Methoden vergleichbarer Studien umfassen klassische logistische Regressionsmodelle (JUSTE et al., 2016; SCHULZE et al., 2016; CONTRERAS et al., 2023) und klassische lineare Regressionen (*ordinary least square means*) (CORTESE et al., 2020; PRAEGER, 2020).

Gemischte Modelle zeichnen sich dadurch aus, dass neben den festen Effekten auch zufällige Effekte berücksichtigt werden. Da dadurch auch Variationen zwischen den Herden berücksichtigt werden können, gelten sie als flexible und stabile Instrumente bei der Auswertung von Herdendaten (WISNIESKI et al., 2019). Klassische Regressionsmodelle hingegen behandeln alle Beobachtungen als unabhängige Beobachtungen und können bei komplexen und hierarchischen Datensätzen zu fehlerhaften Ergebnissen führen (CURTIS et al., 1993). Da in der

vorliegenden Arbeit sowohl Herdeneffekte als auch tierindividuelle Effekte, wie beispielsweise Mehrfachbeobachtungen über mehrere Laktationen, eine Rolle spielen, wird die Wahl von gemischten Modellen als ausreichend geeignet angesehen. Darüber hinaus wurden durch die manuelle Rückwärtsselektion sichergestellt, dass die Modelle mit geeigneter Anzahl von Prädiktoren zuverlässig laufen.

Ergänzend zu den logistischen Regressionen, diente *variable importance* mittels *decision tree-Algorithmen*, und zwar einem Random Forest Machine Learning Algorithmus zur besseren Einordnung der Wichtigkeit verschiedener Variablen. Bei der Verwendung von zahlreichen kategorischen Variablen wird der Einsatz von Machine Learning Methoden, insbesondere *decision tree-Algorithmen*, empfohlen, um eine Hierarchisierung der komplexen Datenstruktur im Rahmen von Analysen von Transitzühen vorzunehmen (PASCOTTINI et al., 2020). Logistische Regressionen und *decision trees* ergänzen sich somit methodisch bei der Analyse von Kausalzusammenhängen. Sie wurden jedoch bisher in keiner der vergleichbaren Studien kombiniert. Dies könnte daran liegen, dass die modernen Machine Learning-Modelle häufig zur Vorhersage und nicht zur Inferenz eingesetzt werden (SHMUELI, 2010; WISNIESKI et al., 2019). In der vorliegenden Studie konnte das prädiktive Potential von Machine Learning zwar nicht ausgeschöpft werden, als Erklärungsmodelle wurden sie jedoch sinnvoll eingesetzt.

2. Nicht-spezifische Effekte der Mutterschutzimpfung bei der Milchkühe unter Berücksichtigung relevanter Einflussvariablen

Viele Faktoren beeinflussen die postpartale Gesundheit und Leistung der Milchkühe (siehe II.3.1.). Die Ergebnisse dieser Studie veranschaulichen, dass dabei die NSE von Mutterschutzimpfungen im Vergleich zu anderen Einflussfaktoren eine eher geringe Rolle spielen, da sowohl die Effektstärken als auch die *variable importance* niedrig sind. Daher wird im ersten Abschnitt dieses Kapitels zunächst die Rolle der Mutterschutzimpfung im Geflecht der vielfältigen Einflussfaktoren betrachtet. Im darauffolgenden Abschnitt wird dann der Frage nachgegangen, welche immunologischen Mechanismen durch die Mutterschutzimpfung gegen Neugeborenenenddurchfall beeinflusst werden könnten. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Rolle des Impfzeitpunktes und der Impfstoffkomponenten.

2.1. Bedeutung der Einflussvariablen

Da die Ergebnisse dieser Studie deutlich zeigen, dass die betrieblichen Managementfaktoren die wichtigsten Einflussgrößen auf postpartale Gesundheit und Leistung der Milchkuh darstellen, ist deren Einordnung als Einflussvariablen von entscheidender Bedeutung. Die Relevanz der betrieblichen Managementfaktoren für die Euter- und Gebärmuttergesundheit sowie für die Milchleistung und Fruchtbarkeit ist nicht überraschend, denn ein gutes Transitmanagement, insbesondere auf Herdenebene, ist der Schlüssel für die Krankheitsprävention und Leistungsfähigkeit des Betriebes (MULLIGAN et al., 2006; LEAN und DEGARIS, 2015).

Die Vor-Ort-Erhebungen auf den Betrieben mittels Fragebögen zielte darauf ab, das Transitmanagement der teilnehmenden Betriebe durch die Identifikation relevanter Einflussvariablen abzubilden. Dadurch sollte ein verbesserter Vergleich zwischen den Betrieben ermöglicht werden. Die Auswertung der Studie zeigte jedoch, dass sich Managementfaktoren kleinteilig darstellen und retrospektiv nicht im Detail berücksichtigt werden können. Letztlich erwies sich der Betrieb selbst als die stabilste Variable im Modell für das Betriebsmanagement (vgl. III., S. 31), da er auch Faktoren umfasst, die retrospektiv weder rekonstruiert noch gemessen werden können. Ein Beispiel ist die deutliche Verbesserung der Gebärmuttergesundheit auf einem der Betriebe durch züchterische Maßnahmen im Bereich der Beckenstellung. Diese betriebliche Managementmaßnahme ist nachvollziehbar, denn die Genetik hat im Reproduktionsmanagement einen großen Stellenwert (CROWE et al., 2018). Da keine Zuchtwerte zur Verfügung standen, war es im Rahmen dieser Studie nicht möglich, den Zuchteffekt zu quantifizieren und damit die Vergleichbarkeit zu den Zuchtverfahren der anderen teilnehmenden Betriebe sicherzustellen.

KERWIN et al. (2023) kritisieren, dass Managementfaktoren während der Transitphase und deren Auswirkungen auf die postpartale Gesundheit und Leistung der Milchkuh bislang unzureichend untersucht wurden. Frühere Studien zur Evaluation von Managementfaktoren im Milchviehbereich (FIRTH et al., 2019; COOK et al., 2024; MERLE et al., 2024) unterstreichen den Mehrwert von groß angelegten Studien. Die Vorteile einer groß angelegten Studie spiegeln sich in dieser Arbeit durch den großen Datensatz und die damit verbundene statistische Power wider. Allerdings konnte durch die Fragebogenerhebungen kein Mehrwert durch die Generierung neuer Variablen oder Kategorisierungen des betrieblichen

Managements geschaffen werden.

Die Aussagekraft von Forschungsergebnissen wird erhöht, wenn die Ergebnisse in sich kongruent sind und mit der Literatur übereinstimmen. In den multivariablen Modellen, in denen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mastitiden und die Höhe der SCC untersucht wurden, stellten Parität und Saison diejenigen Variablen mit den größten Signifikanzen und Effektstärken dar. Dies ist kongruent sowohl mit den Ergebnissen der *variable importance* des Random Forest Algorithmus als auch mit bestehender Literatur (SCHEPERS et al., 1997; SCHUKKEN et al., 2003; ÅKERSTEDT et al., 2011).

Hinsichtlich der Gebärmuttergesundheit und Fruchtbarkeit konnten die vorangegangene und aktuelle Milchleistung, Mehrlings-, Schwer- und Totgeburt als einflussreichste Prädiktoren identifiziert werden. Sowohl positive als auch negative Effekte der Milchleistung auf die Fruchtbarkeit sind in der Literatur dokumentiert (LAWSON et al., 2004; LEBLANC, 2010; NIOZAS et al., 2019b; NIOZAS et al., 2019a). REARTE et al. (2008) demonstrierten durch multivariable Regressionsanalysen einen signifikanten negativen Einfluss der Milchleistung auf die Fruchtbarkeit, jedoch mit kleiner Effektstärke. Obwohl auch in der vorliegenden Studie signifikante Effekte festgestellt werden konnten, waren diese nur von geringer Effektstärke. Die Bedeutung von Mehrlings-, Schwer- und Totgeburten für die Gebärmuttergesundheit stimmt ebenfalls mit der Literatur überein (POTTER et al., 2010). Interessanterweise waren diese Faktoren am relevantesten für RMC, jedoch bei Endometritis nur noch teilweise signifikant und bei NRR56 nicht signifikant. Diese Erkenntnis lässt sich möglicherweise damit erklären, dass Mehrlings-, Schwer- und Totgeburten vor allem frühe negative Effekte auf die Gebärmuttergesundheit haben (RMC). Dagegen liegen bei NRR56 durch den größeren zeitlichen Abstand zur Geburt und die damit verbundene Tendenz zur Ausheilung keine signifikante Assoziation mehr vor. Zusammenfassend lässt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Einflussvariablen mit der Literatur feststellen. Dies lässt auf eine hohe Qualität der Datengrundlage schließen und untermauert die gewonnenen Erkenntnisse zu NSE durch die Mutterschutzimpfung.

2.2. Nicht-spezifische Effekte der Impfung, der Impfstoffkomponenten und des Impfzeitpunktes

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass Kühe, die mit einem Totimpfstoff geimpft wurden, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für postpartale Gebärmuttererkrankungen sowie eine geringere Chance auf Besamungserfolg aufwiesen. Darüber hinaus wurde der Impfzeitpunkt als Einflussfaktor für die Fruchtbarkeit identifiziert. Diesen Ergebnissen schließt sich die Frage an, ob diese Assoziationen tatsächlich Ursache-Wirkungs-Beziehungen darstellen und welche Mechanismen diesen zugrunde liegen.

In der Diskussion des Manuskripts wurde bereits für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Mutterschutzimpfung und der erhöhten uterinen Erkrankungsrate sowie der reduzierten Fruchtbarkeit argumentiert (IV., S. 53). In einer retrospektiven Studie mit einer begrenzten Anzahl verfügbarer Variablen können jedoch Störfaktoren und daraus resultierende Verzerrungen oder falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Auch die genauen Mechanismen, die zu einer erhöhten Erkrankungsrate oder einer verminderten Fruchtbarkeit führen könnten, sind aufgrund fehlender gezielter Untersuchungen nicht abschließend zu bewerten. Die hier beobachtete erhöhte Wahrscheinlichkeit für postpartale uterine Erkrankungen nach der Mutterschutzimpfung könnte auf sehr unterschiedlichen Mechanismen der Immunantwort auf die Impfung beruhen, die in der vorliegenden nicht-experimentellen Studie nicht analysiert wurden. Daher bleiben jegliche Erklärungsmodelle zwangsläufig spekulativ.

Legt man zugrunde, dass an allen physiologischen und pathologischen Prozessen der Milchkuh das Immunsystem und die Interaktion von Immunzellen beteiligt sind (vgl. II.3.1; II.3.2.), so kann aus diesen Beobachtungen einzig mit einiger Sicherheit geschlossen werden, dass nicht-spezifische impfinduzierte Mechanismen von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Solche impfinduzierten Prozesse beinhalten unter anderem epigenetische Modifikationen im Knochenmark und diversen peripheren Immunzellen (WEIKARD et al., 2015; NETEA et al., 2019; BYRNE et al., 2020; NETEA et al., 2020), die Freisetzung und Zirkulation immunmodulatorischer Zytokine, Prostaglandine und Peptide (DAVIES et al., 2008; HEALY et al., 2014; GUERRA-MAUPOME et al., 2019) und die Aktivität von PMN (JUSTE et al., 2016). Auch das Migrationsverhalten zirkulierender PBMC wie PMN kann über TLR gesteuert werden. Daraus ergeben sich nicht nur

systemische, sondern auch lokale Einflussbereiche von NSE (vgl. II.2.2.; II.3.2.1, II.3.2.2.).

Die Assoziation zwischen der Impfung und NRR56 lässt sich über den Carry-Over-Effekt (vgl. II.3.1.2.) von RMC und Endometritis nicht ausreichend erklären. Diese Variablen wurden bereits in den entsprechenden multivariablen Modellen als Prädiktoren berücksichtigt. Es sei darauf verwiesen, dass NSE nicht nur krankheitsbezogene, sondern auch leistungsbezogene Effekte, wie Milchleistung (SCHULZE et al., 2016; RETAMAL et al., 2022), sowie Faktoren der langfristigen Vitalität, wie beispielsweise Überlebensraten (DE BREE et al., 2018), umfassen können. Somit können auch leistungsbezogene Impfeffekte, wie eine verringerte Fruchtbarkeit, erklärt werden.

Tiere, die frühzeitig geimpft wurden, also zwischen acht und sechs Wochen vor dem Abkalbetermin, wiesen im Vergleich zu den Tieren, die später geimpft wurden (zwischen vier und zweieinhalb Wochen vor dem Abkalbetermin), eine niedrigere NRR56 und damit eine geringere Chance auf eine erfolgreiche Besamung auf. Hinweise auf mögliche Unterschiede der NSE in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Impfung wurden in einer Studie gezeigt, die Kühe miteinander verglich, welche elf bis 18 Tage nach der Abkalbung oder 120 bis 48 Tagen vor der Abkalbung mit einem Totimpfstoff geimpft wurden. Blutzell-Transkriptomanalysen wiesen auf zahlreiche signifikant unterschiedlich regulierte Gene hin (WEIKARD et al., 2015). Dies stützt die These, dass sich die impfinduzierten Prozesse deutlich in Abhängigkeit vom Impfzeitpunkt unterscheiden können und damit Auswirkungen auf die beobachteten NSE haben können. Die Impfreaktion im Zeitraum von bis zu 12 Wochen vor Geburt, also in dem von Impferstellern empfohlenen Zeitraum der Gabe von Mutterschutzimpfungen gegen Neugeborenenenddurchfall, wurde bisher allerdings nur unzureichend untersucht. Am Beispiel von zirkulierenden Leukozyten ist immerhin bekannt, dass die Stärke der Genexpressionsänderungen im Zeitraum von 20 Tagen vor bis zu sieben Tage nach der Abkalbung variiert und ihren Höhepunkt unmittelbar nach der Abkalbung findet (MINUTI et al., 2016; MINUTI et al., 2020). Gleichzeitig wird vermutet, dass es sich dabei weniger um eine Einschränkung der Funktion von Immunzellen handelt, sondern um eine Dysregulation mit erhöhter Aktivität und eingeschränkter Kompetenz (TREVISI und MINUTI, 2018).

Der genaue Einfluss des Impfzeitpunktes der Mutterschutzimpfung gegen Neugeborenenenddurchfall relativ zum Abkalbetermin ist nicht bekannt. So kann nur spekuliert werden, dass sich in Abhängigkeit vom Impfzeitpunkt die genannten Immunmediatoren (humoral und zellulär, angeboren und erworben) in ihrer Aktivität und Kompetenz unterscheiden und damit unterschiedliche inflammatorische und immunregulatorische Folgeprozesse steuern. Dies bei der Kuh zu analysieren, bleibt Gegenstand zukünftiger Studien, zumal in der Humanmedizin der Zeitfaktor für die NSE bereits diskutiert wird. Bei Impfung von Kindern vor dem ersten Lebensmonat mit BCG sowie innerhalb der ersten vier Monate gegen Diphtherie-Pertussis-Tetanus, wurden weniger Wachstumsstörungen nachgewiesen als bei Impfungen in den nachfolgenden Monaten. Als ursächlich dafür wird eine reduzierte inflammatorische Impfreaktion im jüngeren Alter diskutiert (BERENDSEN et al., 2016).

MENICHETTI et al. (2021b) untersuchten Kühe, die an Tag 21 oder 28 vor der Abkalbung gegen Neugeborenenenddurchfall geimpft wurden und stellten für die frühere Impfung positive Effekte auf die Liegezeit und das metabolische Profil fest. Allerdings lag der Fokus dieser Untersuchungen auf den Effekten der Impfung in Kombination mit dem zeitgleichen oder versetzten Stall- oder Gruppenwechsel, und die hier dargelegten Effekte wurden auf additive Stressoren durch Stallwechsel und Impfung zurückgeführt. Impfzeitpunkt-abhängige NSE, die über das angeborene Immunsystem vermittelt werden, wurden nicht diskutiert. Es lässt sich somit festhalten, dass Auswirkungen des Impfzeitpunktes auf die Ausprägung von NSE denkbar sind. Weshalb jedoch bei früh geimpften Tieren eine geringere Chance auf Besamungserfolg bestand, bleibt ungeklärt und müsste in weiteren Studien, beispielsweise unter Berücksichtigung mikrobiologischer Untersuchungen zur Gebärmuttergesundheit oder Genexpressionsanalysen zur immunologischen Reaktivität der Tiere, untersucht werden.

Die wesentlichen NSE wurden nach Einsatz von reinen Totimpfstoffen beobachtet (vgl. IV, S. 52), nicht jedoch nach Einsatz einer gemischten Lebend-/Todvakzine. Die Hypothesen, dass Totimpfstoffe negative und Lebendimpfstoffe positive NSE haben, sind Teil des aktuellen wissenschaftlichen Diskurses und könnten auf der Induktion von *innate immune tolerance* durch Totimpfstoffe und von *innate immune training* durch Lebendimpfstoffe zurückgeführt werden (BYRNE et al., 2020; NETEA et al., 2020; RUBIO-CASILLAS et al., 2024). Beide

Induktionsmechanismen beinhalten die epigenetische Re-Programmierung der Genexpression nach Bindung von Liganden in den Impfstoffen an TLR (BYRNE et al., 2020). In diesen Liganden könnten sich die hier eingesetzten Impfstoffe tatsächlich unterscheiden. Hinzu kommen Unterschiede in den verwendeten Adjuvantien, die zusätzlichen Einfluss auf die angeborene Immunmechanismen nehmen (ZHAO et al., 2023). Der Unterschied zwischen den beiden verwendeten Adjuvantien Montanide ISA 51 und Aluminiumhydroxid konnte aufgrund der linearen Abhängigkeiten (Multikollinearität) der Variablen Adjuvans und Impfstatus im Modell nicht ausreichend untersucht werden.

Bemerkenswert war, dass in der vorliegenden Studie NSE für das Organsystem Gebärmutter, nicht aber für das Euter nachgewiesen wurden, obwohl für beide Organsysteme angeborene Immunmechanismen von hoher Relevanz sind (vgl. II.3.2.). In früheren Studien wurden durchaus euterbezogene NSE in Milchkühen nachgewiesen. So sank die Mastitis-Inzidenz nach Impfung gegen BRSV, BHV-1 und PI3 Virus (CORTESE et al., 2020) und reduzierte sich die Milchleistung nach Impfung gegen *Coxiella burnetii* (SCHULZE et al., 2016). Die verbesserte Eutergesundheit in der Studie von CORTESE et al. (2020) könnte auf positive NSE des verwendeten Lebendimpfstoffes zurückzuführen sein und die verschlechterte Milchleistung in den Untersuchungen von SCHULZE et al. (2016) auf die Verwendung eines Totimpfstoffes.

Wie die Impfstoffentwicklung sich an neuen Erkenntnissen zu NSE orientieren könnte, zeigen MUNKWASE (2024) und ZIOGAS und NETEA (2022) auf. So könnten unterschiedliche NSE bei der Zulassung von neuen Impfstoffen in die Kriterien mit einbezogen werden. Wünschenswert wäre die Förderung von gesundheitsförderlichen NSE, wie sie bereits bei Lebendimpfstoffen nachgewiesen wurden (CONTRERAS et al., 2023; RUBIO-CASILLAS et al., 2024). Vielversprechend ist auch die Neu- und Weiterentwicklung von Adjuvantien unter Berücksichtigung angeborener Immunmechanismen (VERMA et al., 2023). Generell sollte das Zusammenspiel zwischen dem Gedächtnis des angeborenen und des erworbenen Immunsystems bei der Entwicklung neuer Impfstoffe und Impfstrategien in Zukunft stärker berücksichtigt werden (NETEA et al., 2019; ZIOGAS und NETEA, 2022). In diesem Zusammenhang könnten Transkriptom-Analysen zum Verständnis der Immunmechanismen beitragen, insbesondere in der fortschreitenden Ära der Hochdurchsatzsequenzierung (NAKAYA und

PULENDRAN, 2015; VERMA et al., 2023). Für das Monitoring von Impfeffekten – sowohl auf Herdenebene als auch in größeren epidemiologischen Studien – werden zukünftig sogar mehr und präzisere Daten durch die Digitalisierung der Landwirtschaft und den Fortschritt im Umgang mit Big Data sowie Robotik- und Sensorsystemen zur Verfügung stehen (CABRERA et al., 2020; GUSTERER et al., 2020). Die Untersuchungen könnten außerdem durch prädiktive Modelle des maschinellen Lernens und Künstliche Intelligenz sinnvoll ergänzt werden (WISNIESKI et al., 2019; CABRERA et al., 2020; LASSER et al., 2021).

3. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Mutterschutzimpfung gegen Neugeborenendurchfall NSE auf die Gebärmuttergesundheit und Fruchtbarkeit bei der Milchkuh bewirkt. Diese NSE basieren vermutlich auf Mechanismen der Immunmodulation unter Beteiligung von zellulären und humoralen Anteilen vornehmlich des angeborenen Immunsystems. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen, die eine erhöhte Erkrankungsrate und eine verringerte Fruchtbarkeit hervorrufen, lassen sich jedoch aufgrund fehlender gezielter Untersuchungen nicht abschließend bewerten. Auch erlauben die Ergebnisse der Studie keine Ableitung von Praxisempfehlungen für das Impfmanagement. Dies lassen die als gering zu klassifizierenden Effektstärken der statistischen Modelle und weitere Limitationen der Studie wie der mögliche Dokumentationsbias nicht zu. Es ist außerdem darauf hinzuweisen, dass beim peripartalen Impfmanagement insbesondere der Gesundheitsschutz des Kalbes im Vordergrund steht. NSE beim Muttertier müssen demnach im Gesamtkontext beurteilt werden. Für diesen Gesamtkontext ist zudem zu berücksichtigen, dass die umfangreichen Untersuchungen dieser Studie das betriebliche Management als den maßgeblichen Einflussfaktor für die Gesundheit und Leistung der Kuh identifiziert haben.

Aus den Erkenntnissen dieser Studie ergeben sich weiterführende Fragen zu den mikrobiologischen immunologischen Mechanismen nicht-spezifischer Impfeffekte in Bezug auf die Gebärmuttergesundheit und Fruchtbarkeit bei der Milchkuh. Weiterführende Untersuchungen sollten die Interaktionen zwischen dem Gedächtnis des angeborenen und des erworbenen Immunsystems, die Rolle von Lebend- und Totimpfstoffen sowie den Zeitpunkt der Impfung in Abhängigkeit

zum Abkalbetermin berücksichtigen. Genexpressionsanalysen könnten hierbei die zugrundeliegenden epigenetischen Modulationsmechanismen ermitteln. Die Impfstoffentwicklung und -zulassung sollte in Zukunft die potentiell unterschiedlichen Effekte von Lebend- und Totimpfstoffen in Betracht ziehen. Sollten sich in weiteren Studien nachteilige Effekte von Mutterschutzimpfungen mit Totbestandteilen bestätigen, wäre dies ein weiterer bedeutender Hinweis auf *innate immune tolerance*. Gesundheitsfördernde NSE von Mutterschutzimpfungen durch Trainingseffekte (*innate immune training*), wie sie bereits bei der Verwendung einiger Lebendimpfstoffe in der Humanmedizin dokumentiert sind, könnten hingegen eine vielversprechende Möglichkeit zur Optimierung des Transitmanagements darstellen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Caroline Kuhn (2025)

Immunmodulation durch Mutterschutzimpfung: Effekte auf Gesundheit und Leistung von Milchkühen im geburtsnahen Zeitraum

Die peripartale Phase der Milchkuh ist durch eine erhöhte Anfälligkeit für Euter- und Gebärmuttererkrankungen sowie durch eine eingeschränkte Immunkompetenz gekennzeichnet. Die Mutterschutzimpfung gegen Neugeborenenenddurchfall wird einige Wochen vor der Geburt appliziert, um das Kalb zu schützen, fällt jedoch in diesen sensiblen geburtsnahen Zeitraum der Mutter. Mögliche Effekte dieser Impfung auf die postpartale Gesundheit und Leistung der Milchkuh wurden bislang nur unzureichend untersucht. Hierbei rücken nicht-spezifische Impfeffekte (NSE), die über die antigenspezifische Immunantwort hinausgehen und die Anfälligkeit gegenüber Infektionserregern beeinflussen, zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus.

Ziel dieser Studie war es deshalb, den Einfluss der Mutterschutzimpfung auf postpartale Gesundheits- und Leistungsparameter von Milchkühen zu analysieren. Hierfür standen Bestandsdaten von insgesamt 73.378 Kühen aus 20 Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg und Sachsen-Anhalt aus dem Zeitraum zwischen Januar 2007 und September 2020 zur Verfügung. Ergänzt wurden diese Daten durch Gesundheits-, Milchleistungs- und Reproduktionsdaten. Zusätzlich wurden Daten zum Betriebs- und Impfmanagement im Rahmen von Betriebsbesuchen erhoben.

Mithilfe von *Decision tree*-Algorithmen (*Random Forest*) wurde zunächst eine Hierarchisierung der Variablen (*variable importance*) vorgenommen, um die Stärke ihres Einflusses auf die Gesundheits- und Leistungsparameter besser beurteilen zu können. Im nächsten Schritt wurden dann alle geeigneten Prädiktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zielvariablen Mastitis, somatische Zellzahl, energiekorrigierte 305-Tages-Milchleistung, Nachgeburtsverhaltung, Metritis, Endometritis und Non-Return-Rate in univariablen generalisierten linearen gemischten Modellen untersucht. Die anschließenden multivariablen Analysen zur Untersuchung der Effekte der Impfung auf die genannten Zielvariablen wurden

mittels generalisierter linearer gemischter Modelle durchgeführt. Für einige Analysen wurde eine Teilmenge untersucht (primipare Kühe, multipare Kühe, gesunde Kühe, mit einem Totimpfstoff geimpfte Kühe), um Störfaktoren zu minimieren. Die ursprünglichen Analysen zum Vergleich von geimpften und nicht-geimpften Tieren wurden zudem um die Variablen „Impfzeitpunkt“ (frühe Impfung zwischen acht und sechs Wochen vor Abkalbetermin; späte Impfung zwischen vier und zweieinhalb Wochen vor Abkalbetermin) und „Art des Impfstoffes“ (Totimpfstoff; Kombination aus Tot- und Lebendimpfstoff) erweitert. Die Variablen „Betrieb“ und „Kalbejahr“, welche sich bereits im *Random Forest*-Modell als einflussreichste Variablen herausgestellt hatten, wurden als Zufallseffekte in den gemischten Modellen berücksichtigt. Die geschachtelte (*nested*) Struktur dieser Zufallseffekte erwies sich dabei als die geeignetste Methode und wurde durch die Prüfung mit dem Akaike-Informationskriterium gestützt. Zudem wurde unter Berücksichtigung der Modellleistung die manuelle Rückwärtsselektion ausgeführt. Aufgrund der mit der Größe des Datensatzes einhergehenden erhöhten Wahrscheinlichkeit von Typ-1-Fehlern wurde der Schwellenwert für den p-Wert individuell für jedes univariable und multivariable Modell angepasst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten keinen signifikanten Einfluss der Mutterschutzimpfung auf Eutergesundheit und Milchleistung in der nachfolgenden Laktation nachweisen. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede bezüglich Eutergesundheit und Milchleistung zwischen den Betrieben größer ist als zwischen geimpften und nicht-geimpften Kühen. Dies unterstreicht den dominierenden Einfluss von Herdenmanagementmaßnahmen auf die postpartale Eutergesundheit. Die Impfung - insbesondere die Art des Impfstoffes sowie der Impfzeitpunkt - hatte allerdings Effekte auf die Gebärmuttergesundheit und die Fruchtbarkeit. Dabei hatten Kühe, die mit einem Totimpfstoff geimpft wurden, eine höhere Wahrscheinlichkeit an Nachgeburtsverhaltung, Metritis oder Endometritis zu erkranken sowie eine geringere Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Besamung. Unter den Tieren, die mit einem Totimpfstoff geimpft wurden, zeigte sich bei früher Impfung eine geringere Fruchtbarkeit im Vergleich zu später Impfung.

Eine Limitation der Studie liegt in der Datengrundlage, die potenziell einem Dokumentationsbias unterliegt. Dennoch weist die Studie methodische und

statistische Stärken auf, insbesondere die Kohärenz der verwendeten Prädiktoren mit der Literatur. Zudem erwiesen sich die eingesetzten Modelle als flexibel und stabil. In Kombination mit Machine-Learning-Algorithmen und hoher statistischer Power untermauern sie die Robustheit der Ergebnisse.

Die in dieser Studie beobachtete erhöhte Wahrscheinlichkeit von Gebärmuttererkrankungen sowie die reduzierte Fruchtbarkeit bei Kühen, die mit einem Totimpfstoff geimpft wurden, lassen sich vermutlich durch Mechanismen der angeborenen Immuntoleranz erklären. Die genauen immunologischen Mechanismen bleiben jedoch spekulativ. Weitere Studien sind erforderlich, um die Effekte von Lebend- und Totimpfstoffen, den Impfzeitpunkt in Relation zum Abkalbetermin sowie die Rolle von Adjuvantien genauer zu untersuchen. Experimentelle Studien unter Zuhilfenahme von Genexpressionsanalysen könnten zudem die Immunantwort funktionell präziser beschreiben.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse bezüglich NSE von Mutterschutzimpfungen bei Milchkühen im geburtsnahen Zeitraum sind neuartig und geben wertvolle Hinweise für die weitere immunologische Forschung in diesem Bereich. Bei der Impfstoffentwicklung könnte die Berücksichtigung angeborener Immunmechanismen und des angeborenen immunologischen Gedächtnisses zukunftsweisend sein.

VII. SUMMARY

Caroline Kuhn (2025)

Immunomodulation by prepartum vaccination: effects on the health and performance of the periparturient dairy cow

The peripartum phase of the dairy cow is characterized by an increased susceptibility to mammary and uterine diseases as well as reduced immune competence. The prepartum vaccination against newborn calf diarrhea is administered a few weeks before calving to protect the calf, but falls within this sensitive peripartum period of the mother. The potential effects of this vaccination on the postpartum health and performance of the dairy cow have rarely been investigated so far. These non-specific effects of vaccination (NSE), which extend beyond the antigen-specific immune response and alter the susceptibility to infectious agents, are increasingly gaining attention in scientific discussions.

Therefore, the aim of this study was to analyze the influence of prepartum vaccination on postpartum health and performance of dairy cows. For this purpose, herd data from a total of 73,378 cows from 20 dairy farms in Mecklenburg-Western Pomerania, Brandenburg and Saxony-Anhalt from the period between January 2007 and September 2020 were obtained. This data was assembled with milk recordings, health and reproductive documentation. In addition, on-site surveys were conducted to collect information on vaccination and herd management of the farms.

Using decision tree algorithms (*Random Forest*), the variables were hierarchized for variable importance. All eligible predictors were examined with regard to their influence on the response variables mastitis, somatic cell count, energy-corrected 305-day milk yield, retained placenta, metritis, endometritis and non-return rate in univariable generalized linear mixed models.

The subsequent multivariable analyses to investigate the effects of vaccination on the response variables were carried out using generalized linear mixed models. For some analyses, a subset was formed (primiparous cows, multiparous cows, healthy cows, cows vaccinated with a non-live vaccine) to minimize confounding factors. Furthermore, the comparison of vaccinated and non-vaccinated animals was

expanded by the analysis of the effects of “time of vaccination” (early vaccination between eight and six weeks before calving; late vaccination between four and two and a half weeks before calving) and “type of vaccine” (non-live vaccine; combination of non-live and live vaccine). The variables “farm” and “calving year”, which had already proven to be the most influential variables in the variable importance, were included as random effects. A nested structure of these random effects was supported by the test with the Akaike information criterion. In addition, manual backward selection was performed taking into account the model performance. Due to the increased probability of type 1 errors associated with the size of the data set, the p-value threshold was adjusted for each univariable and multivariable model.

The results of the present study showed no significant influence of prepartum vaccination on mammary health and milk yield in the subsequent lactation. Instead, it was shown that the differences in mammary health and milk yield between farms were greater than between vaccinated and non-vaccinated cows. This emphasizes the dominant influence of herd management on postpartum mammary health. However, vaccination - especially the type of vaccine and the time of vaccination - had an effect on uterine health and fertility. Cows vaccinated with a non-live vaccine were more likely to have retained placenta, metritis or endometritis and were less likely to be successfully inseminated. Among those animals vaccinated with a non-live vaccine, early vaccination resulted in lower fertility compared to late vaccination.

A limitation of the study is its data base, which is potentially subject to a documentation bias. Nevertheless, the study has methodological and statistical strengths, in particular the coherence of the predictors with the literature. In addition, the models proved to be flexible and stable. In combination with machine learning algorithms and high statistical power, they underpin the robustness of the findings.

The increased likelihood of uterine disease and reduced fertility in cows vaccinated with a non-live vaccine observed in the present study can presumably be explained by mechanisms of innate immune tolerance. However, the exact immunological pathways remain hypothetical. Further studies are needed to investigate the effects of live and non-live vaccines, the timing of vaccination in relation to calving and the role of adjuvants. Experimental studies using gene expression profiling could

provide a more precise functional description of the immune response after vaccination.

The findings obtained in this study regarding NSE of prepartum vaccinations in dairy cows are novel and provide valuable information for further immunological research in this area. The consideration of innate immune mechanisms and innate immunological memory could lead to innovations in vaccine development.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Åkerstedt M, Forsbäck L, Larsen T, Svennersten-Sjaunja K. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *Journal of Dairy Research* 2011; 78: 88-96.

Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B, Fisher AD. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Res Vet Sci* 2016; 108: 8-17.

Alluwaimi AM. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res Vet Sci* 2004; 77: 211-22.

Anselem O, Parat S, Théau A, Floret D, Tsatsaris V, Goffinet F, Launay O. Vaccinations et grossesse. *La Presse Médicale* 2014; 43: 715-21.

Arega SM, Knobel DL, Toka FN, Conan A. Non-specific effects of veterinary vaccines: a systematic review. *Vaccine* 2022; 40: 1655-64.

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Frontiers in immunology* 2013; 4.

Aziz-Boaron O, Leibovitz K, Gelman B, Kedmi M, Klement E. Safety, Immunogenicity and Duration of Immunity Elicited by an Inactivated Bovine Ephemeral Fever Vaccine. *PloS one* 2013; 8: e82217.

Barański W, Baryczka A, Zduńczyk S, Tobolski D, Janowski T. Prevalence of subclinical endometritis in dairy cows that recovered after treatment of clinical endometritis with cephapirin and PGF2 α . *Theriogenology* 2022; 192: 166-71.

Barbosa AA, Figueiredo ACS, Palhao MP, Viana JHM, Fernandes CAC. Safety of vaccination against brucellosis with the rough strain in pregnant cattle. *Trop Anim Health Prod* 2017; 49: 1779-81.

Barkema HW, Schukken YH, Lam TJ, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci* 1998; 81: 411-9.

Bechtold V, Petzl W, Huber-Schlenstedt R, Sorge US. Distribution of Bovine Mastitis Pathogens in Quarter Milk Samples from Bavaria, Southern Germany, between 2014 and 2023—A Retrospective Study. *Animals* 2024; 14: 2504.

Berendsen MLT, Smits J, Netea MG, Van Der Ven A. Non-specific Effects of Vaccines and Stunting: Timing May Be Essential. *EBioMedicine* 2016; 8: 341-8.

Berge AC, Besser TE, Moore DA, Sisco WM. Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. *J Dairy Sci* 2009; 92: 286-95.

Bertoni G, Trevisi E, Lombardelli R. Some new aspects of nutrition, health conditions and fertility of intensively reared dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* 2009; 8: 491-518.

BfArM. Gebrauchsinformation: Rotavec Corona. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2010; 17. Februar 2025:
<https://portal.dimdi.de/amispb/doc/pei/Web/2603419-palde-20100501.pdf>.

BfArM. Zusammenfassung der Merkmale des Tierarzneimittels. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2013; 17. Februar 2025:
<https://portal.dimdi.de/amispb/doc/pei/Web/2603670-spcde-20131101.pdf>.

BfArM. Bovigen Scour. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte 2015; 17. Februar 2025:
<https://portal.dimdi.de/amguifree/am/docoutput/jpadocdisplay.xhtml?globalDocId=D177C92C25144319A39E604576AF1AF1&directdisplay=true&docid=1>.

Bradley AJ, Green MJ. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2004; 20: 547-68.

- Burton JL, Madsen SA, Yao J, Sipkovsky SS, Coussens PM. An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows. *Acta Vet Scand* 2001; 42: 407-24.
- Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003; 19: 1-45.
- Burton JL, Madsen SA, Chang LC, Weber PS, Buckham KR, van Dorp R, Hickey MC, Earley B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105: 197-219.
- Byrne KA, Loving CL, McGill JL. Innate Immunomodulation in Food Animals: Evidence for Trained Immunity? *Frontiers in immunology* 2020; 11: 1099.
- Cabrera VE, Barrientos-Blanco JA, Delgado H, Fadul-Pacheco L. Symposium review: Real-time continuous decision making using big data on dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2020; 103: 3856-66.
- Chambers GP, Kelton W, Smolenski G, Cuttance E. Impact of prepartum administration of a vaccine against infectious calf diarrhea on nonspecific colostral immunoglobulin concentrations of dairy cows. *Journal of animal science* 2022; 100: 1-12.
- Chigerwe M, Hagey JV, Aly SS. Determination of neonatal serum immunoglobulin G concentrations associated with mortality during the first 4 months of life in dairy heifer calves. *Journal of Dairy Research* 2015; 82: 400-6.
- Chucuri TM, Monteiro JM, Lima AR, Salvadori ML, Kfoury JR, Jr., Miglino MA. A review of immune transfer by the placenta. *J Reprod Immunol* 2010; 87: 14-20.
- Cibulski SP, Rivera-Patron M, Mourglia-Ettlin G, Casaravilla C, Yendo ACA, Fett-Neto AG, Chabalgoity JA, Moreno M, Roehe PM, Silveira F. Quillaja brasiliensis saponin-based nanoparticulate adjuvants are capable of triggering early immune responses. *Scientific Reports* 2018; 8: 13582.

- Contreras C, Alegría-Moran R, Duchens M, Ábalos P, López R, Retamal P. Specific and non-specific effects of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in dairy calves. *Frontiers in Veterinary Science* 2023; 10: 1278329.
- Cook JG, Pepler PT, Viora L, Hill DL. Assessing Transition Cow Management in Dairy Cows for Improved Health, Milk Production, Pregnancy and Culling Outcomes. *J Dairy Sci* 2024; 107: 11381-97.
- Cortese V (2010) Vaccination of dairy cattle. Forty-third Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners. Albuquerque, New Mexico.
- Cortese VS, Pinedo PJ, Manriquez D, Velasquez-Munoz A, Solano G, Short TH, Cleale R, Edwards G, Montgomery T, Pedraza JR, Bachtell R. Effect of periparturient intranasal vaccination on post parturient health parameters in holstein cows. *Concepts of Dairy and Veterinary Sciences* 2020; 3: 318-27.
- Crowe MA, Hostens M, Opsomer G. Reproductive management in dairy cows - the future. *Ir Vet J* 2018; 71: 1.
- Curone G, Filipe J, Inglesi A, Bronzo V, Pollera C, Comazzi S, Draghi S, Piccinini R, Ferlazzo G, Quattrone A, Vigo D, Amadori M, Riva F. Different Immune Control of Gram-Positive and Gram-Negative Mammary Infections in Dairy Cows. *Vet Sci* 2024; 11: 166.
- Curtis CR, Mauritsen RH, Kass PH, Salman MD, Erb HN. Ordinary versus random-effects logistic regression for analyzing herd-level calf morbidity and mortality data. *Preventive Veterinary Medicine* 1993; 16: 207-22.
- Daha MR. Grand challenges in molecular innate immunity. *Frontiers in immunology* 2011; 2: 16.
- Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon IM. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2008; 6: 53.

de Bree LCJ, Koeken V, Joosten LAB, Aaby P, Benn CS, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of vaccines: Current evidence and potential implications. *Seminars in Immunology* 2018; 39: 35-43.

De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD, Paape MJ, Peelman L, Burvenich C. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2008; 39: 5.

Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL, Duffield TF, Keefe GP, Kelton DF, Lissemore KD, Conklin J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. *Prev Vet Med* 2004; 63: 75-89.

Doggweiler R, Hess E. Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter. *Milchwissenschaft* 1983; 38: 5-8.

Dougherty AM, Cornish TE, O'Toole D, Boerger-Fields AM, Henderson OL, Mills KW. Abortion and premature birth in cattle following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25: 630-5.

Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science* 1999; 82: 2259-73.

Durel L, Rose C, Bainbridge T, Roubert J, Dressel K-U, Bennemann J, Rückner A, Vahlenkamp T, Maillard R. Immune response of mature cows subjected to annual booster vaccination against neonatal calf diarrhoea with two different commercial vaccines: A non-inferiority study. *Livestock Science* 2017; 204: 52-8.

DVG. Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Gießen: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; 2012.

DVG. Zur Prävalenz von Mastitiserregern in Milchproben in Deutschland - Update 2022. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) 2022: https://www.dvg.de/wp-content/uploads/2024/04/24-03-19_AG-Euter_Praevalenz-Mastitiserreger2022.pdf. 27 September 2024.

Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2014; 144: 60-71.

Ezzat Alnakip M, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine* 2014: 1-31.

Falkenberg SM, Dassanayake RP, Crawford L, Sarlo Davila K, Boggiatto P. Response to Bovine Viral Diarrhea Virus in Heifers Vaccinated with a Combination of Multivalent Modified Live and Inactivated Viral Vaccines. *Viruses* 2023; 15: 703.

Firth CL, Laubichler C, Schleicher C, Fuchs K, Käsbohrer A, Egger-Danner C, Köfer J, Obritzhauser W. Relationship between the probability of veterinary-diagnosed bovine mastitis occurring and farm management risk factors on small dairy farms in Austria. *Journal of Dairy Science* 2019; 102: 4452-63.

Forrest BD, Pride MW, Dunning AJ, Capeding MRZ, Chotpitayasunondh T, Tam JS, Rappaport R, Eldridge JH, Gruber WC. Correlation of Cellular Immune Responses with Protection against Culture-Confirmed Influenza Virus in Young Children. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008; 15: 1042-53.

Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 2000; 53: 1729-59.

Freedman MS, Kroger AT. Chapter 10 - General Immunization Practices. In: Plotkin's Vaccines (Eighth Edition). Orenstein W, Offit P, Edwards KM, Plotkin S, Hrsg. Philadelphia: Elsevier 2023: 113-44.

Ganter M, Müller K, Böttcher J, Clausen PH, Donat K, Gethmann J, Holsteg M, Münsterer P, Strobel H, Truyen U. Leitlinie zur Impfung von Rindern und kleinen Wiederkäuern. Greifswald: Ständige Impfkommision Veterinärmedizin (STIKo Vet) am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit; 2021.

Gao Y, Lin X, Shi K, Yan Z, Wang Z. Bovine mammary gene expression profiling during the onset of lactation. *PloS one* 2013; 8: e70393.

Geckin B, Konstantin Föhse F, Domínguez-Andrés J, Netea MG. Trained immunity: implications for vaccination. *Current Opinion in Immunology* 2022; 77: 102190.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64: 1879-88.

Goff JP, Horst RL. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders^{1, 2}. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1260-8.

Gonzalez R, Elvira L, Carbonell C, Vertenten G, Fraile L. The Specific Immune Response after Vaccination against Neonatal Calf Diarrhoea Differs between Apparent Similar Vaccines in a Case Study. *Animals* 2021; 11: 1238.

Good IJ. The Interface Between Statistics and Philosophy of Science. *Statistical Science* 1988; 3: 386-97.

Grummer RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of animal science* 1995; 73: 2820-33.

Grunert E (1996) *Buiatrik: Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. Schaper, Hannover. 320.

Guerra-Maupome M, Vang DX, McGill JL. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PloS one* 2019; 14: e0212751.

Günther J, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Seyfert HM. TLR ligands, but not modulators of histone modifiers, can induce the complex immune response pattern of endotoxin tolerance in mammary epithelial cells. *Innate Immun* 2017; 23: 155-64.

Gusterer E, Kanz P, Krieger S, Schweinzer V, Süss D, Lidauer L, Kicking F, Öhlschuster M, Auer W, Drillich M, Iwersen M. Sensor technology to support herd health monitoring: Using rumination duration and activity measures as unspecific variables for the early detection of dairy cows with health deviations. *Theriogenology* 2020; 157: 61-9.

Hagnestam C, Emanuelson U, Berglund B. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *Journal of Dairy Science* 2007; 90: 2260-70.

Hamann J, Fehlings K (2002) Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem, 4. Aufl. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) Fachgruppe "Milchhygiene", Gießen

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113: 21-9.

He Y. Comparison of Protective Efficacy between a Live Attenuated and an Inactivated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine. *Acta Scientific Veterinary Sciences* 2023; 12: 3-13.

Healy LL, Cronin JG, Sheldon IM. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Scientific Reports* 2014; 4: 7060.

Hoedemaker M, Mansfeld R, de Kruif A. Eutergesundheit und Milchqualität. In: Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Hoedemaker M, Mansfeld R, de Kruif A, Hrsg.: Enke Verlag 2013: 360.

Horst RL, Jorgensen NA. Elevated Plasma Cortisol during Induced and Spontaneous Hypocalcemia in Ruminants¹. *Journal of Dairy Science* 1982; 65: 2332-7.

Ingvarsen KL, Dewhurst RJ, Friggens NC. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause

production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science* 2003; 83: 277-308.

Institute of Medicine (2012) *Adverse Effects of Vaccines: Evidence and Causality*. The National Academies Press, Washington, D.C. 894.

Juste RA, Alonso-Hearn M, Garrido JM, Abendaño N, Sevilla IA, Gortazar C, de la Fuente J, Dominguez L. Increased Lytic Efficiency of Bovine Macrophages Trained with Killed Mycobacteria. *PloS one* 2016; 11: e0165607.

Juste RA, Geijo MV, Elguezabal N, Sevilla IA, Alonso-Hearn M, Garrido JM. Paratuberculosis vaccination specific and non-specific effects on cattle lifespan. *Vaccine* 2021; 39: 1631-41.

Kehrli ME, Jr., Goff JP, Stevens MG, Boone TC. Effects of granulocyte colony-stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding. *J Dairy Sci* 1991; 74: 2448-58.

Kelton DF, Lissemore KD, Martin RE. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2502-9.

Kerwin AL, Burhans WS, Nydam DV, Overton TR. Transition cow nutrition and management strategies of dairy herds in the northeastern United States: Part III—Associations of management and dietary factors with analytes, health, milk yield, and reproduction. *Journal of Dairy Science* 2023; 106: 1246-66.

Kim J, Kim D, Noh H, Hong L, Chun E, Kim E, Ro Y, Choi W. Analysis of Acute Phase Response Using Acute Phase Proteins Following Simultaneous Vaccination of Lumpy Skin Disease and Foot-and-Mouth Disease. *Vaccines* 2024; 12: 556.

Kimura K, Goff JP, Kehrli ME. Effects of the Presence of the Mammary Gland on Expression of Neutrophil Adhesion Molecules and Myeloperoxidase Activity in Periparturient Dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science* 1999; 82: 2385-92.

Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LAB, Ifrim DC, Saeed S, Jacobs C, van Loenhout J, Jong D, Stunnenberg HG, Xavier RJ, van der Meer JWM, van Crevel R, Netea MG. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109: 17537-42.

Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H, Tsunemitsu H. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 1023-5.

Kreienbrock L, Pigeot I, Ahrens W (2012) *Epidemiologische Methoden*, 5. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Laris-González A, Bernal-Serrano D, Jarde A, Kampmann B. Safety of Administering Live Vaccines during Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Pregnancy Outcomes. *Vaccines* 2020; 8: 124.

Lasser J, Matzhold C, Egger-Danner C, Fuerst-Waltl B, Steininger F, Wittek T, Klimek P. Integrating diverse data sources to predict disease risk in dairy cattle—a machine learning approach. *Journal of animal science* 2021; 99: 294.

Lawson LG, Bruun J, Coelli T, Agger JF, Lund M. Relationships of efficiency to reproductive disorders in Danish milk production: a stochastic frontier analysis. *J Dairy Sci* 2004; 87: 212-24.

Lean IJ, DeGaris PJ. The Farm Audit: Health and Management of the Transition Cow. In: *Bovine medicine*, 3.Aufl. Cockcroft P, ed. Chichester, England: Wiley Blackwell 2015: 381-7.

LeBlanc S. Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. *The Journal of reproduction and development* 2010; 56 Suppl: 1-7.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2223-36.

LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Veterinary Journal* 2008; 176: 102-14.

LeBlanc SJ. Review: Postpartum reproductive disease and fertility in dairy cows. *Animal* 2023; 17 Suppl 1: 100781.

Lorenz I, Fagan J, More SJ. Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Veterinary Journal* 2011; 64: 9.

Lydyard P, Whelan A, Fanger M (2011) *Immunology*, 3.Aufl. Taylor & Francis, New York and London. 368.

Machado VS, Silva TH. Adaptive immunity in the postpartum uterus: Potential use of vaccines to control metritis. *Theriogenology* 2020; 150: 201-9.

Maier GU, Breitenbuecher J, Gomez JP, Samah F, Fausak E, Van Noord M. Vaccination for the Prevention of Neonatal Calf Diarrhea in Cow-Calf Operations: A Scoping Review. *Veterinary and Animal Science* 2022; 15: 100238.

Makoschey B, Van Kilsdonk E, Hubers WR, Vrijenhoek MP, Smit M, Wichgers Schreur PJ, Kortekaas J, Moulin V. Rift Valley Fever Vaccine Virus Clone 13 Is Able to Cross the Ovine Placental Barrier Associated with Foetal Infections, Malformations, and Stillbirths. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016; 10: e0004550.

Meçaj R, Muça G, Koleci X, Sulce M, Turmalaj L, Zalla P, Koni A, Myqerem T, and Biosciences I. Bovine Environmental Mastitis and Their Control: An Overview. *International Journal of Agriculture and Biosciences* 2023; 12: 216-21.

Mehrzaad J, Duchateau L, Pyörälä S, Burvenich C. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3268-76.

Menichetti BT, Garcia-Guerra A, Lakritz J, Weiss WP, Velez JS, Bothe H, Merchan D, Schuenemann GM. Effects of prepartum vaccination timing relative

to pen change with an acidogenic diet on serum and colostrum immunoglobulins in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2021a; 104: 11072-81.

Menichetti BT, Garcia-Guerra A, Lakritz J, Weiss WP, Velez JS, Bothe H, Merchan D, Schuenemann GM. Effect of timing of prepartum vaccination relative to pen change with an acidogenic diet on lying time and metabolic profile in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2021b; 104: 11059-71.

Merle R, Hoedemaker M, Knubben-Schweizer G, Metzner M, Müller K-E, Campe A. Application of Epidemiological Methods in a Large-Scale Cross-Sectional Study in 765 German Dairy Herds—Lessons Learned. *Animals* 2024; 14: 1385.

Milićević V, Veljović L, Maksimović-Zorić J, Žutić J, Kureljučić B, Radosavljević V, Jezdimirović N, Radojičić S. Some adverse events following immunization in veterinary medicine. *Archives of Veterinary Medicine* 2018; 11: 67-77.

Minuti A, Jahan N, Piccioli-Capelli F, Bomba L, Capomaccio S, Loor JJ, Ajmone-Marsan P, Trevisi E. Evaluation of immune function of circulating leukocytes during the transition period in dairy cows. *Journal of animal science* 2016; 94: 513-4.

Minuti A, Jahan N, Lopreiato V, Piccioli-Cappelli F, Bomba L, Capomaccio S, Loor JJ, Ajmone-Marsan P, Trevisi E. Evaluation of circulating leukocyte transcriptome and its relationship with immune function and blood markers in dairy cows during the transition period. *Functional & Integrative Genomics* 2020; 20: 293-305.

Mulligan FJ, O'Grady L, Rice DA, Doherty ML. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 331-53.

Mulligan FJ, Doherty ML. Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal* 2008; 176: 3-9.

Munkwase G. Implications of vaccine non-specific effects on licensure of new vaccines. *Vaccine* 2024; 42: 1013-21.

Muskett JC, Reed NE, Thornton DH. Increased virulence of an infectious bursal disease live virus vaccine after passage in chicks. *Vaccine* 1985; 3: 309-12.

Nakaya HI, Pulendran B. Vaccinology in the era of high-throughput biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2015; 370: 20140146.

Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host & Microbe* 2019; 25: 13-26.

Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Joosten LAB, van der Meer JWM, Mhlanga MM, Mulder WJM, Riksen NP, Schlitzer A, Schultze JL, Stabell Benn C, Sun JC, Xavier RJ, Latz E. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 2020; 20: 375-88.

Nielsen HS, Oleksiewicz MB, Forsberg R, Stadejek T, Bøtner A, Storgaard T. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen Virol* 2001; 82: 1263-72.

Niozas G, Tsousis G, Steinhöfel I, Brozos C, Römer A, Wiedemann S, Bollwein H, Kaske M. Extended lactation in high-yielding dairy cows. I. Effects on reproductive measurements. *Journal of Dairy Science* 2019a; 102: 799-810.

Niozas G, Tsousis G, Malesios C, Steinhöfel I, Boscós C, Bollwein H, Kaske M. Extended lactation in high-yielding dairy cows. II. Effects on milk production, udder health, and body measurements. *Journal of Dairy Science* 2019b; 102: 811-23.

Nyman AK, Emanuelson U, Waller KP. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. *Journal of Dairy Science* 2016; 99: 1440-8.

Oliver SP, Sordillo LM. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci* 1988; 71: 2584-606.

Pascottini OB, LeBlanc SJ. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology* 2020; 150: 193-200.

Pascottini OB, Probo M, LeBlanc SJ, Opsomer G, Hostens M. Assessment of associations between transition diseases and reproductive performance of dairy cows using survival analysis and decision tree algorithms. *Prev Vet Med* 2020; 176: 104908.

Pascottini OB, Leroy J, Opsomer G. Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2022; 57: 21-32.

Pérez-Báez J, Silva TV, Risco CA, Chebel RC, Cunha F, De Vries A, Santos JEP, Lima FS, Pinedo P, Schuenemann GM, Bicalho RC, Gilbert RO, Rodriguez-Zas S, Seabury CM, Rosa G, Thatcher WW, Galvão KN. The economic cost of metritis in dairy herds. *Journal of Dairy Science* 2021; 104: 3158-68.

Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1055-65.

Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 2010; 74: 127-34.

Praeger W. Untersuchungen zur Auswirkungen von prophylaktischen Maßnahmen zum Mutterschutz bei Milchkühen auf die Gesundheit der Kälber und der Mütter in der Folgelaktation. Masterarbeit. 2020. Universität Rostock.

Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology* 2011; 12: 509-17.

Pyörälä S. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reproduction in domestic animals* 2008; 43: 252-9.

Raboisson D, Mounié M, Maigné E. Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: A meta-analysis and review. *Journal of Dairy Science* 2014; 97: 7547-63.

Rearte R, LeBlanc SJ, Corva SG, de la Sota RL, Lacau-Mengido IM, Giuliodori MJ. Effect of milk production on reproductive performance in dairy herds. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 7575-84.

Retamal P, Ábalos P, Alegría-Morán R, Valdivieso N, Vordermeier M, Jones G, Saadi K, Perez Watt C, Salinas C, Ávila C, Padilla V, Benavides B, Orellana R. Vaccination of Holstein heifers with *Mycobacterium bovis* BCG strain induces protection against bovine tuberculosis and higher milk production yields in a natural transmission setting. *Transboundary and Emerging Diseases* 2022; 69: 1419-25.

Ribeiro ES, Gomes G, Greco LF, Cerri RLA, Vieira-Neto A, Monteiro PLJ, Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Santos JEP. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2016; 99: 2201-20.

Rienesl L, Khayatdadeh N, Köck A, Egger-Danner C, Gengler N, Grelet C, Dale LM, Werner A, Auer FJ, Leblois J, Sölkner J. Prediction of Acute and Chronic Mastitis in Dairy Cows Based on Somatic Cell Score and Mid-Infrared Spectroscopy of Milk. *Animals (Basel)* 2022; 12: 1830.

Röbl-Mathieu M, Kunstein A, Liese J, Mertens T, Wojcinski M. Vaccination in Pregnancy. *Dtsch Arztebl Int* 2021; 118: 262-8.

Rodriguez Z, Shepley E, Endres MI, Cramer G, Caixeta LS. Assessment of milk yield and composition, early reproductive performance, and herd removal in multiparous dairy cattle based on the week of diagnosis of hyperketonemia in early lactation. *J Dairy Sci* 2022; 105: 4410-20.

Rubio-Casillas A, Rodriguez-Quintero CM, Redwan EM, Gupta MN, Uversky VN, Raszek M. Do vaccines increase or decrease susceptibility to diseases other than those they protect against? *Vaccine* 2024; 42: 426-40.

Sanchez L, Campos-Chillon F, Sargolzaei M, Peterson DG, Sprayberry KA, McArthur G, Anderson P, Golden B, Pokharel S, Abo-Ismael MK. Molecular Mechanisms Associated with the Development of the Metritis Complex in Dairy Cattle. *Genes (Basel)* 2024; 15: 439.

Schepers AJ, Lam TJ, Schukken YH, Wilmink JB, Hanekamp WJ. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1833-40.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res* 2003; 34: 579-96.

Schukken YH, Hertl J, Bar D, Bennett GJ, González RN, Rauch BJ, Santisteban C, Schulte HF, Tauer L, Welcome FL, Gröhn YT. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2009; 92: 3091-105.

Schulze LSC, Borchardt S, Ouellet V, Heuwieser W. Effect of a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine on body temperature and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2016; 99: 541-50.

Scott HM, Sargeant JM, Ireland MJ, Lissemore KD, Leslie KE, Kelton DF, Mallard BA. Effects of a core antigen vaccine against gram-negative bacteria on physiologic and yield parameters of dairy cows during late lactation and the dry period. *Journal of Dairy Science* 1998; 81: 1928-35.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 1516-30.

Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth H-J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of reproduction* 2009; 81: 1025-32.

Shmueli G. To Explain or to Predict? *Statistical Science* 2010; 25: 289-310.

Smith BI, Rieger RH, Dickens CM, Schultz RD, Aceto H. Anti-bovine herpesvirus and anti-bovine viral diarrhea virus antibody responses in pregnant Holstein dairy cattle following administration of a multivalent killed virus vaccine. *American journal of veterinary research* 2015; 76: 913-20.

Sordillo LM. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science* 2005; 98: 89-99.

Sordillo LM, Mavangira V. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Animal Production Science* 2014; 54: 1204.

Ster C, Loisel MC, Lacasse P. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 708-17.

Tizard IR (2013) *Veterinary Immunology*, 9. Aufl. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri. 568.

Trevisi E, Minuti A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in Veterinary Science* 2018; 116: 47-54.

Verma SK, Mahajan P, Singh NK, Gupta A, Aggarwal R, Rappuoli R, Johri AK. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. *Frontiers in immunology* 2023; 14: 1043109.

Vidlund J, Gelalcha BD, Gillespie BE, Agga GE, Schneider L, Swanson SM, Frady KD, Kerro Dego O. Efficacy of novel staphylococcal surface associated protein vaccines against *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vaccine* 2024; 42: 1247-58.

Viidu D-A, Mõtus K. Implementation of a pre-calving vaccination programme against rotavirus, coronavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* (F5) and association with dairy calf survival. *BMC Veterinary Research* 2022; 18: 59.

VIT. Jahresbericht. Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w. V. (VIT) 2023: <https://www.vit.de/fileadmin/Wir-sind-vit/Jahresberichte/vit-JB2023-gesamt.pdf>. 31 Juli 2025.

Vlasova AN, Saif LJ. Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 643206.

Walter K. Fütterung und Haltung von Hochleistungskühen : 8. Verluste durch Mastitis und Lahmheit. *Landbauforschung = Applied agricultural and forestry research : journal of applied research in agriculture and forestry* 2013; 63: 255-62.

Weikard R, Demasius W, Hadlich F, Kühn C. Different Blood Cell-Derived Transcriptome Signatures in Cows Exposed to Vaccination Pre- or Postpartum. *PloS one* 2015; 10: e0136927.

Wenz JR, Giebel SK. Retrospective evaluation of health event data recording on 50 dairies using Dairy Comp 305. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 4699-706.

Wickham H, Grolemund G (2016) *R for data science*, 1.Aufl. O'Reilly, Beijing; Cambridge; Farnham; Sebastopol; Tokyo

Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007; 68: 549-59.

Wisnieski L, Norby B, Pierce SJ, Becker T, Sordillo LM. Prospects for predictive modeling of transition cow diseases. *Anim Health Res Rev* 2019; 20: 19-30.

Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, Tian X. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023; 8: 283.

Ziogas A, Netea MG. Trained immunity-related vaccines: innate immune memory and heterologous protection against infections. *Trends in molecular medicine* 2022; 28: 497-512.

IX. DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen in dieser Form nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Holm Zerbe für die fachliche Betreuung, die wertvollen kritischen Fragen, die stetige Unterstützung und das umfassende Engagement während der gesamten Promotionszeit.

Ebenso danke ich Yury für die wissenschaftliche und statistische Begleitung. Du warst immer für mich da, wenn ich Unterstützung gebraucht habe und durch dich durfte ich meine Begeisterung für das Programmieren entdecken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Schuberth für die immunologische Expertise und die stets schnellen und konstruktive Antworten auf all meine Fragen. Ich bedanke mich auch bei allen weiteren Personen dieses sympathischen Projektteams, die mich unterstützt haben: Frau Römer als Begleiterin auf den Betrieben und gemeinsamen Vorträgen sowie als Expertin für die Milchkuhhaltung; Debby für die Betreuung und die praktische Expertise; Alex und Martina für ihren Einsatz und Fr. Wesenauer für die Zusammenarbeit mit der Rinderallianz.

Mein besonderer Dank gilt auch Katja Radon, Bernarda Espinoza und den liebevollen Kolleginnen am CIH des LMU Klinikums in München und Lateinamerika. Durch euch konnte ich neben der Dissertation wissenschaftliches Handwerk lernen und viele wertvolle Einblicke in die internationale Forschung erhalten. Gleichzeitig gab mir die gemeinsame Arbeit genügend Flexibilität, um an der Promotion zu arbeiten.

Schließlich möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken, die mich egal auf welchen beruflichen und persönlichen Wegen, immer unterstützt und ermutigt haben. Danke meinem Allerliebsten auf der Welt, dass du immer für das Beste für mich kämpfst.