

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

Subdirección de Posgrado



**IMPACTO DE LA TUBERCULOSIS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y
EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE VACAS HOLSTEIN**

Por:

DULCE SOFÍA RESÉNDIZ HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila, México

Diciembre de 2014

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

Subdirección de Posgrado



TESIS

**IMPACTO DE LA TUBERCULOSIS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y
EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE VACAS HOLSTEIN**

Por:

DULCE SOFÍA RESÉNDIZ HERNÁNDEZ

Director:

DR. . MIGUEL ÁNGEL MELLADO BOSQUE

Torreón, Coahuila, México

Diciembre de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

Subdirección de Posgrado

TESIS

DULCE SOFÍA RESÉNDIZ HERNÁNDEZ

Elaborado bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGROPECUARIA

Comité Particular de Asesoría

Asesor principal:

Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque

Asesor:

Dr. Francisco. Gerardo Véliz Deras

Asesor:

Dr. José Eduardo García Martínez

Dr. Raúl Villegas Vizcaíno

Jefe del Departamento de Postgrado U.L.

Dr. Alberto Sandoval Rangel

Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila, México.

Diciembre 2014

Dedicatoria

A MI HIJO

RICARDO ANTONIO ORTÍZ RESÉNDIZ

A MI ESPOSO

JESUS ANTONIO ORTIZ NUÑEZ

A MIS PADRES

ISIDRO RESÉNDIZ MONTOYA Y MA. REFUGIO HERNÁNDEZ

VALENCIA

A MIS HERMANOS

ELIZABETH RESÉNDIZ HERNÁNDEZ E ISRAEL RESÉNDIZ

HERNÁNDEZ

Gracias por estar siempre apoyándome y aconsejándome. Por impulsarme a superarme.

Agradecimientos

A Dios

Por brindarme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida y por darme la capacidad y el razonamiento para seguir siempre adelante.

A mí Alma Terra Mater

Por brindarme la oportunidad de cumplir uno de mis más grandes sueños y todas las facilidades otorgadas durante mis estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria.

A mi comité de asesores

Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque

Por todas sus enseñanzas de investigación, su gran confianza y apoyo que me brindo en la realización de este proyecto de investigación.

Dr. Francisco Gerardo Velíz Deras

Por su gran confianza y apoyo que me brindo para la realización de este proyecto de investigación.

Dr. José Eduardo García Martínez

Por el gran asesoría brindada en esta tesis.

A mis compañeros de Posgrado

M.C. Luz María Tejada Ugarte, M.C. Karla Gonzales, M.C. Norma Elisa Hernández Macías, Daniela Esparza Flores, etc.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me otorgo para cursar mis estudios de postgrado.

INDICE DE CONTENIDO

<i>Dedicatoria</i>	4
<i>Agradecimientos</i>	5
COMPENDIO.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.2 Objetivos	11
1.3 Hipótesis.....	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1 Generalidades de la Tuberculosis bovina	12
2.1.1 Definición	12
2.1.2 Historia.....	12
2.2. Etiología	13
2.2.1 Agente etiológico	13
2.2.2 Morfología y temperatura	14
2.3 Transmisión.....	14
2.4 Epidemiología.....	16
2.4.1 Factores de susceptibilidad.....	16
2.4.2 Patogenia	17
2.5 Síntomas.....	19
2.6 Diagnóstico de la tuberculosis bovina	20
2.6.1 Diagnóstico clínico	20
2.7 Métodos directos.....	21
2.7.1 Prueba bacteriológica	21
2.7.2 Prueba histopatológica	22
2.8.1 Prueba de tuberculina.....	23
2.8.2 Reacciones a la tuberculina	23
2.8.3 Prueba PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	25
2.8.4 Interferón gamma	25
2.9 Control y erradicación.....	27
ARTÍCULO	28
Milk yield and reproductive performance of Holstein cows testing positive for bovine tuberculosis.....	28
Literatura citada.....	47

COMPENDIO

IMPACTO DE LA TUBERCULOSIS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE VACAS HOLSTEIN

POR

DULCE SOFÍA RESÉNDIZ HERNÁNDEZ

MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Torreón, Coahuila, México, Diciembre 2014

El objetivo del presente estudio fue averiguar si las vacas Holstein de un alto potencial de producción de leche con pruebas positivas de tuberculosis se ven afectadas en su producción de leche y el desempeño reproductivo. Se utilizó un diseño prospectivo con dos grupos de animales (positivos a prueba intradérmica a tuberculina) y testigo (vacas no reactivas a tuberculosis). Se utilizaron 1,044 vacas sanas y 105 vacas positivas a la prueba de tuberculina. Las vacas positivas a tuberculosis provenían de varios establos comerciales de la zona de La Laguna en el noreste de México. Vacas que daban una reacción positiva a la prueba intradérmica de tuberculina (inyección de 0.1 ml de un derivativo de proteína purificada de bovino of *M. bovis* AN5) eran transferidas de

su establo de origen a otro establo donde permanecían aisladas, junto con otras vacas rectoras. Vacas libre de esta enfermedad eran mantenidas en el mismo establo, pero totalmente aisladas de las vacas rectoras. La eficiencia reproductivas de las vacas rectoras a tuberculosis fue afectada; la preñez por inseminación artificial fue inferior ($P < 0.05$) en las vacas rectoras en comparación con el grupo testigo (16.9 vs. 20.7). Las vacas positivas a tuberculosis requirieron 4.52 ± 2.94 servicios por preñez comparado con 4.34 ± 2.72 para las vacas del grupo testigo ($P > 0.05$). El intervalo entre el parto y la concepción fue similar entre las vacas rectoras (154 ± 78 días) y las vacas del grupo testigo (150 ± 77 días). Las vacas testigo tendieron ($P = 0.08$) a producir más leche que las vacas rectoras en lactancias de 305 días ($10,684 \pm 1,720$ vs. $10,345 \pm 1,736$; 3 ordeñas por día, media \pm DE), Los metabolitos sanguíneos indicativos de la condición nutricional de las vacas no difirieron entre grupos de vacas. Se concluyó que las vacas positivas a tuberculosis presentaron una reducción en la producción de leche de 4% y de 4.6 puntos porcentuales en la preñez por inseminación artificial, sin que se presentaran alteraciones en los indicadores sanguíneos del nivel de reservas de energía de las vacas

1. INTRODUCCIÓN

En México existe un alta prevalencia de tuberculosis bovina con tendencia a la alza, ésta es más alta en el ganado lechero (16 %) que en ganado de carne (<1 %). De acuerdo a la norma oficial NOM-030-ZOO-95, para controlar y erradicar la tuberculosis bovina se utiliza un esquema de aplicación intradérmica de la tuberculina (PPD) y el sacrificio de animales reactivos. En muchos países incluyendo a México, la Tuberculosis bovina (TBB) es considerada como una de las principales enfermedades de los bovinos, y esta representa una importante zoonosis para el hombre (OIE, 2009; Torgerson and Torgerson, 2010). Esta enfermedad bacteriana crónica es causada por *Mycobacterium bovis* (Pollock and Neill, 2002). La distribución geográfica de la tuberculosis ha cambiado considerablemente en las últimas décadas debido al incremento de la industria lechera, muchos países realizan actividades de control y de vigilancia en algunos de ellos ya se encuentran en la etapa de erradicación (Rivera y Giménez, 2010) como por ejemplo Cuba, Costa Rica, Panamá y Uruguay (Kantor *et al.*, 2008). Nuestro país cuenta con razas especializadas en la producción de leche, por ejemplo las razas Holstein y Jersey, ubicándose en las regiones templadas del centro del país y en algunas regiones norteafricanas, concretamente en las zonas de la Laguna (estados de Durango y Coahuila) y las cuencas de Tijuana, Baja California, Delicias y Ciudad Juárez en Chihuahua.

La tuberculosis bovina es importante por las pérdidas económicas que ocasiona a la industria ganadera, así como los costos de los programas de control y erradicación (Krebs *et al.*, 1997; Boland *et al.*, 2010).

La prevalencia de la tuberculosis bovina antes de 1992 era prácticamente desconocida en el país, aunque se sospechaba que era alta en ciertas zonas lecheras, ya que frecuentemente se hallaban lesiones generalizadas de tuberculosis en vacas lecheras de desechos en rastros, infiriendo su baja prevalencia en ganado de carne (SAGARPA, 2008).

En México, la TBB limita la movilización, comercialización y/o exportación del ganado, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores y el país (Morales *et al.*, 2005). En ganado lechero las pérdidas debido a esta enfermedad pueden ser calculadas con base en la disminución de peso 36%, disminución en la producción láctea 13% y pérdidas en tasa de reproducción 12% (Suazo *et al.*, 2003).

La producción de leche de bovino juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial, además de presentar el mayor potencial de expansión a fin de sustituir el importante componente de abasto del exterior. Por lo tanto, la erradicación de esta enfermedad para evitar a la población humana el riesgo de contraerla, mejorar los parámetros productivos y

reproductivos de los bovinos y, así, evitar pérdidas económicas y restricciones a la movilidad de los animales, tanto nacionales como internacionales (SAGARPA, 2008).

1.2 Objetivos

- Determinar el impacto de la tuberculosis sobre el desempeño reproductivo y productivo de leche de vaca Holstein manejadas en un sistema de producción intensiva en Torreón, Coahuila.
- Determinar el efecto de la reacción a la tuberculina sobre diversos metabolitos sanguíneos indicativos del estatus nutricional de las vacas.

1.3 Hipótesis

El ganado Holstein reactivos a tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) tienden a disminuir sus niveles en producción de leche y su eficiencia reproductiva, sin que cambien sus metabolitos sanguíneos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la Tuberculosis bovina

2.1.1 Definición

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad de curso crónico cuyo agente etiológico es *Mycobacterium bovis*, la cual se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en nódulos linfáticos y de pulmón en bovinos y otros animales domésticos, además se puede presentar en ocasiones de forma aguda (OIE, 2004). Aunque se define como una enfermedad crónica, en ocasiones la tuberculosis tiene un curso agudo y progresivo (Biet *et al.*, 2005).

Los tejidos afectados con mayor frecuencia son linfonodos de cabeza, tórax y cavidad abdominal, pulmones, hígado, pleura y peritoneo, aunque cualquier tipo de tejido es susceptible de ser infectado (Whippe *et al.*, 1996; Cassidy *et al.*, 1988).

2.1.2 Historia

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua, se presume que se originó hace 150 millones de años (Leão y Portaels, 2007). En la literatura griega antigua existen indicios de la enfermedad, llamada en esa época “Tisis” y definida por Hipócrates como la enfermedad más grande de todos los tiempos. A inicios del siglo XVII se produjo en Europa una epidemia de tuberculosis, a la cual se le conoció como “Gran plaga blanca” y fue considerada como una enfermedad letal. El físico inglés Benjamín Merton (1704-1722) conjeturó por primera vez que la

tuberculosis era provocada por “criaturas de vida diminuta”, posteriormente, en 1865, los doctores Jean-Antoine Villemin (1827-1892) y William Budd (1811-1880), concluyeron, a través de estudios epidemiológicos, que la Tb se difundía por la sociedad a través de gérmenes específicos (Leão y Portaels, 2007). En 1878, el patólogo alemán Paul Clemens Von Baumgarten (1848-1928), fue el primero en observar el bacilo en tejidos infectados, sin embargo, no fue hasta el 24 de marzo de 1882, en Berlín, ante la Sociedad de Fisiología que, Robert Koch (1843-1910), describió al agente causal de la tuberculosis, lo que marcó el primer hito en el estudio de esta enfermedad (Kaufmann, 2003).

En 1996, se publicó la Norma Oficial Mexicana que regula la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina, la cual se modificó en 1998 y es la que actualmente continua vigente (SENASICA, 2013).

2.2. Etiología

2.2.1 Agente etiológico

Existen tres tipos de bacterias causantes de esta enfermedad las cuales son del género: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y el complejo *Mycobacterium avium*.

La tuberculosis bovina es causada por *Mycobacterium bovis*, una bacteria gram positiva, es acido-alcohol resistente del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de la familia *Mycobacteriaceae* (Citado por el Center for Food Security & Public Health, 2009), Aunque también puede ser afectado por

Mycobacterium avium cuando convive con aves infectadas y por *Mycobacterium tuberculosis* cepa que puede existir en bajos porcentajes de antropozoonosis que afecta a los animales (Cano, 2010).

2.2.2 Morfología y temperatura

El bacilo es resistente a los ácidos, álcalis y a la desecación, puede sobrevivir varios meses en ambientes fríos, particularmente en condiciones de humedad, oscuridad y bajas temperaturas. En invierno perdura por 5 meses en heces y en verano por dos meses (O Reilly y Dabom, 1995), es sensible a la luz solar directa, rayos UV, temperaturas mayores a los 70°C y a desinfectantes orgánicos como el fenol y los cresoles (Vadillo *et al.*, 2002; Falkinham, 2003). Las temperaturas de pasteurización (63.5°C por 30 min. o 72°C por 15 segundos inactivan al bacilo) (Grant *et al.*, 1996; Holsinger *et al.*, 1997).

2.3 Transmisión

La transmisión de *Mycobacterium bovis*, puede ocurrir entre los animales, de animal al ser humano y viceversa, pero raramente entre los seres humanos (Acha y Szyfres, 2001) la transmisión se realiza principalmente por medio de secreciones nasofaríngeas, las cuales pueden ser pequeñas gotitas en suspensión de menos de 5 u de diámetro, las cuales entran en contacto con otro animal vía aerógena (Phillips *et al.*, 2003). Esta vía se considera la de mayor importancia en bovinos (80 al 90% de los casos) quedando en segundo término

la vía digestiva o enterógena, por pastos contaminados con heces u orina de animales infectados (10 al 20% de los casos) (Menzies and Neill, 2000; Abasolo y Retamal, 2004). El ganado llega a infectarse principalmente por la ruta respiratoria a través de aerosoles, mientras que la vía digestiva es una ruta de transmisión importante entre especies; la diseminación de la bacteria se da a través de las heces, orina, descargas genitales, leche, contaminando el alimento y agua de bebida (Phillips *et al.*, 2003).

Transmisión de bacterias tuberculosas a los seres humanos por lo general se produce por la inhalación de aerosoles que contienen gotitas de bacilos o a través del consumo de alimentos y bebidas contaminado, principalmente se leche. La práctica de la puesta común de la leche, incluyendo la de la vaca con tuberculosis de la ubre, agrava aún más la situación por la prestación de toda la producción de leche infecciosa. Se cree que la presencia simultánea de bacterias indígenas de ácido láctico (LAB) en la leche contaminada con *Mycobacterium* para conferir efecto protector cuando la leche se fermenta adecuadamente (Mariam, 2014).

En general, la bacteria infecta su huésped por vía aerógena, afectando los pulmones (Phillips *et al.*, 2003). Sin embargo, la infección progresa por la vías hematológica o linfática diseminándose a otras partes del cuerpo y dañando otros órganos (Botello *et al.*, 2013).

Solo el 5 % desarrolla lesiones en el útero y de 1 a 2 % mastitis tuberculosa, se ha comprobado que el 4 % de las vacas infectadas positivamente excretan bacilos por la leche sin que exista mastitis tuberculosa (Goodchild, 2001). En la tuberculosis renal, así como en la genital, los bacilos se eliminan por la orina, además en los machos pueden ser eliminados por esperma (Kistermann y Torres, 2000)

2.4 Epidemiología

2.4.1 Factores de susceptibilidad

Un factor de riesgo que incrementa la transmisión es el contacto entre los animales durante el ordeño favoreciendo la difusión del patógeno. Por eso, la prevalencia más alta de tuberculosis bovina se encuentra en grandes rebaños lecheros (Ramírez-Villaescusa *et al.*, 2010). Otro factor de riesgo es la presencia de animales silvestres que están infectados y con los cuales las vacas comparten el pasto y/o territorio (Vial and Donnelly, 2011).

Los factores de riesgo para la población humana son el contacto físico con animales infectados (Moda *et al.*, 1996; Thoen *et al.*, 2006), lo cual significa que personas trabajando con ganado (trabajadores del rancho, del matadero y Médicos Veterinarios) están en mayor riesgo de contraer la enfermedad (Michel *et al.*, 2010), también se descarta que perros y gatos resulten afectados, los caballos, ovejas y cabras son considerados más resistentes, y los menos atacados son los asnos y mulares (Wets, 1993).

2.4.2 Patogenia

En el ganado bovino *M. bovis* infecta a un animal sano cuando este inhala las gotas expulsadas de saliva o moco contaminado con el bacilo por parte de un animal enfermo. Una vía secundaria para adquirir la infección es cuando el animal ingiere la micobacteria en agua o alimento contaminados en los bebederos, comederos, corrales o bien cuando una vaca infectada alimenta a la cría; sin embargo, la vía aerógena es hasta el momento considerada la vía de principal (Rubin, 2009; Silva *et al.*, 2011).

La tuberculosis primaria o foco primario, comprende la lesión inicial en el órgano que actúa como puerta de entrada. Posteriormente, o en algunos casos simultáneos, los vasos drenan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales, produciéndose una adenopatía y originando una lesión similar a la del foco primario (Zuñiga *et al.*, 2012).

(A) La inhalación de la Mtb. Los primeros eventos después de la inhalación de Mtb implican la inmersión de los bacilos por los macrófagos alveolares y, a menudo su exterminio inmediato por diferentes mecanismos bactericidas de los macrófagos, incluyendo la generación de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y productos intermedios de oxígeno reactivo (ROI). La eficacia de estos mecanismos depende de la capacidad microbicida intrínseca de los macrófagos alveolares, las características patógenas de la cepa Mtb inhalado, y el microambiente inflamatoria en el sitio de la infección (Zuñiga *et al.*, 2012).

(B) El reclutamiento de células inflamatorias. Bacilos que sobreviven proliferan logarítmicamente dentro de los macrófagos alveolares y DCS e inducir la producción de mediadores inmunes tales como TNF- α , IL-6, IL-12p80, IL-1 α , IL-1 β y que activan macrófagos para inducir la muerte bacteriana temprana. IFN- γ es una citoquina proinflamatoria producida por las células T CD8 + CD4 + y así como por las células NK activadas en respuesta a IL-12 e IL-18 producida por los macrófagos alveolares y países en desarrollo. En un escenario de pulmón inflamatorio local inducido por la proliferación de Mtb, las células inflamatorias periféricas, incluyendo monocitos, neutrófilos y los países en desarrollo, son reclutados en el pulmón. DCs se activan TLRs mínimas de señalización, y los monocitos se diferencian a macrófagos efectores que producen sustancias microbidas, incluyendo TNF- α , que contribuye al control del crecimiento de Mtb, y la formación de granulomas (Zuñiga *et al*, 2012).

(C) Control de micobacterias proliferación. Esta fase se caracteriza por la inhibición de la proliferación de Mtb con una interacción célula-célula eficiente y la formación de un granuloma. Como resultado de la estimulación de citoquinas crónica, los macrófagos se diferencian en células epiteloides y células gigantes fusionadas convertirse. La arquitectura del granuloma se caracteriza por la agregación de las células T y los macrófagos infectados que contienen la Mtb para prevenir su propagación. Además de la función clave de las citoquinas

proinflamatorias (por ejemplo, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17 e IL-23) en la formación y estabilidad del granuloma, la presencia de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CXCL10 es crucial para el reclutamiento de células inflamatorias para formar granulomas. Estos mecanismos permiten el desarrollo de una infección de TB primaria localizada que eventualmente puede convertirse en un estable (también conocido como un latente) de la infección. En más del 90% de las infecciones latentes, los focos infecciosos caseosa central que contiene Mtb en vivo está delimitada por las paredes granuloma. Un ciclo activo de la activación celular y la represión impide la replicación y propagación de la Mtb (Zuñiga *et al*, 2012).

(D) La tuberculosis posprimaria. Como resultado de la persistencia de micobacterias, asociado a un fallo en el sistema inmuno-vigilancia, la enfermedad latente puede ser reactivada, induciendo el daño en zonas cercanas a los bronquios y acondicionado la difusión de la Mtb a otras áreas del pulmón (Zuñiga *et al*, 2012).

2.5 Síntomas

Mycoplasma bovis es un patógeno altamente infecciosa de los bovinos que causan neumonía, poliartritis, otitis, y con menos frecuencia, abscesos subcutáneos, abortos y meningitis (Passchyn *et al.*, 2012).

Cuando la vía digestiva está implicada, la diarrea y el estreñimiento intermitentes pueden ser observados (Gallegher y Jenkins, 1998).

Cresa (2011) indica que los síntomas son muy variados, los síntomas puede tardar meses o años en aparecer. Generalmente se presenta síntomas inespecíficos como caída de la producción de leche y deterioro general de la salud del animal y solo es posible la descripción en casos muy críticos, los siguientes puntos son las manifestaciones clínicas:

- Debilidad progresiva
- Pérdida de apetito
- Pérdida de peso
- Fiebre ondulante
- Tos seca intermitente y dolorosa
- Aceleración de la respiración (taquipneas) o dificultad de respirar (disnea)
- Sonidos anormales en la auscultación y percusión
- Diarreas fuertes

2.6 Diagnóstico de la tuberculosis bovina

2.6.1 Diagnóstico clínico

Wladimir (2011) menciona que la Organización Panamericana de la Salud en el 2003, determinaron varios métodos de diagnóstico de tuberculosis bovina, pero hasta la actualidad aun no encuentran algún método que tenga la eficiencia del 99%.

En México el diagnóstico de la tuberculosis bovina se realiza mediante las pruebas de tuberculina, cultivo e histopatología, pero estas presentan algunas limitantes de sensibilidad y especificidad (Morales *et al.*, 2005).

El diagnóstico clínico es difícil debido a la falta de signos visibles, observándose solo fiebre, pérdida progresiva de peso culminando con la muerte (Ward, 2005).

2.7 Métodos directos

El propósito de estos métodos directos se centraliza como el procedimiento de principal para identificar el agente causal de la enfermedad en el huésped (Sánchez, 1999). A continuación se mencionan los siguientes métodos:

2.7.1 Prueba bacteriológica

Se realiza post mortem y presenta la dificultad que el agente causal tiene un crecimiento lento en medios de cultivos. El aislamiento de *Mycobacterium bovis* necesita de aproximadamente de 6 a 8 semanas para su desarrollo.

Después del aislamiento se procede a la tipificación en base de las siguientes características:

- Desarrollo: crecimiento y morfología de las colonias.
- Citoquímicas: enzimáticas de niacina, reducción de nitratos, catalasa y peroxidasa.
- Bilógicas: acción en caballos conejos y pollos.

Herrera (2009) indica que después del aislamiento bacteriológico se procede al incubamiento a 37 °C por 9 semanas y posteriormente la tipificación se realiza con las resiembras de las colonias aisladas del medio donde se habían aislados, dichas resiembras se someten a temperaturas de 22, 37 y 45 °C y por último se realiza las pruebas bioquímicas como catalasa, nitrato y niacina.

2.7.2 Prueba histopatológica

En la prueba histopatológica se toma en cuenta la propiedad del bacilo tuberculoso que afecta principalmente al retículo endotelial, donde se encuentran estas lesiones y donde se utiliza la coloración de Ziehl Neelsen, que se caracteriza por teñir las bacterias de un color rojo al ser ácido alcohol resistente (Sánchez, 1999).

Los tejidos con lesiones sospechosas, principalmente nódulos linfáticos y pulmones se envían en formol al 10% a laboratorio en una proporción de 1:10, se realiza el corte de micrótopo y la tinción del tejido fijado con hematoxilina-eosina y Ziehl Neelsen, y posteriormente se analizan los tejidos con microscopio óptico (Herrera, 2009).

2.8 Métodos indirectos

Por medio de este método se provoca la reacción del huésped ante un estímulo. El animal una vez inoculado el antígeno puede tener dos respuestas una humoral y otra celular.

La respuesta humoral, esta medida por la producción de anticuerpos, mientras que la respuesta celular, estará dada por los linfocitos y macrófagos (OPS, 2011).

2.8.1 Prueba de tuberculina

El método estándar utilizado para el diagnóstico de rutina de TBB son las pruebas de tuberculina, las cuales consiste en una reacción cutánea a través de la aplicación intradérmica de un extracto proteínico purificado (PPD) (Shakespeare, 2002; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). La tuberculina ha sido la pieza clave para realizar programas exitosos de erradicación en muchos países. Información internacional indican que la tuberculina muestra de 68-96.8% de sensibilidad y 96-98.8% de especificidad (Malaghini *et al.*, 2011; Schiller *et al.*, 2011).

2.8.2 Reacciones a la tuberculina

Esta prueba consiste en sensibilizar al animal con el antígeno de tuberculina tomado en cuenta que si se aplica el antígeno a un animal que se encuentre sin presencia de la enfermedad, esta no presentara ningún proceso inflamatorio en el sitio de la inoculación. En caso contrario si el animal presenta la enfermedad provocada por el *M. bovis*, se provoca una reacción del organismo, de hipersensibilidad de tipo IV o hipersensibilidad tardía esta reacción se ve intensificada a las 24 a 72 horas post inoculación y tiene la capacidad de persistir por varias semanas más ya que provoca una vaso dilatación y esto provoca una eritema (Ecured, 2011).

Cuando el antígeno PPD se inocula de manera intradérmica en la piel de un animal sensibilizado, es decir expuesto al agente entre 2 hasta 12 semanas antes de realizar la prueba, tiempo para el cual el animal allí desarrollado su respuesta inmunitaria, se produce una respuesta inflamatoria en el lugar de la inoculación. Esta reacción inflamatoria tarda varias horas en desarrollarse y alcanzar su máxima expresión, esto dependiendo según las diferentes especies, en aves y porcinos, el punto máximo de la reacción en proceso se produce a las 48 horas, mientras que otros bovinos y rumiantes, el punto máximo de reacción es a las 72 horas (León, 2001).

La prueba de tuberculización puede ser simple si solo se aplica un solo PPD o bien si se trata de comparar la investigación se puede utilizar dos PPD, en dos puntos diferentes donde se realiza la inoculación. Esta prueba es más sensible cuando mayor sea el número de respuestas positivas entre los animales infectados. Dicha prueba es poca específica, ya que no diferencia entre *M. bovis* y *M. avium*, por lo que puede presentarse un gran número de falsos positivos (Torres, 2000).

La prueba de tuberculina tiene como ventaja que es una prueba barata, pero posee algunas desventajas. Por ejemplo, los animales que son inoculados no se les puede repetir la prueba hasta después de 60 días por reacción inmunológica inducida por la misma prueba (H. de Ward Jacobus, 2005).

2.8.3 Prueba PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Esta técnica es especialmente útil por la rápida detección de la infección en un animal sospechoso. La PCR ha sido empleada y sufrido modificaciones para incrementar y mejorar la eficiencia del diagnóstico de la tuberculosis bovina, su uso se diversifica desde los protocolos de amplificación a partir de muestra como leche (Zumárraga *et al.*, 2005).

Esta técnica tiene características adecuadas para dar un diagnóstico oportuno y eficiente de enfermedades infecciosas, ya que permite detectar el material genético del agente patógeno, inclusive antes de que el huésped haya montado una respuesta inmune y empiece a producir anticuerpos. La prueba PCR detecta cantidades muy pequeñas del patógeno directamente de los especímenes clínicos (Poblete, 2010).

2.8.4 Interferón gamma

En la actualidad se ha desarrollado una prueba comercial para medir el interferón gamma (INF- γ) (Bovine Gamma Interferon Test – BOVIGAM). La prueba consiste en incubar sangre completa de bovinos sospechosos de tuberculosis diagnosticados por PPD bovina y PPD aviar, bajo condiciones especiales (Gormley *et al.*, 2006). Si el animal ha estado en contacto con el microorganismo, sus linfocitos liberaran interferón gamma, el cual es detectado a través de un sistema de ELISA sándwich, donde los anticuerpos anti-gamma interferón unidos a una placa de 96 pozos captura el gamma interferón bovino.

La reacción se detecta por la adición de un anticuerpo específico anti-gamma interferón conjugado a una peroxidasa, la cual reacciona con un sustrato produciendo color. Estudios demuestran que esta prueba en general tiene una sensibilidad y especificidad más alta que la prueba de la tuberculina.

➤ Ventajas

- a) Se manipulan los animales de una sola vez.
- b) Se puede repetir la prueba tantas veces cuando sea necesario.
- c) La prueba es comparativa y excluye aquellos animales que pueden reaccionar por infecciones con Mycobacterias atípicas no patógenas
- d) el plasma obtenido del animal para el diagnóstico de tuberculosis bovina puede ser utilizada para el diagnóstico de otras enfermedades como Leptospirosis, Brucelosis, etc.

➤ Desventajas

- a) la prueba es relativamente cara.
- b) se necesita un laboratorio para procesar las muestras.

La prueba del IFN- γ se utiliza como prueba de diagnóstico complementario o confirmativo en países como Australia, Nueva Zelanda y los EEUU (Jacubus, 2006).

2.9 Control y erradicación

En general no se realiza ningún tratamiento a animales infectados, ya que los gastos son elevados y no se puede eliminar la enfermedad (Herrera, 2009).

La erradicación de esta enfermedad es necesaria para evitar a la población humana el riesgo de contraerla, mejorar la productividad de los bovinos y, así, evitar pérdidas económicas y restricciones a la movilización de animales, tanto nacional como internacional. Para ello, se aplican estrategias de difusión y promoción de las actividades de la campaña: capacitación del personal involucrado en estas actividades, diagnóstico de campo (en el 100% de los hatos). Aplicación de cuarentenas en hatos infectados, eliminación e indemnización de animales reactivos a las pruebas diagnósticas, inspección en rastros para confirmar y detectar nuevos casos, control de la movilización, reconocimiento y protección de regiones de baja prevalencia, certificación de hatos libres de la enfermedad, seguimiento epidemiológico, etc. (SENASICA, 2013).

Una razón importante que justifica la erradicación de la tuberculosis bovina es que la enfermedad causa pérdidas económicas, debido a la disminución aproximadamente en un 20% de la producción de leche y carne, un 5% de disminución en la capacidad reproductiva de los rebaños y la restricción en la venta y/o exportaciones de carne provenientes de animales enfermos (Manual de Ganadería Doble Propósito. 2005; Boland *et al.*, 2010).

La vacunación con *M. bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) se ha probado experimente como alternativa de control, en bovinos negativos a la tuberculina vacunados al nacimiento y desafiados con una cepa virulenta a la dosis de 1×10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) y sacrificados entre 6 y 9 meses después (Milian *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2012).

La estrategia básica para el control y eliminación de la tuberculosis bovina es la tuberculización del rebaño y el sacrificio de los reactores positivos (SENASICA, 2013).

ARTÍCULO

Milk yield and reproductive performance of Holstein cows testing positive for bovine tuberculosis

This manuscript represents a portion of a thesis submitted by M.S. Reséndiz to the Department of Veterinary Science, Autonomous Agrarian University Antonio Narro, as partial fulfillment of the requirements for a Master of Science degree.

Financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Presented in abstract form and poster at the 4th International Congress of Tropical Animal Production, Habana, Cuba, November 2013.

Objective- To find out if high milk-yielding Holstein cows testing positive for bovine tuberculosis (bTB) are affected in their reproductive performance and milk yield.

Design- A prospective two-group cohort study

Animals- 1,044 healthy cows and 105 tuberculin skin-test positive cows.

Procedure- Cows tested positive for bTB were from various large commercial dairy operations from the same region. Cows that reacted to an intradermal injection of tuberculin were transferred from their barns to an isolated new dairy facility. Cows free from this disease were placed in the same barn as the reactor cows, but in an isolated division and served as control animals.

Results- The reproductive performance of positive reactors was impaired; overall pregnancy per artificial insemination differed ($P < 0.05$) between cows testing positive for bTB and healthy cows (16.9 vs. 20.7%). Cows that were bTB reactors required 4.52 ± 2.94 services per pregnancy compared with 4.34 ± 2.72 for control cows ($P > 0.05$). The intervals between calving and conception were similar between reactors (154 ± 78 days) and control animals (150 ± 77 days). Control cows tended ($P = 0.08$) to produce more milk than positive reactors over a 305-day lactation ($10,684 \pm 1,720$ vs. $10,345 \pm 1,736$; 3 milkings per day, mean \pm SD).

Serum metabolites indicative of nutritional stress did not differ between groups of cows.

Conclusions and Clinical Relevance- Cows tested positive for bTB was associated with a 4% decrease in milk production and 4.6 percentage points in pregnancy per artificial insemination. According to serum metabolites indicative of nutritional status the reduced productivity in bTB-positive cattle does not appear to be due to metabolic stress.

Key words: pregnancy per artificial insemination, tuberculin test, fertility, serum metabolites

ABBREVIATIONS

bTB Bovine tuberculosis

SD Standard deviation

PPD Purified protein derivative

DM Dry matter

FTAI Fixed-time artificial insemination

CIDR Controlled internal drug release

NEFA Non-esterified fatty acids

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a serious chronic, debilitating and transmissible disease of cattle caused by the acid-fast bacillus *Mycobacterium bovis*.¹ Cattle are commonly the reservoir hosts, but other wildlife species may play a role in the epidemiology of this disease.^{2,3} bTB transmission seems to occur more easily when animals are concentrated in barns and other enclosed areas and it is believed that infected cows spread the bTB bacteria to their herd mates by ejecting infected droplets from their lungs (aerosolization), which can be inhaled by other animals.^{4,5}

bTB is still endemic in important dairy regions in Mexico,^{6,7} costing the country a great deal of money because of serious losses due to infection missed by testing,^{8,9} human health problems,^{10,11} hampering of trading of cattle,^{12,13} reduction of milk production,¹⁴ premature elimination of cattle and unnecessary culling of uninfected animals due to the low sensitivity and specificity of the standard diagnostic test.^{15,16,17}

In Mexico, like other countries of the world, governmental programs to control this disease are based mainly on the prompt removal of animals failing the tuberculin test (reactors), although the lack of compensation i.e., market value for each animal removed, has caused that some producers refuse to immediately eliminate their test-positive animals. Additionally, some producers are skeptic of the governmental programs because of the occasional reappearance of

seropositive animals in previously “cleaned” herds,¹⁸ and the occasional lack of lesions at slaughter in positive tuberculin-reacting cows.¹⁹ An additional factors hampering the eradication efforts have been the lack of movement restrictions of cattle from infected herds, the imperfect sensitivity and specificity of current diagnostic test and the ambiguity in determining the main transmission routes of infection.^{20,21,22} Thus, eradication has been a challenge owing, in part, to the reluctance of dairy producers to cull their seropositive animals because of the perception that productivity of reactor animals is not drastically reduced. It is widely accepted that bTB results in a reduction of milk yield; however, few studies have measured the effect of bTB on milk yield; results showed a mild milk depression.¹⁴ Even less information is available on the effect of bTB on reproductive performance. This study was designed to get a better understanding on how high milk-yielding Holstein cows that test positive for bTB, with no overt signs of this disease and managed intensively in a hot arid environment, are affected in their milk yield and reproductive performance.

Materials and Methods

Diagnostic testing- All animal care and experimental procedures were in accordance with institutional policies and ethical standards for animal health and well-being and approved by the Autonomous Agrarian University Antonio Narro Animal Care and Use Committee. Initially, the tuberculin skin test was undertaken in various large dairy operations (approximately 5,000 Holstein cows) adjacent to the dairy operation where the study took place. Bovine tuberculosis was detected

in first or greater parity cows with an intradermal injection of 0.1 ml of bovine purified protein derivative (PPD) of *M. bovis* AN5 (1 mg protein/ml) into the caudal fold. Approximately 72 hr after the injection, the application site was visually examined and palpated. Test results were considered positive when swelling (greater than 4 mm) was clearly detected. Cows testing positive for bTB were translated from their barns to a secluded new dairy facility where all reactor cows were kept together.

Study herd, housing and feeding- This study was conducted on a commercial dairy farm located in northern Mexico (latitude 26° 23' N, longitude 104° 47' W; mean annual temperature 27° C) during 2012 and 2013. In this dairy operation 3,200 cows with a rolling herd average of 10,800 kg of milk were milked. Both healthy (non-reactors) and cows tested positive for bTB and with no other diseases were kept in the same barn, but in different areas, so that no contact existed between these groups of cows during feeding or milking. These animals remained together in open-dirt pens during one complete lactation period. All cows received the same total mixed ration to meet or exceed the nutrient requirements for a lactating Holstein cow producing 45 kg of milk per day with 3.5% fat and 3.2% protein.²³

Cows were fed twice daily and milked thrice daily. Diet consisted of alfalfa hay and corn silage, ground corn, soybean meal and minerals (49% forage and 51% concentrate; DM basis). To ensure ad libitum intake of the diet, the refusal weight was at least 10% of the fresh weight at offer. Feed refusals were removed

from the troughs before the fresh feed mixture was supplied. All cows had unrestricted access to fresh drinking water. Lactating cows were allocated to 3 lactation stage groups (70 ± 11 , 145 ± 13 and $\geq 210 \pm 11$ d in milk; mean \pm SD). Cows included in the study had a body condition score ranging from 2.75 to 3.5 (scale 1 to 5).

Milking management and recording- The average lactation number for cows in this study was 2.4 ± 1.7 . Cows were milked thrice daily (0400, 1200, and 2000 hours) and milk production was recorded electronically at each milking for individual cows. Milk yield was adjusted to mature equivalent by using multiplicative factors. Cows completed their experimental tenure when they completed 305 days in milk.

Reproductive management- All cows were *vaccinated against bovine viral diarrhoea*, infectious bovine rhinotracheitis, bovine respiratory *syncytial* virus, *parainfluenza and leptospirosis (5-varieties)*. The herd veterinarian examined all fresh cows to identify and treat cows with postpartum reproductive disorders such as retained placenta, metritis, endometritis and pyometra. Cows became eligible for artificial insemination after exceeding the voluntary waiting period of 50 days in milk.

Detection of estrus was initiated at the end of the voluntary waiting period, with the aid of pedometers and removal of tail paint or tail chalk, and AI was conducted based on visual observation of estrous behavior, following the standard

a.m./p.m. rule. Commercial frozen-thawed semen from various sires from the United States was used across all months of the year. Cows not pregnant with more than 3 services were submitted for FTAI (CIDR-based protocol). Pregnancy was diagnosed by palpation per rectum of the uterus and its contents at 40 ± 5 d after AI. All pregnancy examinations were performed by the same veterinarian throughout the study period.

Experiment description- A prospective two-group cohort study was conducted. One-thousand forty four healthy (no reactors) Holstein cows between 1 and 6 lactations were used in this study. This group was compared with 105 Holstein cows detected as bTB reactors. All workers and veterinarians in contact with positive *bTB reactor* cows were appropriately protected with rubber gloves, waterproof boots, face masks, and appropriate clothing to protect skin breaks from infection. All instruments, utensils, chutes, machinery, floors, and areas of potential infectivity were sanitized as frequently as possible with approved disinfectant products.

Blood collection and analyses- Blood samples were collected at the middle of lactation from the coccygeal vein in plain vacuum tubes after the first milking in the morning before feeding. The blood samples were kept in ice boxes and taken to the laboratory within 1 h. The samples were then centrifuged ($1,000 \times g$ for 10 min) to obtain serum, which was immediately frozen in Eppendorf tubes at -20°C until metabolites measurements.

Serum metabolites were determined using spectrophotometric methods.^a Serum total protein concentration was determined with a kit based on the bicinchoninic acid reagent, with bovine serum albumin as a protein standard.^b Urea was quantified using a kit based on urease^c and glucose concentration was assayed with kit based on glucose oxidase.^d Serum NEFA concentrations were determined using a kit specific for this metabolite.^e Serum creatinine was measured using kit for this metabolite.^f Serum cholesterol was determined using a cholesterol assay kit.^g

Statistical analyses- 305-d milk production, peak milk yield, and days to peak were analyzed using a mixed linear model^h with group and parity as a fixed effects and month and year of calving as covariates. The interaction group x parity was included in the model. Differences in serum metabolites between reactors and non-reactors cows were tested by a two-tailed student's t-test.^h The metabolite concentrations were log transformed for normalization. The unit of the study was the cow over one lactation period. The proportion of pregnant cows per artificial insemination was evaluated by applying a general linear model for binary data.^h After limiting the number of services per pregnancy to cows with a confirmed pregnancy diagnosis, the effect of group on the number of services per pregnancy was evaluated by the bivariate Wilcoxon rank sum test without adjustment for confounders.^h Calving-to-pregnancy intervals were analyzed by survival analysis methodology.^h

Results

Milk production- Tuberculosis test-positive status tended to effect 305-d milk yield ($P < 0.08$), with 4% less milk in the reactor cows compare with the non-reactor herdmates cows (Table 1). A significant group x parity interaction indicated that 305-5 milk yield was significantly higher in healthy multiparous cows than in those cows testing positive for bTB; there was no difference between groups for primiparous cows. Season of calving was a significant confounding covariate. Control cows presented slightly lower but significant ($P < 0.05$) peak milk yields than cows tested positive for bTB. Number of days to peak milk yield did not differ between groups of cows.

Reproductive performance and serum metabolites - Of the 1149 cows used in the present study, 1094 (95%) were inseminated at least once, but very few cows conceived by the end of the study. Pregnancy per artificial insemination was higher ($P < 0.05$) in control cows compared with cows testing positive for bTB (Table 2). Both calving-to-pregnancy interval and services per pregnancy did not differ between groups of cows.

Serum concentrations of various metabolites in control and cows testing positive for bTB are shown in Table 3. There were no significant effects of skin-test-positive animals on all serum metabolite concentrations.

Discussion

Milk yield- The results of this study are remarkably similar to the estimate of other studies reporting that tuberculosis was associated with a 4% decrease in milk production in cows positive to the caudal fold tuberculin test.^{14,24} This is the first study to address the impact of positive bTB test on 305-d milk yield using a large population of cows followed prospectively throughout an entire lactation. In addition, the use of computerized on-farm record systems allowed a precise estimation of milk yield during an entire lactation, which potentially increased our ability to detect differences between tested positive and negative cows for bTB. However, for obvious reasons there was not possible to maintain the cows for a second lactation, and therefore no follow-up was made and this might be important to fully establish the relationship between the impacts of bTB on milk yield, because it is likely that the effect of this disease might be cumulative (becoming more noticeable over multiple lactations).

The results of the present study are not in line with the view that the total amount of milk produced during lactation is primarily determined by peak yield.²⁵ It is possible that the greater milk yield observed in the control cows compared with cows testing positive for bTB was due to a greater persistency of lactation, rather than a higher peak milk yield, because although peak yield accounts for most of the variance in total lactation yield, persistency of lactation also accounts for an important proportion of the variance.²⁶ The slightly higher peak yield in cows testing positive for bTB suggests that milk losses in positive reactor cows occurred after the peak yield.

The magnitude of milk losses in bTB reactor cows depends on the stage of the disease. In the present study all cows testing positive for bTB did not show overt clinical signs, which would explain the marginal milk losses observed in the skin-test-bTB positive animals, as these cows did not present the advanced stages of the disease (e.g. chronic cough, dyspnea, low grade fever and weakness). The mechanisms by which the cows testing positive for bTB presented a lower milk yield could be the higher cost of allocating resources to immunity;²⁷ bTB infection status is not associated with udder health.²⁸

Reproductive performance- A remarkable strength of this study was the use of a great number of cows testing positive for bTB, which made it possible to potentially infer a cause-and-effect relationship between cows positive to the tuberculin test and reproductive performance. The low values for this variable are similar to those reported for dairy cows in this zone²⁹ and are due to a severe heat stress experienced by cows for the most part of the year, associated with great metabolic heat production due to the high milk yield³⁰ derived from three milkings per day.

No other study exists measuring the impact of bovine tuberculosis on pregnancy rate. It is fairly well accepted that bTB results in reduced reproductive performance, although there are no studies to support this hypothesis. Results of the present study prove that fertility is reduced in bTB reactor cows, although the mechanisms by which the cows testing positive for bTB presented a lower pregnancy per artificial insemination are not currently understood. Serum metabolites indicative of nutritional stress do not support a scenario of impaired

immunological and gastrointestinal absorptive capacity or an accentuated negative energy balance in positive bTB reactors. Perhaps damage to the uterus and oviducts by *M. bovis* could be involved in this reduction of fertility, as it been observed previously.³¹ Additionally, bTB results in a series of pathological responses, including immune response, inflammation, and damage to the target organ.³² Further, greater energy is required to mount an immune response, using nutrients that could otherwise be allocated to reproductive effort.³³

Serum metabolites- The levels of blood metabolites found in the present study are typical of those previously reported for Holstein cows after the peak yield.^{34,35} Serum glucose concentrations were indicative of well-fed animals with closely controlled nutrition.³⁶

Serum urea, creatinine, cholesterol and NEFA levels did not show any disturbance in nitrogen metabolism or body energy reserves mobilization, which indicates an adequate physiological balance. This data show that bTB reactor cows were not affected in their liver and kidney function, mobilization of body fats and proteins, and therefore showed good adaptation to the energy demands in the middle of lactation. Also this data are consistent with the hypothesis that positive bTB reactors were heat stressed to the same level as

healthy cows. Thus, this data suggests that the slight depression in milk yield and lower pregnancy per artificial insemination in skin-test-positive animals were not related to insufficiency of nutrients.

^aEspectronic 2000, Bausch & Lomb, Bridgewater, NJ, USA

^bPierce Chemical, Rockford, IL, USA

^cSigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

^dSigma Diagnostics, St Louis, MO, USA

^eWako Diagnostics, Richmond, VA

^fDICT-500; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA

^gECCH-100; BioAssay Systems; Hayward, CA, USA

^hSAS, release 9.1, SAS Institute Inc, Cary, NC.

The key findings of this study are that a positive tuberculosis test in high milk-yielding Holstein cows was associated with 4% reduction in 305-d milk yield and 4.6 percentage points in pregnancy per artificial insemination with no signs of metabolic stress, according to serum metabolites indicative of adequate nutrition.

6. References

1. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle *Vet J* 2002;163:115–127.
2. Brook RK, Vander Wal E, van Beest FM, et al. Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: Implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up. *Prev Vet Med* 2013;108:137-147.

3. Miller RS, Sweeney SJ. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. *Epidemiol Infect* 2013;141:1357–1370.
4. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000;160:92–106.
5. Skuce RA, Allen AR, McDowell SW. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. *Vet Med Int* 2012;Article ID 621210, 10 p.
6. Milián-Suazo F, Solman MD Ramirez C, et al. Identification of tuberculosis in Cattle in Mexico. *Am J Vet Res* 2001;61: 86-89.
7. Estrada-Chávez C, Otero FD, Díaz CA, et al. Agreement between PCR and conventional methods for diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Méx* 2004;35:225- 236.
8. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, et al. Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transb Emerg Dis* 2010;57:205-220.
9. Conlan AJK, McKinley TJ, Karolemeas K, et al. Estimating hidden burden of bovine tuberculosis in Great Britain. *PLoS Comp Biol* 2012;8:e1002730.
10. Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, et al. Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico. *Salud Púb Mex* 2008;504:286-291.
11. Müller B, Dürr S, Alonso S, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013;19:899–908.

12. de Kantor IN, Ritacco V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries *Vet Microbiol* 2006;112:111-118.
13. Humblet MF, Boschioli ML, Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res* 2009;40:50-73.
14. Hernandez J, Baca D. Effect of tuberculosis on milk production in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1998;15:851-854.
15. Whipple DL, Palmer MV, Slaughter RE, et al. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:117–122.
16. Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, et al. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:611–619.
17. Waters WR, Thacker TC, Nonnecke BJ, et al. Evaluation of gamma interferon (IFN-gamma)-induced protein 10 responses for detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*: comparisons to IFN-gamma responses. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:346–351.
18. Estrada-Chávez C, Mancilla R, Arriaga C, et al. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México (Determination of antibodies anti PPD in dairy herds with different seroprevalence of bovine tuberculosis in Mexico). *Vet Méx* 2001;32:207-211.

19. Milián-Suazo F, Harris B, Arriaga-Díaz C, et al. Sensitivity and specificity of nested PCR and spoligotyping as quick diagnostic tests for bovine tuberculosis in fresh tissue. *Rev Mex Cienc Pec* 2010;1:403-415.
20. Waddington K. To stamp out “so terrible a malady”: bovine tuberculosis and tuberculin testing in Britain, 1890–1939. *Med Hist* 2004;48:29–48.
21. Gopal R, Goodchild A, Hewinson G, et al. Introduction of bovine tuberculosis to north-east England by bought-in cattle. *Vet Rec* 2006;159:265–271.
22. Brooks-Pollock E, Roberts GO, Keeling MJ. A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature* 2014;511:228–231.
23. NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle 7th rev ed Natl Acad Press, Washington, DC. 2001.
24. Boland F, Kelly GE, Good M. et al. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Prev Vet Med* 2010;93:153-161.
25. Macdonald KA Penno JW, Lancaster JAS, et al. Effect of stocking rate on pasture production, milk production, and reproduction of dairy cows in pasture-based systems. *J Dairy Sci* 2008;91:2151–2163.
26. Martin LB, Weil ZM, Nelson R J. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Phil Trans R Soc B* 2008;363:321-339.

27. Boland F, Kelly GE, Good M. Bovine tuberculosis and udder health in Irish dairy herds. *Vet J* 2012; 192:71-74.
28. Mellado M, Sepulveda E, Meza-Herrera C, et al. Effects of heat stress on reproductive efficiency in high milk-yielding Holstein cows in a hot arid environment. *Rev Colomb Cienc Pec* 2013;26:193–200.
29. Law RA, Young FJ, Patterson DC, et al. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. *J Dairy Sci* 2009;92:1001–1012.
30. Hatipoglu F, Ortatagli M, Kiran MM, et al. An abattoir study of genital pathology in cows: II Uterus, cervix and vagina. *Revue Méd Vét* 2002;153:93-100.
31. Romanyukha AA, Rudnev SG, Sidorov IA. Energy cost of infection burden: an approach to understanding the dynamics of host pathogen interactions. *J Theor Biol* 2006;241:1–13.
32. Viney ME, Riley EM, Buchanan KL. Optimal immune responses;
33. immunocompetence revisited. *Trends Ecol Evol* 2005;20:665–669.
34. Cole JB., Null DJ. Genetic evaluation of lactation persistency for five breeds of dairy cattle *J Dairy Sci* 2009;92:2248-2258.
35. Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2010;93:644-655.
36. Castillo C, Hernandez J, Bravo A, et al. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J* 2005;69:286–292.

Table 1- Effects of a positive tuberculin skin test on milk yield by parity for high milk-yielding Holstein cows in a hot environment that calved in 2012 and 2013 and were followed for one lactation. Values are means \pm standard deviation.

Variable	Control		Tuberculosis	
	Primiparous	Pluriparous	Primiparous	Pluriparous
Number of cows	501	543	62	43
305-d milk yield, kg ^{A,B,C}	8982 \pm 1199	10882 \pm 1650	9057 \pm 1302	10285 \pm 1501
Peak milk yield, kg ^{A,B}	42.8 \pm 6.6	54.3 \pm 8.4	43.5 \pm 5.9	51.7 \pm 7.0
Days to peak milk yield ^{B,C}	79.2 \pm 31.6	69.2 \pm 27.4	71.5 \pm 27.1	65.5 \pm 25.8

^AGroup effect ($P = 0.08$); ^Bparity effect ($P < 0.001$); ^Cgroup x parity interaction ($P < 0.05$).

Table 2- Effects of a positive tuberculin skin test on reproductive performance for high milk-yielding Holstein cows in a hot environment that calved in 2012 and 2013 and were followed for one lactation. Values are means \pm standard deviation.

Variable	Control	Tuberculosis
Pregnancy per artificial insemination (%)	20.7 (1019/4922) ^a	16.1 (88/547) ^b
Calving-to-pregnancy interval (days)	150 \pm 77 ^a	154 \pm 78 ^a
Services per pregnancy (pregnant cows)	4.34 \pm 2.72 ^a	4.52 \pm 2.94 ^a

^{a,b}Means with different superscript differ ($P < 0.05$).

Table 3- Effects of a positive tuberculin skin test on some serum metabolites for high milk-yielding Holstein cows at the middle of lactation, in a hot environment that calved in 2012 and 2013. Values are means \pm standard deviation.

Serum metabolites	Control	Tuberculosis
Glucose, mg/dl	72.1 \pm 3.0	72.0 \pm 2.1
Urea, mg/dl	20.6 \pm 3.2	18.0 \pm 3.5
Creatinine, mg/dl	1.7 \pm 0.4	1.9 \pm 0.3
Cholesterol, mg/dl	170.7 \pm 51.7	168.8 \pm 55.0
Total proteins, mg/dl	5.7 \pm 1.3	6.0 \pm 1.3
Non-esterified fatty acids, mEq/L	0.29 \pm 0.06	0.27 \pm 0.06

For all metabolites no differences between groups were detected ($P > 0.05$).

Literatura citada

- Abalos, P., Retamal, P. 2004. Tuberculosis: A re-emerging zoonosis? Rev. Sci. Tech. 23, 583-594.
- Acha, P.N. y Szyfres, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I. Bacteriosis y micosis (3^a Edición). Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). Washington.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium intracellulare* complex MAC. Vet. Res. 363, 411-436.

- Boland, F., Kelly, G.E., Good, M., More, S.J. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*. 93, 153–161.
- BOTELLO, A. R., BOTELLO, A. L., PÉREZ, K. C. y DOMÍNGUEZ, M. C. (2013) Elimination of bovine tuberculosis and its effect on milk and meat production. *Revista Granma Ciencia*. Vol, 17.
- Cassidy, J.P., Bridson, D.G., Pollock J.M., Evans, R.T., foster, F., Neill, S.D. 1988. Early Lesion formation experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Com. Path.* 119:27-44
- Cano, C. 2010. Tuberculosis bovina, Universidad Autónoma de México Departamento de rumiantes, www.fmvz.unam.mx/fmvz.
- Center for Food Security & Public Health. 2009.
- De la Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81, 90-210.
- De Kantor, I. N., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Da Silva, T. M. A., Osorio, R. M, Garzon, T. M. C., Llerena P. C., Ribon, W., Garcia, V. Kuffo, D., Asencios, L., Vazquez, C. L., Rivas, C., de Waard, J. H. 2008. Human

- Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. Tuberculosis. 88(4):358-365.
- Ecured, tuberculosis bovina, 2011. <http://www.ecured.cu/index.php>.
- Falkinham, J.O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. Emerg. Infect. Dis. 9(7): 763-767.
- H. de Ward Jacobus. 2005. Tuberculosis Bovina, Manual de Ganadería de doble Propósito, Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela. *Jacobusde wardard@telcel.net.ve*
- Herrera, B.M.T. et al. 2005. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 18 (4), 327-336.
- Herrera, 2009. Tuberculosis bovina, <http://espadajin.blogspot.com>.
- Holsinger, V.H., Rajkowski, K.T, Stabel JR. 1997. Milk pasteurization and safety: a brief history and update. Rev Sci Tech. 16(2), 441–51.
- Gallagher, J., Jenkins, P. A. 1998. Mycobacterial diseases. In: Palmer, S. R., Soulsby , L., Simpson, D. I. H., editors. Zoonoses. New York: Oxford University Press; 1988. P. 155-64
- Goodchild, A.V. et al. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis; 81(1/2), 231-41.

- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons T., McGill K., Collins J.D. 2006 Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary Microbiology* 112, 171-179.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M., 1996. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. The Society for Applied Bacteriology, Letters in Applied Microbiology. 22, 253-256.
- Kaufmann, S.H. 2003. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis. (Edinb.)* 83, 86-90.
- Krebs, J.R. 1997. Bovine tuberculosis in cattle and badgers. London, UK: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Publications.
- Leão, S.C., Portaels, F. 2007. History. En: J.C. Palomino, S.C. Leão y V. Ritacco (eds.), *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care*. pp. 25-51. Brazil.
- León, 2001. Diagnóstico de tuberculosis bovinas mediante prueba intradérmica única en hatos lecheros de la provincia de Carchi, Tesis de licenciatura.
- RIVERA, P. y GIMÉNEZ, J. (2010) La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *red vet*, 11.
- RUBIN, E. J. (2009) The granuloma in tuberculosis--friend or foe? *N Engl J Med*, 360, 2471-3.

MALAGHINI, M., V. THOMAZ-SOCCOL, C. M. PROBST, M. A. KRIEGER, H. PRETI, A. KRITSKI, AND C. R. SOCCOL. 2011. Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. *J. Biotechnol.* 156:56-58

Manitoba Agricultural Services Corporation, 2009

MARIAM, S. H. (2014) Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within Laboratory-Fermented bovine milk. *BMC Res Notes*, 7, 175.

Menzies, F.D., Neill, S.D. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Veterinary Journal* 160, 92-106

Michel, AL, Muller, B, van Helden. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology* 140, 371-381.

Milián, S.F., Harris, B., Arriaga, D., Thomsen, B., Stuber, T., González, S., Álvarez, O., Santillán, F., Morales, L., Estrada, C. 2010. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 1(4), 403-415.

Moda, G., Daborn, C.J., Grange, J.M., Cosivi, O. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease* 77, 103–108.

- MORALES, A., MARTÍNEZ, I., CARLOS, A., ÁLVAREZ, G., ÁLVAREZ, M. y MALDONADO, J. (2005) Comparación de Histología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. *revista científica* XV N° 2, 103-108.
- OIE. (World Organisation for Animal Health). 2009. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal (mammals, birds and bees) Chapter 2.4.7:683
- OIE. (World Organisation for Animal Health). 2004. Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. <http://www.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* 76 (Suppl 1):1–46.
- Organización panamericana de la Salud (OPS). 2011. La tuberculosis en la región de las américas. Informe regional 2011. Epidemiología, control y financiamiento.
- Poblete Y Urbina 2010. Ciencia y salud.
- Phillips, C.J., Foster, C.R., Morris, P.A., Teverson, R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science* 74, 1–15.
- PASSCHYN, P., PIEPERS, S., DE MEULEMEESTER, L., BOYEN, F., HAESEBROUCK, F. y DE VLIEGHER, S. (2012) Between-herd prevalence

of *Mycoplasma bovis* in bulk milk in Flanders, Belgium. *Res Vet Sci*, 92, 219-20.

Pollock, J.M., Neill, S.D. (2002) *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* 163, 115–127.

Ramírez-Villaescusa, A.M., Medley, G.F., Mason, S., Green, L.E. 2010. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. *Preventive Veterinary Medicine* 95, 224–230.

RIVERA, P. y GIMÉNEZ, J. (2010) La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *red vet*,

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación)- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Plan Nacional Estratégico de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina en México 2008-2012).

Sánchez L. 1999. Diagnóstico de tuberculosis bovina.

Schiller, I., RayWaters, W., Vordermeier, H. M., Jemmi, T., Welsh, M. D., Keck, N., Whelan, A., Gormley, E., Boschioli, M. L., Moyon, J. L., Vela, C, Cagiola, M., Buddle, B. M., Palmer, M. V., Thacker, T. C., and Oesch, B. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Vet Microbiol.* 151, 153-159. 2011.

SENASICA 2013 (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Plan Nacional Estratégico de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina en México 2008-2012).

Silva, M.T. 2010. when two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J, Leukocyte Biol.* (87):98-107.

Suazo FM, Escalera AM, Torres RM. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. *Prev Vet Med.* 58(1-2):1-13. Review. 2003.

Shakespeare m. 2002. Zoonoses. First edition. Pharmaceutical press, great.

Thoen, C., Lobue, P., de Kantor, I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology* 112, 339–345.

Torres, pedro. 2000. Vigilancia epidemiológica: importancia de la detección de tuberculosis en faena de la tuberculosis bovina. www.senasa.gov.ar
Proaño,

Torgerson, P.R., Torgerson, D.J. 2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about?" *Trends in Microbiology* 18, 67–72.

Vadillo, S., Píriz, S. y Mateos, E.. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw – Hill. Interamericana de España. Madrid, España.

Vial, F.C., Donnelly, A. 2011. Localized reactive badger culling increases risk of bovine tuberculosis in nearby cattle herds. *Biology Letters* 8, 50–53.

- Waters, R., Palmer, M.V., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30, 2611-2622.
- Wards, B. J., Collins, D. M. and de lisle, G. W. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 43:227-240
- West, Geoffrey, 1993. Diccionario enciclopédico de veterinaria, yatro ediciones Barcelona, p. 849-853.
- Whipple, D.L., Bolin, C.A., Miller, J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest.* 8, 351-354.
- Zumarraga, M. J., Meikle, V., Bernadelli, A, Abdala, A, Tarabla, H, Romano, M. I., and Cataldi, A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diag. Invest.* 17(232), 238.