

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA DE VACUNACIÓN Y BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN UN ESTABLO LECHERO

**TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA:
JESSICA SOLIS LECHUGA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. TOMÁS BENJAMÍN RENTERIA EVANGELISTA**

**ASESORES
DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO
DRA. SAWAKO HORI
DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ HURTADO**

MEXICALI, B.C., MÉXICO

ABRIL 2012

Implementación de un Programa de Vacunación y Buenas Prácticas de Manejo Para el Control de la Tuberculosis Bovina en un Establo Lechero. Tesis presentada por MVZ. Jessica Solís Lechuga como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el Comité Particular Indicado:

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista
Director

Dr. Gilberto López Valencia
Co-Director

Dr. Gerardo Medina Basulto
Asesor

Dra. Sawako Hori
Asesora

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado
Asesora

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo respeto, admiración y agradecimiento al Dr. Tomás Rentería y al Dr. Gilberto López, que con sus experiencias, visión y formación sentaron las bases de un ambicioso programa convertido hoy en día en una realidad que es el motivo por el cuál se presenta ésta tesis.

Al cuerpo académico de Salud Animal, especialmente a quienes contribuyeron a mi formación académica y de los cuales recibí vital apoyo para la conclusión de este proyecto, Dr. Gerardo Medina, MC. Carloman Herrera y Dra. Sawako Hori.

A mis compañeros de maestría, Alejandra, Luis, Carlos Pi y Alan que con su amistad y ayuda contribuyeron también a la realización de éste proyecto.

A Isabel, por nuestra gran amistad y apoyo incondicional en estos dos años.

A María Carrazco por su amistad y ayuda desinteresada, sin la cual me hubiera sido muy difícil la terminación de ésta tesis.

A la Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, por la oportunidad de realizar una maestría.

Al Lic. José Luis Nevárez y MVZ. José de Jesús López por la disposición y confianza al permitir la implementación del programa dentro del Establo y disponer de información concerniente al mismo.

DEDICATORIA

A quien hizo posible la realización de esta maestría y proyecto y sin cuya voluntad nada es posible y sin Él nada soy : Dios.

A mis padres Josué Solis y Marilú Lechuga, que con su amor, apoyo y ejemplo contribuyen a mi formación humana y profesional.

A mis hermanos Josué, Mayra y Lydia y a mis sobrinos Jesús A., María I., Galy y Paula, por estar siempre conmigo.

A mis tíos y primos, en especial a mi tía Mayo quien siempre está cerca de mí a pesar de la distancia.

A mis abuelos maternos, Virgilio Lechuga y Alicia Hernández que ya no están con nosotros y los extraño.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Etiología.....	4
Patogénesis.....	5
Epidemiología.....	6
<i>Difusión de la tuberculosis en animales domésticos.....</i>	8
<i>Tuberculosis en animales domésticos.....</i>	9
Diagnóstico.....	10
<i>Histopatología.....</i>	12
Exámen microscópico.....	12
<i>Cultivo bacteriológico.....</i>	13
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....</i>	15
<i>Prueba de la tuberculina.....</i>	16
<i>Prueba de IFN-γ.....</i>	17
Control de la tuberculosis bovina.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Lugar de estudio.....	22

Diseño del estudio.....	22
Programa de buenas prácticas de manejo.....	23
<i>Manejo de la hembra.....</i>	23
<i>Antes del parto.....</i>	23
<i>Después del parto.....</i>	23
<i>Manejo del recién nacido.....</i>	24
<i>Manejo de calostro.....</i>	24
<i>Manejo de leche de vaca.....</i>	25
<i>Manejo de leche en polvo.....</i>	26
<i>Proceso de pasteurización.....</i>	26
<i>Manejo de becerros en el área de becerreras.....</i>	26
<i>Manejo de becerros en el área de destetes.....</i>	27
<i>Manejo de becerros machos y hembras al término del destete.....</i>	27
<i>Manejo de hembras en el área de vaquillas.....</i>	28
<i>Limpieza y desinfección del hato.....</i>	28
<i>Remoción de estiércol.....</i>	28
<i>Desinfección.....</i>	28
<i>Manejo de fauna silvestre.....</i>	29
<i>Control de palomas.....</i>	29
Programa de vacunación.....	30
<i>Producción de la vacuna Mycobacterium bovis BCG.....</i>	30

<i>Vacunación</i>	31
<i>Evaluación de la vacuna a nivel de campo</i>	31
<i>Prueba de tuberculina</i>	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	42
LITERATURA CITADA	43

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Prevalencia de tuberculosis bovina utilizando PPD bovino antes y después del programa de vacunación y buenas prácticas de manejo.....	36

LISTA DE FIGURAS

Gráficas		Pág.
1	Recta de regresión de tasa de mortalidad en becerros (Mortalidad= $1264.2 - 0.6200 \cdot \text{Año}$ 95% IC y predicción).....	38
2	Recta de regresión mortalidad por problemas respiratorios (Respiratorio= $-637.58 + 0.3200 \cdot \text{Año}$ 95% IC y predicción)...	39
3	Recta de regresión mortalidad por problemas de diarrea (Diarrea= $1911.0 - 0.9500 \cdot \text{Año}$ 95% IC y predicción).....	41

RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto en el control de la tuberculosis bovina al implementar un programa de vacunación y buenas prácticas de manejo en un establo lechero. Se consideró un análisis retrospectivo de la prevalencia de tuberculosis antes del programa y un estudio epidemiológico longitudinal prospectivo sobre la prevalencia a través de las generaciones. La duración fue de 3 años. Los animales fueron sometidos a un programa de vacunación y buenas prácticas de manejo. Los recién nacidos recibieron calostro y leche de vaca pasteurizada. En esta etapa se les aplicó por una sola vez la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG. Al inicio y al final del estudio se realizó la prueba de la tuberculina a los animales dentro del hato. Se llevó un registro de las prevalencias generadas al inicio y al final del estudio. La variable a evaluar fue la prevalencia de Tuberculosis bovina dentro del hato por medio de la prueba de la tuberculina. Así mismo, se llevó un registro de tasas de mortalidad en el área de becerros a través de los años. La proporción de animales enfermos de tuberculosis en el año 2007 en comparación con los animales enfermos en el 2010 es estadísticamente significativa ($P=0.00$). Las tasas de mortalidad a través de los años no mostraron correlación estadísticamente significativa. Si bien, no hay diferencia estadística entre las tasas de mortalidad al implementar el programa, la tasa de tuberculosis bovina sí presenta diferencia estadística, con lo cual podemos inferir que el programa ofrece ventajas prometedoras en la reducción de la tuberculosis bovina a mediano plazo.

Palabras clave: Tuberculosis bovina; Prevalencia; Control.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect on the control of the bovine tuberculosis when implementing a program of vaccination and good management practices in a dairy farm. It was considered a retrospective analysis of the prevalence of tuberculosis before the program and a prospective longitudinal epidemiological study on prevalence through the generations. The duration was of 3 years. The animals were subjected to a program of vaccination and good management practices. The newborn calves received colostrum and pasteurized cow's milk. At this stage was applied once only *Mycobacterium bovis* BCG vaccine. At the beginning and end of the study was performed tuberculin test to the animals within the herd. A record was kept of the prevalence generated at the beginning and end of the study. The variable being evaluated was the prevalence of bovine tuberculosis in the herd by the tuberculin test. Also, a registry was carried of mortality rates in the area of calves through the years. The proportion of animals suffering from tuberculosis in 2007 compared with diseased animals in 2010 is statistically significant ($P=0.00$). Mortality rates over the years showed no statistically significant correlation. Although, no statistical difference between the mortality rates by implementing the program, the rate of bovine tuberculosis is present statistical difference, which we can infer that the program offers promising benefits in reducing bovine Tuberculosis at medium term.

Keywords: Bovine tuberculosis; Prevalence; Control.

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis bovina es una de las enfermedades de mayor impacto en la industria ganadera, ocasiona pérdidas económicas por decomisos en rastros y reducción en la producción de leche hasta en un 17% (NOM-EM-017-ZOO-2005), pérdida de peso en el ganado lechero de un 36% y disminuye la tasa de concepción en un 12% (Suazo et al., 2003).

Cerca de 50 millones de animales se encuentran infectados, ocasionando pérdidas de 3 mil millones de dólares al año aproximadamente (Steele, 1995). *M.bovis* es el agente causal de la Tuberculosis bovina, considerada una zoonosis al afectar a la población humana a través del contacto con animales enfermos, consumo de leche y sus derivados sin pasteurizar (Raviglione, et al.,1995). Anualmente se detectan en el mundo 9 millones de casos nuevos de tuberculosis humana y 2 millones mueren por esta causa (CDC, 2007).

En México la NOM-EM-017-ZOO-2005 propone controlar la enfermedad, a través de detección y sacrificio. Sin embargo, al no existir un programa de indemnización por pérdidas económicas debido al sacrificio de los animales enfermos, no ha sido posible erradicar la enfermedad. En países industrializados, programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina, junto con pasteurización de la leche, han disminuido drásticamente la incidencia de la enfermedad en el ganado y en el humano. En países en desarrollo, sin embargo, la tuberculosis bovina está ampliamente distribuida,

aunado a que no se aplican medidas de control o a que solo se aplican esporádicamente (Cosivi et al.,1998).

Rentería y Hernández (1996) demostraron que el manejo del calostro, la leche y el estatus de la madre ante la prueba de la tuberculina, se asociaron con el riesgo a la exposición de *Mycobacterium* en becerros. Es decir, el riesgo de ser reactivos a la prueba de la tuberculina se incrementó de 11% en becerros nacidos de vacas no-reactoras al 33% en becerros nacidos de vacas reactivas.

A nivel experimental se ha reportado que una sola inoculación subcutánea de BCG, induce protección contra el desarrollo de lesiones tuberculosas en animales infectados con una cepa virulenta de *M. bovis*. Al parecer la vacunación disminuye el contagio entre animales infectados, reduciendo el tamaño de las lesiones y la carga bacteriana (Suazo et al. 2003).

López et al. (2009) llevaron a cabo un estudio epidemiológico de campo para evaluar la vacuna de *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guerin (Mb-BCG). 140 becerros negativos a tuberculosis se dividieron en dos grupos, no vacunados y vacunados, recibieron calostro pasteurizado, leche pasteurizada y alimento concentrado. Compartieron el mismo corral y estuvieron en contacto con vacas tuberculosas. Las frecuencias de tuberculosis entre los grupos (22.7% Vs 9.2%) fue diferente ($p=0.03$). Además, los becerros no vacunados tienen 2.4 (IC95%:1.07–5.68) veces más probabilidad de infectarse que los vacunados.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es implementar un programa de vacunación con BCG y buenas prácticas de manejo en un establo lechero y evaluar su efecto en el control de la Tuberculosis bovina a través de los años.

REVISIÓN DE LITERATURA

Etiología

El organismo causante de la Tuberculosis bovina es *Mycobacterium bovis*, miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (O'Reilly y Daborn, 1995). *Mycobacterium tuberculosis* se compone de varias especies relacionadas, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* y recientemente *M. mungi* (Alexander et al., 2010).

Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, se caracterizan por tener una estrecha relación filogenética, pero difieren ampliamente en cuanto a sus tropismos, fenotipos y patogenicidad (Sreevatsan et al., 1997). Algunos miembros son exclusivos de humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*) o patógenos de roedores (*M. microti*), mientras que otros tienen un amplio espectro de huéspedes (*M. bovis*, *M. caprae*) (Brosch et al., 2002).

M. bovis tiene notablemente una amplia gama de huéspedes, siendo responsable de la enfermedad en animales silvestres, animales cautivos incluidos ciervos domésticos, ganado (bovinos, caprinos, búfalos asiáticos, camellos, alpacas y llamas) primates y humanos (O'Reilly y Daborn, 1995).

M. bovis es de lento crecimiento y requiere un mínimo de 14 días para que las colonias sean visibles en el medio de cultivo. En medio de cultivo con base de huevo, la colonia típica es pequeña, redondeada, de color amarillo pálido a beige con bordes irregulares y superficie granular. En medio agar es de color blanco, delgada, dura y plana con un montículo central. Las

micobacterias se describen como “ácido-alcohol resistentes” porque cuando se tiñen con carbol-fucsina resisten la decoloración con ácido-alcohol. Cuando se tiñen, *M. bovis* aparecen como cocobacilos de color rojo de 0.3-0.6 μm por 1-4 μm (Corner, 1994).

En medio de cultivo con base de huevo en lugar de glicerol, se agrega piruvato de sodio, porque el glicerol es inhibitorio de la mayoría de las cepas de *M. bovis*, las cuales, crecen mejor en atmósfera microaerofílica y a temperatura de incubación de 35 a 37°C, con un crecimiento visible generalmente después de 4 o 5 semanas de incubación (Grange et al., 1996).

Patogénesis

M. bovis se disemina al ganado primeramente a través de la inhalación de aerosoles provenientes de la tos o estornudos de animales infectados o de partículas de polvo infectadas (Cousins, 2001). Aunque la diseminación también puede ocurrir en forma indirecta de alimento contaminado, agua o fómites (Neill et al., 1994). Investigaciones experimentales en animales comparando inoculaciones intravenosas, intratraqueales e intraperitoneales, así como exposición oral a *M. bovis*, revelan que la naturaleza y extensión de la enfermedad varían con la ruta de exposición y dosis de los organismos (Thoen et al., 2006). Se caracteriza por el desarrollo de granulomas primeramente en nódulos pulmonares, pero ocasionalmente en otros órganos. Si la infección no contiene el desarrollo de lesiones caseosas las cuales interfieren con la función pulmonar. El curso de la enfermedad es crónica a progresiva en el transcurso de los años. El ganado, zarigueyas o tejones

infectados con *M. bovis* típicamente desarrollan lesiones tuberculosas en los pulmones y en linfonódulos torácicos (Jubb et al., 1985; Morris et al., 1994).

Se considera como el complejo primario de la tuberculosis a la combinación de lesiones en el foco inicial de la infección y los ganglios linfáticos regionales (Dungworth, 1993).

Las lesiones por lo general aparecen como firmes nódulos de color blanco a amarillento, y con frecuencia son pequeños. El tubérculo desarrolla fibroplasia periférica y necrosis central caseosa; se puede observar mineralización en la zona necrótica caseosa (Neill et al., 2001).

Las lesiones tuberculosas son más frecuentes en tejidos linfáticos de la cavidad torácica, por lo general los bronquios y/o o los ganglios linfáticos del mediastínico (Stamp, 1948). Los ganglios linfáticos de la región de la cabeza, son el segundo sitio más frecuente, en muchos casos las lesiones en los ganglios retrofaríngeos y submaxilares, pueden existir en ausencia de las lesiones pulmonares detectables. En menor medida las lesiones se encuentran en ambas regiones simultáneamente (Corner, 1994).

Las lesiones tuberculosas que se producen únicamente en los ganglios linfáticos mesentéricos no son ahora un hallazgo común, pero de vez en cuando son el resultado de la ingestión de una gran carga bacteriana, como por beber leche contaminada (Dungsworth, 1993).

Epidemiología

Información disponible en la actualidad, considera a los países de América Latina y El Caribe dentro de tres grupos de acuerdo a la prevalencia

de tuberculosis bovina (Cotrina, 2001; Ritacco et al., 2006). En el primer grupo, los países con una prevalencia menor de 0.1% o nula, incluye a la mayoría de los países del Caribe: Anguila, Antigua, Bahamas, Barbados, Bermudas, Islas Vírgenes, Dominica, Grenada, Guadalupe, Montserrat, Antillas Holandesas, San Kitts-Nevis, Santa Lucía, San Vicente-Grenadinas, Trinidad y Tobago, Jamaica y Cuba; América Central: Panamá, Honduras y Belice; América del Sur: Colombia, Surinam, Uruguay y Venezuela. En conjunto, estos países tienen una población bovina de 61.6 millones aproximadamente. Segundo grupo, países con prevalencias entre 0.1 y 1.0%; América del Norte: México; América del Sur: Paraguay; El Caribe: República Dominicana; y América Central: Nicaragua, Costa Rica y El Salvador. En conjunto constituyen 47.7 millones de bovinos. El tercer grupo, países con prevalencias mayores del 1%, o sin información disponible; El Caribe: Haití; América Central: Guatemala; América del Sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Perú y Guyana. En estos países hay aproximadamente 265.1 millones de bovinos (Ritacco et al., 2006). En consecuencia, cerca del 70% del ganado en Latinoamérica se localiza en áreas con alta prevalencia de la enfermedad, y casi el 17% se encuentra en áreas virtualmente libres de tuberculosis (De Cantor y Ritacco, 2006).

En México, la incidencia de tuberculosis bovina varía según la región, con ganado de carne en los estados más al norte teniendo la menor prevalencia de menos del 2% (Ritacco et al., 2006). Sin embargo, la prevalencia de *M. bovis* en el ganado lechero en México es significativamente

más alta, con una tasa de infección estimada en esta población de 16-17% (Milian et al., 2000).

Difusión de la tuberculosis en animales domésticos

El sistema respiratorio es la principal vía por la cual ocurre y se disemina la infección (Menzies y Neill, 2000). Típicamente, la infección es adquirida por inhalación e ingestión. Alternativamente, la infección puede ser adquirida indirectamente por un ambiente contaminado (Quinn and Collins., 2006). El contacto directo entre el ganado, el uso compartido de comederos, bebederos y zonas de descanso, son factores de gran riesgo que aumentan proporcionalmente con el tamaño del hato y la concentración de los animales (Menzies y Neill, 2000). La enfermedad es más frecuente en vacas lecheras debido al hacinamiento, mayor periodo de vida y estrés productivo (Biberstein and Zee, 1990). Sin embargo, los hatos de ganado de carne pueden verse afectados con alta morbilidad si entran animales infectados y comparten el mismo bebedero (Blood and Radostits, 1989).

A pesar de que la vía respiratoria es la principal ruta de infección en grupos de animales que mantienen un contacto cercano, la transmisión oral a través de la ingestión del microorganismo es otra ruta importante. Para que la transmisión oral pueda llevarse a cabo, un animal sano tiene que consumir alimento o agua contaminada con moco o secreción nasal, excremento, u orina que contengan microorganismos infectivos, o recibir leche de una madre infectada (Kaneene and Pfeiffer, 2006). El consumo de alimento contaminado,

calostro y leche en becerros lactantes, son factores que contribuyen a transmitir la enfermedad entre los animales (López et al., 1997).

La transmisión Pseudo-vertical a través del contacto estrecho entre una vaca y su cría también ha sido mencionado como un factor de riesgo (Phillips et al., 2003). Esto es posible vía ingestión de leche tuberculosa, con vacas infectadas subclínicamente excretando 10^3 cfu/ml (Zanini et al., 1998). La transmisión todavía puede tomar lugar por medio de la ingestión de calostro de vacas falsos negativos a la prueba de la tuberculina, de las vacas infectadas inmediatamente después del parto, o posible infección en el útero (Rentería y Hernández, 1996).

No se ha demostrado predisposición genética de determinados hospederos a la infección por *M. bovis*, ni mayor susceptibilidad debido a edad, sexo o estado reproductivo (Morris et al., 1994).

Tuberculosis en animales salvajes

Los animales salvajes que se conocen que son susceptibles a *M. bovis* incluyen a los cérvidos y otros artiodáctilos (Jackson, 2002) insectívoros (topos, topillos, erizos) roedores (Clifton, 1996) lagomorfos (Montgomery, 1999) rinocerontes (Stetter et al., 1995), primates (Keet et al., 2000) y varias especies de pinnípedos (Tryland, 2000). En algunas especies, se cree que la tuberculosis se disemina a través del consumo de cadáveres de animales infectados, por carnívoros y carroñeros bajo condiciones naturales (Michel, 2002).

En años recientes, algunos huéspedes reservorios de vida silvestre han sido identificados. Éstas especies incluyen al bisonte de Norteamérica (Nishi et al., 2002), búfalo africano (Michel, 2002), tejones europeos en el Reino Unido (Clifton, 1996) y Suiza (Delahay et al., 2002) zarigüeyas de cola de cepillo en Nueva Zelanda (Jackson, 2000), ciervos de cola blanca en Michigan (Schmitt et al., 2002) y algunas especies de antílopes en Sudáfrica (Michel, 2002).

La importancia de la infección en animales salvajes se centra en tres aspectos: i) el papel de algunas especies salvajes en el mantenimiento de la tuberculosis y actuando como reservorios de la infección para el ganado; ii) la morbilidad y mortalidad que la infección puede causar en especies protegidas y en peligro de extinción; y iii) la posibilidad de su impacto en la salud pública (Aranaz et al., 2004).

El riesgo que estos reservorios de la infección plantean para los animales domésticos y para los humanos es muy variable, depende de la situación epidemiológica específica de las especies y el ambiente (Morris et al., 1994).

Diagnóstico

Antes del desarrollo de la prueba de tuberculina, los veterinarios se basaban en el examen físico para diagnosticar la tuberculosis bovina. Con limitadas herramientas de diagnóstico, los veterinarios sólo identificaban en vivo a una de cada diez vacas tuberculosas (Olmstead and Rhode, 2004).

En 1882, Robert Koch obtuvo un filtrado inactivado por calor a partir de cultivos de *M. tuberculosis*, y descubrió que éste material podría proteger a los

cobayos de tuberculosis experimental. Este producto, conocido como "tuberculina vieja de Koch", se administró a pacientes con tuberculosis, y Koch afirmó que este tratamiento dio lugar a la curación de la enfermedad (Gradmann, 2006). Sin embargo, los pacientes con tuberculosis que recibieron la tuberculina tuvieron reacciones sistémicas generalizadas, incluyendo fiebre, dolores musculares y malestar abdominal con náuseas y vómitos, por el contrario las personas que no tenían tuberculosis, no desarrollaron reacciones violentas. Estas observaciones fueron la base para proponer la utilización de la tuberculina como prueba diagnóstica. La inyección intradérmica de la tuberculina fue descrita por Mantoux, y su método se extendió debido a la reproducibilidad de los resultados. Después de la aplicación local del producto por vía intradérmica, una respuesta característica se desencadena dentro de 24 a 72 horas, que incluye la induración, la infiltración de monocitos y la hinchazón en el sitio de la inyección. La reacción de la piel, clasificada como tipo de hipersensibilidad tardía, ha sido utilizada desde entonces para comprobar si ha ocurrido una exposición previa a un antígeno. En 1934, Siebert hizo un precipitado de proteínas simples de la tuberculina vieja y la llamó derivado proteico purificado (PPD) (Singh and Espitia, 2007).

Durante casi un siglo, la tuberculosis se ha diagnosticado principalmente por la detección de bacilos "ácido-alcohol resistentes" en los exámenes post-mortem y el uso de la prueba intradérmica de la tuberculina en los animales vivos (Pritchard, 1988).

Histopatología

El diagnóstico preliminar de micobacteriosis se puede hacer en tejidos que muestren lesiones histológicas características (necrosis caseosa, mineralización, células epiteloides, células gigantes multinucleadas y macrófagos) (OIE, 2004). Para el diagnóstico histopatológico se deberá utilizar la tinción de hematoxilina-eosina. Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y nueva fucsina en cortes o improntas realizados con el material sospechoso (NOM-031-ZOO-1995).

Examen microscópico

Mycobacterium bovis se puede demostrar microscópicamente en frotis directos de muestras clínicas y en materiales tisulares preparados (OIE, 2004). Varios métodos pueden utilizarse para determinar la naturaleza “ácido alcohol resistente” de un microorganismo. Los métodos Ziehl-Neelsen y Kinyoun utilizan fucsina básica en etanol para la tinción primaria (Van Deun, 2005). En caso de ser una muestra positiva mediante la tinción de Ziehl Neelsen se observarán bacilos teñidos de color rojo. La microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, tiñe a la bacteria de color verde brillante (NOM-031-ZOO-1995).

Las bacterias se ven como bacilos delgados, a menudo con aspecto de una hilera corta de cuentas. Las especies de micobacterias no pueden ser

diferenciadas por microscopia. Por lo que el diagnóstico definitivo debe basarse en la identificación del microorganismo a partir de la muestra clínica. Además, la microscopia es menos sensible que el cultivo (Aranaz, 1996).

Cultivo Bacteriológico

El cultivo bacteriológico es considerado como la prueba de oro y la prueba definitiva para la confirmación de la tuberculosis bovina. Sin embargo, el diagnóstico microbiológico de *M. bovis* es un procedimiento lento que puede tardar de 2 a 3 meses y un adicional de 2 a 3 semanas para la identificación de los aislamientos con pruebas bioquímicas. También se sabe que la sensibilidad del cultivo bacteriológico no es del 100%, y pueden ocurrir resultados falsos negativos (Duffield et al., 1989).

El cultivo de las micobacterias puede realizarse a partir de diversas muestras: aspirados de cavidades, biopsias, esputos, orina, leche, etc. (Aranaz, 1996).

Para el cultivo de la micobacteria se considera dos tipos de muestras: muestras contaminadas y muestras recolectadas asépticamente de sitios estériles. Las muestras estériles pueden ser inoculadas directamente a un medio de cultivo. Las muestras de sitios no estériles se consideran contaminadas y requieren ser procesadas antes de cultivarlas (De Waard and Robledo, 2007).

Los métodos de descontaminación más comúnmente utilizados son: hidróxido de sodio a 2% y 4% de concentración; N-acetilcisteína-hidróxido de sodio, cloruro de sodio e hidróxido de sodio y ácido oxálico (Della Latta, 2004).

Las muestras son centrifugadas y el sedimento se inoculara en tubos con medio de cultivo con base de huevo como Löwenstein-Jensen y Stonebrink (Keating, 2005). Medios de cultivo basados en agar como Middlebrook 7H10 y 7H11 también son utilizados, así como el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9. Estos medios han mostrado ligeramente un mayor rendimiento en el aislamiento que los medios con base de huevo (De Waard and Robledo, 2007). En la última década, medios de cultivo comerciales se han introducido en el mercado, tales como: el tubo indicador de crecimiento de micobacterias (MGIT), MB Redox y KRD “Niche B”, etc., siendo BACTEC-460, el primer sistema comercial en el mercado para el cultivo de micobacterias. Estos nuevos sistemas basados en medios de cultivo líquidos, han demostrado ser significativamente más sensibles que los medios de cultivo sólidos con base de huevo (Hines, 2006).

Los medios de cultivo con base de huevo y agar, deben ser examinados en su crecimiento 2 veces por semana durante las primeras 4 semanas, iniciando del 3ro. al 5to. día post inoculación y de ahí en adelante, 1 vez a la semana hasta la semana 8. El crecimiento en el cultivo debe ser confirmado por microscopia de los frotis de los bacilos “ácido-alcohol resistentes” de las colonias. Los cultivos que resulten positivos, deben ser identificados utilizando métodos bioquímicos o moleculares (Burman, 2000).

Las principales pruebas bioquímicas para diferenciar a las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* son: prueba de acumulación de niacina, crecimiento en presencia de ácido p-nitrobenzoico (Leão, 2004), prueba de

reducción de Nitratos, prueba de Catalasa, prueba de Pirazinamidasas, crecimiento en presencia de tiofeno-2-ácido carboxílico hidrazida (Vincent, 2003).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los métodos de PCR para la detección de miembros del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas, se desarrollaron a mediados de los años 90's. Aunque el primer método desarrollado de PCR utilizó primers dirigidos a una secuencia específica de *M. bovis* (Rodríguez, 1995), la mayoría de los protocolos de PCR utilizan primers derivados de la secuencia de inserción IS6110, presente en todos los miembros del complejo de *M. tuberculosis* (Zanini et al., 1998).

El PCR puede aplicarse a una amplia variedad de muestras (cultivo puro, tejidos, líquidos biológicos) (Innis and Gelfand, 1990).

La reacción en cadena de la polimerasa (Mullis et al., 1987) permite la amplificación de secuencias específicas de ADN, generando millones de copias a partir de una sola molécula de ADN. En un primer paso, el ADN es desnaturalizado a 94°C. En un segundo paso, los iniciadores (primers) de la reacción, oligonucleótidos de 15 a 30 pares de bases, hibridan en secuencias del genoma conocidas y separadas de 100 a 2000 pares de bases del ADN molde. En el tercer paso, el fragmento del ADN localizado entre los iniciadores es rápidamente amplificado utilizando una enzima ADN polimerasa que actúa a 72°C. El fragmento de ADN se duplica en cada ciclo, obteniéndose una copia de cada una de las cadenas. La reacción vuelve a repetirse 30 o 35 ciclos,

obteniéndose replicaciones sucesivas. El producto de la reacción puede ser detectado por electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio (McFaden et al., 1990).

Prueba de tuberculina

El principal método para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado o venado es la prueba intradérmica de la tuberculina, la cual mide la reacción de hipersensibilidad tardía a una inyección de tuberculina, un derivado proteico purificado de un cultivo de *M. bovis* (PPD bovino). Normalmente, 0.1 ml de PPD Bovino que contiene no menos de 2000 unidades (Haagsma, 1984).

La prueba intradérmica de la tuberculina, ha sido aplicada de varias formas, ya sea en forma caudal o cervical, y sigue siendo uno de los pilares en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina (O'Reilly y Daborn, 1995). En la prueba caudal el PPD se inyecta en un pliegue de piel en la base de la cola. Cualquier inflamación palpable o endurecimiento 72 hrs después de la inyección se considera una reacción positiva y el animal es considerado como "reactor". Debido a que los animales que están infectados o expuestos a diversas micobacterias ambientales no tuberculosas (ejemplo, *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. kansasii*, etc.) pueden mostrar reacciones positivas en la prueba caudal, una prueba de seguimiento conocida como prueba intradérmica cervical comparativa, se utiliza después de la prueba caudal para diferenciar una infección verdadera por *M. bovis* de una exposición por micobacterias no tuberculosas. Para llevar a cabo la prueba comparativa, se rasuran dos sitios en la cara lateral del cuello. PPD bovino se

inyecta en un sitio y PPD aviar se inyecta en el segundo sitio. El cambio en el grosor de la piel debido a la inflamación o induración se mide en los dos sitios, antes de la inyección y 72 hrs después de la inyección. El cambio relativo en el grosor de la piel en los dos sitios se utiliza para diferenciar una verdadera infección por *M. bovis* de una infección por micobacterias ambientales no tuberculosas (Palmer et al., 2006). Los animales infectados con tuberculosis bovina muestran una mayor respuesta al PPD bovino, en comparación con la respuesta al PPD aviar (Norby et al., 2004).

Datos recientes sugieren que la prueba intradérmica cervical comparativa tiene una sensibilidad del 90% (10% de falsos negativos) y una especificidad superior al 99% (menos de 1% de falsos positivos) (Tizard, 2009).

Prueba de IFN- γ

En los últimos años, la medición de la liberación de IFN- γ de muestras de sangre estimuladas in vitro con PPD, se ha convertido en una prueba disponible adicional para la tuberculosis bovina (Ryan et al., 2000).

BOVIGAM® (Prionics, Switzerland) es una prueba basada en la inmunidad mediada por células que se utiliza en forma independiente o como prueba auxiliar a la prueba de la tuberculina. El procedimiento describe dos etapas: etapa 1, las muestras de sangre heparinizadas se mezclan con antígenos específicos: PPD bovino, PPD aviar o antígenos de control negativo, y se incuban a 37°C durante toda la noche. En la etapa 2, el sobrenadante del plasma se utiliza para estimación de IFN- γ mediante un ELISA sándwich. La infección de tuberculosis se indica por un predominio de IFN- γ en respuesta al

PPD bovino. La sensibilidad ha oscilado entre 81.8% y 100% y la especificidad entre 94% y 100% (Ryan et al., 2000; Wood and Jones, 2001).

Control de la Tuberculosis Bovina

Dos de los métodos de control extensamente utilizados son el método de prueba y sacrificio y el método de Bang (Cousins et al., 2004).

Bernard Bang propuso un modelo de control, sin sacrificio, atractivo a los productores, ya que impedía la pérdida de recursos genéticos críticos (Norton, 1904). En el modelo de Bang, los ganaderos fueron alentados a separar su ganado en dos manadas: animales reactores a la tuberculina y animales no reactores a la tuberculina (sanos). Cada manada estaba bajo el control de encargados y alojados en hatos por separados. Los becerros iban a ser retirados al nacer y la leche de la madre, pasteurizada antes de su uso. El sacrificio de los animales en el sub hato podría llevarse a cabo solamente bajo supervisión de un inspector sanitario competente. Con este sistema, el hato sano aumenta de tamaño progresivamente, mientras que el hato tuberculoso lentamente se ve disminuido. El hato sano era monitoreado continuamente a través de pruebas de tuberculina para detectar animales latentes o recientemente infectados. Tales prácticas minimizarían la diseminación de la enfermedad dentro del hato a través de alimentos contaminados, agua, cama, esputo, heces y por medio de aerosoles de dichos materiales. Mientras el modelo de Bang fue ampliamente utilizado en Europa, en los Estados Unidos era menos popular. El costo de mantener un sub hato era prohibitivo para muchos. El tiempo extra y gastos involucrados en el cuidado de los animales

reactores, así como la poca aceptación del público en la pasteurización de la leche fueron la fuerza de disuasión. El sentimiento era común, por lo que la mayoría de los veterinarios estaban a favor del enfoque "prueba y sacrificio" y rara vez se aplicaba el modelo de Bang (Palmer and Waters, 2011).

El control de la tuberculosis bovina mediante la estrategia de "prueba y sacrificio", ha reducido la incidencia y prevalencia de la enfermedad en los países desarrollados, excepto en aquellos con reservorios de vida salvaje, tales como El Reino Unido y Nueva Zelanda. Sin embargo, este método es muy costoso para ser aplicable a la mayoría de los países en desarrollo. La vacunación representa una estrategia de intervención alternativa para reducir el impacto de la tuberculosis bovina en la productividad del ganado y la salud pública en los países en desarrollo. La única vacuna disponible contra la tuberculosis es la vacuna para humanos *M. bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG). Esta vacuna se ha utilizado en el ganado en un gran número de experimentos y ensayos con eficacias variables (Buddle et al., 2005).

M. bovis bacilo Calmette-Guérin (BCG) es la vacuna más ampliamente utilizada a nivel mundial, con un estimado de 3 mil millones de dosis que se han administrado desde su descubrimiento y pruebas iniciales en los años 20's (Fine, 1995). A pesar de su uso extendido, la eficacia de *M. bovis* BCG sigue siendo muy variable, con tasas de éxito en casos de humanos y animales de entre 0 y 80 % de protección (Colditz et al., 1995). La protección ofrecida por BCG contra la tuberculosis bovina puede estar influenciada por la exposición de los animales a micobacterias medioambientales, que pueden interferir con la

adquisición de la inmunidad total después de la vacunación (Buddle et al., 2002). A pesar de esto, *M. bovis* BCG disminuye la diseminación de la enfermedad. Animales infectados vacunados, presentan menos lesiones que los animales infectados no vacunados (Corner et al., 2002).

En países donde la prevalencia de la enfermedad es alta y no existe bolsa de indemnización, la utilización de la vacuna de *M. bovis* BCG junto con un programa de buenas prácticas de manejo (pasteurización de calostro, desinfección de corraletas, separación de animales sanos y enfermos, entre otras) puede contribuir a disminuir la presencia de la enfermedad en los hatos (López, 2009).

La pasteurización de la leche es reconocida como un método exitoso para disminuir la diseminación de la enfermedad a los humanos y a los animales que son alimentados con leche de vaca (Cousins et al., 2004). Fue introducida por primera vez en 1898 de manera obligatoria, no para proteger a los humanos, sino para prevenir la tuberculosis en cerdos y becerros alimentados con leche obtenida de hatos infectados (Cosivi et al., 1998). Sin embargo, la mayoría de los hatos lecheros no cuentan con protocolos para la pasteurización del calostro antes de proporcionarse como alimento y para eliminarse el calostro de vacas positivas a infección por *M. paratuberculosis* (NAHMS, 2007).

El tratamiento térmico recomendado es de 60°C durante 30 minutos, lo cual reduce el número de bacterias, conserva la concentración de IgG y

aumenta la eficiencia aparente de absorción de IgG (Elizondo and Heinrichs, 2009).

Los métodos más efectivos para destruir la micobacteria son aquellos que se basan en el uso del calor, como el aire caliente, cocción, pasteurización, etc. Los bacilos tuberculosos son más resistentes a la acción química que muchas otras especies de bacterias. Los desinfectantes fenólicos, son en general, más eficaces que la mayoría de las sustancias químicas. (Cousins et al., 2004). La NOM-031-ZOO-1995 sugiere utilizar elementos físicos y/o sustancias químicas para lograr su inactivación o destrucción, tales como Solución de Cal clorada o Cloruro de calcio (cloro activo al 5%), el formol al 5-3%, sosa cáustica al 3% a 70°C o Fenol al 5%, así como otros medios físicos y/o biológicos autorizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

Sea cual sea el medio de desinfección, debe ser seguido por la limpieza física de techos, paredes, pisos, herramientas, utensilios y equipo, utilizando grandes cantidades de agua (Cousins et al., 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en un establo lechero comercial ubicado en la colonia compuertas (Lat: 32.6552, Alt: -115.3835) de Mexicali, Baja California, el cual cuenta con un promedio de 580 hembras de la raza Holstein Freisian , con una producción de 8500 lt/lactancia.

Diseño del estudio

Se consideraron dos etapas: 1) Un análisis retrospectivo de la prevalencia de la tuberculosis del hato antes de implementar el programa de vacunación y de buenas prácticas de manejo; 2) Una evaluación por medio de un estudio epidemiológico longitudinal prospectivo en el cual, la prevalencia de la tuberculosis sé evaluó a través de las generaciones dentro del hato (evaluada al inicio y al final del estudio). La duración de este estudio fue de 3 años, en el cual los animales que conforman el hato, fueron sometidos a un programa de vacunación y buenas prácticas de manejo. Los animales recién nacidos recibieron calostro y leche de vaca pasteurizada, así como leche en polvo. En esta etapa se les aplicó por una sola vez la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG. Se llevó un registro de las prevalencias generadas a través de los años. La variable a evaluar fue la prevalencia de Tuberculosis bovina dentro del hato por medio de la prueba de la tuberculina, la cual se aplicó al inicio y al final del estudio. Así mismo, se llevó un registro de tasas de mortalidad en el área de becerros a través de los años.

Programa de buenas prácticas de manejo

Manejo de la hembra

Antes del parto: Dos meses antes del parto, la hembra se seca y es retirada del área de producción para ser colocada en un corral para hembras secas. Al momento del secado se le administran 2 ml de una vacuna-bacterina contra rotavirus, coronavirus; *C. prefringens* tipo C y *E. Coli* enterotóxica.

Al cumplir un mes de seca, la hembra es retirada del corral de secas para ser colocada en el corral de parto. Así mismo, a un mes de parir se le administran 5ml de clostridiales.

Después del parto: Una vez que la hembra termina de parir a su cría, la estimula acicalándola por un periodo de 20 a 30 minutos aproximadamente. Posteriormente, es apartada de su cría para ser conducida al área de enfermería, lugar en el cual es palpada para corroborar que no este cargada con otra cría. En ésta área, sus ubres son lavadas a presión con agua corriente e impregnadas con un presellador a base de tintura de yodo, para enseguida ser ordeñada manualmente. La cantidad de calostro que se ordeña por hembra es de 4 lt aproximadamente. Al término de la ordeña las ubres se impregnan con solución azul como sellador.

Después de ordeñada, la hembra es conducida al corral de recién paridas, en donde permanece 3 días aproximadamente. Aquí se le ordeña en la mañana y en la tarde con equipo de ordeña. La leche de la ordeña de los primeros tres días se pasteuriza y se le proporciona a su cría. Así mismo, la leche se somete a prueba por medio del Kit SNAP*MRL betalactámicos

(IDEXX, Laboratories, Inc., USA) para descartar la presencia de antibióticos. La hembra que no presenta residuos de antibióticos en leche es retirada del corral de recién paridas y conducida a un corral de hembras frescas.

Manejo del recién nacido

La cría al nacer es separada de la madre y transportada al área de becerreras en donde se le mantiene en una jaula limpia y desinfectada. En ésta área se le desinfecta el ombligo impregnándolo con una solución de tintura de yodo. Posteriormente, se le alimenta por medio de un biberón en una sola toma con 4lt en promedio de calostro pasteurizado adicionado con 3ml de vitaminas A, D, E y selenio, durante las primeras 6 hrs de vida. Cuando el becerro es pequeño, recibe solamente 2 lt de calostro pasteurizado en una sola toma.

El consumo de una cantidad suficiente de calostro de buena calidad en las primeras 24 hrs de vida, es importante para la salud y productividad futura de los becerros (DeNise et al., 1989).

Manejo de calostro

El calostro obtenido de la hembra recién parida se somete a prueba de calidad por medio del Calostrómetro (BIOGENICS, USA). Éste aparato se utiliza para estimar la concentración de IgG (mg/ml) en el calostro.

La prueba de calidad del calostro consiste en depositar una muestra de 250 ml aproximadamente de calostro dentro de una probeta e introducir el Calostrómetro, de manera que éste flote en el calostro por un lapso de 1 minuto. La medición se efectúa al obtener la lectura de la marca de calostro

que se observa al retirar el Calostrómetro y constatar el nivel de mg/ml de IgG que dejó la marca del calostro sobre el aparato.

Se considera calostro superior (área verde) a la concentración de 50, 70, 80...140 (mg/ml) de IgG, calostro marginal (área amarilla) de 30 a 40 (mg/ml) de IgG y calostro inferior (área roja) de 10 a 20 (mg/ml) de IgG.

El calostro de calidad superior o marginal se pasteuriza para ser proporcionado a la cría y el calostro de calidad inferior se desecha. El calostro pasteurizado que sobra después de administrarle su porción a la cría, se enfría a temperatura ambiente y se deposita en recipientes de plástico para congelarlo. El calostro conservado se utiliza en el caso de que una hembra recién parida no tenga suficiente calostro o sea de mala calidad. Así mismo, se procura que el tiempo desde el almacenamiento, hasta la utilización del calostro congelado, no exceda los 2 meses.

Chigerwe et al. (2008) realizaron un estudio cuyos resultados sugieren que el uso del hidrómetro (calostrómetro) es un método aceptable de detección de calostro de baja concentración de IgG.

Manejo de leche de vaca

La leche de vaca proporcionada a la cría es adicionada con 50 ml de un medicamento homeopático a base de extractos vegetales contra las diarreas en becerros, por cada 20 lt de leche. Seguido de esto, se pasteuriza para ser proporcionada a los becerros.

Manejo de leche en polvo

La leche en polvo se proporciona a la cría en forma esporádica como auxiliar en la alimentación de los becerros. Ésta, consiste en un sustituto de leche para bovinos con proteínas de origen lácteo, vitaminas y minerales, etc., la cual, se prepara en un tanque batidor para leche en polvo con capacidad para 200 lt. El procesamiento de la leche en polvo inicia primeramente, añadiendo una parte de agua corriente de la llave, enseguida la parte de leche en polvo y por último la parte de agua tibia (38 a 43°C). Finalmente, se agrega un producto a base de levadura. La duración del proceso de batido es de 5 minutos.

Proceso de pasteurización

El procesamiento térmico del calostro y la leche de vaca se realizan mediante un proceso de pasteurización lenta o discontinua. El equipo de pasteurización está compuesto por una olla de pasteurización de acero inoxidable con capacidad de 140 lt, regulador de corrientes de agua caliente y agua fría y marcador de temperatura. La pasteurización se realiza sometiendo la leche a calentamiento, a una temperatura de 75°C durante 15 minutos, a través de inmersión en baño María. Posteriormente, la leche se somete a un enfriamiento por inmersión en baño María con agua fría, hasta disminuir la temperatura a 32°C.

Manejo de becerros en el área de becerrerías

Los becerros recién nacidos permanecen en ésta área hasta que cumplen 40 a 45 días de edad. El primer día de nacidos reciben el manejo para

recién nacidos. Después, el manejo habitual. Los becerros se alimentan con leche de vaca pasteurizada, en biberones, a razón de 2 lt en la mañana y 2 lt en la tarde, durante 30 días. A partir de los 30 días de vida, solamente reciben 2 lt de leche por la mañana. Si la leche de vaca no es suficiente para administrar a los becerros, se les proporciona leche en polvo.

Desde el tercer día de nacidos se les coloca alimento concentrado peletizado en cubetas, iniciando con 100 gr y aumentando gradualmente hasta llegar a 1 kg al momento del destete. Así mismo, desde el tercer día se les coloca agua en cubetas.

Al cumplir los 40 a 45 días de edad, se destetan y son colocados en corrales.

Manejo de becerros en el área de destete

Al cumplir 40 días de edad los becerros son retirados del área de becerreras y colocados en corrales pequeños. Esta área, se encuentra continua al área de becerreras, próxima al área de vaquillas y apartada de los demás corrales en producción del establo. Aquí ya no se les proporciona leche, sólo alimento concentrado peletizado durante 15 días. Después son colocados en corrales más grandes en donde reciben forraje.

Manejo de becerros machos y hembras al término del destete

Al momento del destete, machos y hembras son confinados a un solo corral y paulatinamente los machos son segregados a otros corrales. Al término del destete, los becerros machos son colocados en corrales continuos a los corrales de destetados y vendidos posteriormente. Las hembras son colocadas

en el área de vaquillas, conformada por corrales próximos a los corrales de destetados.

Manejo de hembras en el área de vaquillas

Las vaquillas recién inseminadas y gestantes permanecen en ésta área. Se mantienen separadas de las hembras de más lactancias. Sin embargo, por falta de espacio, hay corrales de vaquillas continuos a las de hembras de más lactancias.

Las vaquillas son alimentadas primero y después el resto de las hembras de los otros corrales.

Dos meses antes de parir son removidas a un corral de parto en al área de vaquillas.

Limpieza y desinfección del hato

Remoción de estiércol

Diariamente se realiza la remoción de estiércol dentro de los corrales y el excremento acumulado se vende.

Se utiliza agua corriente a presión para remover el excremento de las jaulas y pisos en el área de becerreras, pisos de ordeña y área de enfermería.

Desinfección

Un desinfectante de amplio espectro a base de compuestos fenólicos y glutaraldehído, se utiliza para lavar las superficies dentro del hato. Las trampas, tapetes sanitarios, pisos de ordeña y área de enfermería se lavan con este desinfectante. Así mismo, en el área de becerreras se encuentra un

pediluvio, al cuál se le agrega el desinfectante, mismo que es utilizado para desinfectar las jaulas una vez que son desocupadas por los becerros.

La desinfección del equipo y material utilizados en el área de pasteurización, se realiza con un detergente alcalino clorado de alta espuma. La olla de pasteurización, tanque batidor, biberones y chupones, son lavados con éste detergente después de cada uso.

Manejo de fauna silvestre

Control de palomas

M. avium subspecie avium es ubicua en el ambiente, y es el agente asociado más comúnmente con la tuberculosis aviar y la causada en mamíferos y en el hombre (Aranaz, 1996). Por tal motivo, la presencia de la paloma doméstica (*Columba livia*) en el establo, es un factor predisponente a la diseminación de la mycobacteria en el establo.

El complejo *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* se encuentra por todas partes en el medioambiente, y son la influencia de mayor confusión en la especificidad de la prueba de tuberculina utilizada para detectar la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en humanos o *Mycobacterium bovis* en el ganado. Antígenos crudos, en la forma de derivado proteico purificado (PPD) de cultivos de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, se utilizan como antígenos de reestimulación en la prueba de tuberculina en vivo y en diagnósticos basados en muestras de sangre para identificar infecciones tuberculosas. Son comunes los resultados falsos positivos, y se cree que éstos resultados se deben a la reactividad cruzada de respuesta inmune inducida por

una exposición transitoria o infección por miembros del complejo *M. avium-M. intracellulare* (Black et al., 2001).

Ante esta situación, periódicamente, un equipo de profesionales capacitado en el control de palomas, realiza actividades de caza dentro del establo.

Previo a la caza de palomas, se ahuyentan a las aves hacia un área determinada con el propósito de concentrar en un solo lugar la población, y evitar su dispersión en todo el establo. El área determinada se localiza en las inmediaciones del establo, y es en éste lugar en donde se colocan jaulas. Dentro de las jaulas, se deposita alimento: trigo, concentrado para vacas, etc. Así mismo, se colocan palomas como carnada para atraer a las aves. Durante varias semanas realizan ésta actividad, logrando capturar miles de palomas y disminuyendo paulatinamente su población dentro del establo.

Programa de vacunación

Producción de la vacuna Mycobacterium bovis BCG

La vacuna se cultivó en caldo Middlebrook 7h9 (Difco, Labs) adicionado con medio de enriquecimiento OADC durante 12-15 días (fase mid-log) a 37°C. Posteriormente, se centrifugó y el sobrenadante fue eliminado y reemplazado por 10 ml de PBS (solución salina fosfatada tamponada), los tubos se homogenizaron mediante agitación. El contenido total de la suspensión se almacenó en viales estériles en cantidades de 1000 µl y se congelaron a -70°C hasta su uso. La estimación de las UFC se realizó mediante la cuenta estándar en diluciones seriadas en medio Middlebrook 7H10.

La identificación de *M. bovis* (BCG) en el cultivo bacteriano se llevó a cabo por medio de PCR.

Vacunación

Los becerros son vacunados al primer día de nacidos con 1 ml (una sola dosis: 1×10^6 UFC) de la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Tokyo), aplicada en forma subcutánea a nivel de la articulación húmero escapular.

Evaluación de la vacuna a nivel de campo

Para evidenciar la eficacia de la vacuna producida en el laboratorio, se vacunaron dos becerros, los cuales se tuberculinizaron previo a la vacunación y semanalmente se les tomaron muestras de sangre para realizarles la prueba de IFN- γ .

La prueba de IFN- γ es un análisis que se basa en la liberación de gama-interferon de linfocitos sensibilizados durante toda la noche con antígenos específicos (Wood et al., 1992).

Dos becerros machos del Establo del IICV de 1 mes de edad fueron tuberculinizados y posteriormente vacunados con 1 ml (una sola dosis: 1×10^6 UFC) de la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Tokyo), aplicada en forma subcutánea a nivel de la articulación húmero escapular. Semanalmente, se recolectaron por medio de tubos vacutainer con heparina de litio, 5 ml de sangre de la vena yugular. Las muestras fueron procesadas para ser analizadas mediante la prueba de IFN- γ . En la primera fase de la prueba, se agregaron 750 μ l de muestra de sangre a tubos de ensayo. Después, se añadieron 50 μ l de PBS, 50 μ l de PPD bovino y 50 μ l de PPD aviar

respectivamente. Fueron incubados de 18-24 hrs durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3400 rpm durante 5 minutos. En la segunda fase, se tomaron 200 µl de muestra de plasma sensibilizado con PBS, PPD bovino y PPD aviar, se depositaron en una placa de ELISA y parte del plasma se analizó mediante el Kit de Bovigam (Prionics, Switzerland) siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: se agregaron 50 µl de diluyente verde a cada pozo, enseguida se añadió 50 µl de plasma, así como controles positivos y negativos, y se mezclaron seis veces. Se dejó reposar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente del laboratorio. Posteriormente, se lavan 6 veces con solución buffer. Después del lavado se agregan 100 µl por pozo de diluyente azul y se deja reposar durante 1 hora. Seguido del reposo, las muestras se lavan 6 veces. Enseguida, se agregan 100 µl de sustrato y se deja reposar durante 30 minutos. Al término de la media hora se agrega una solución de terminación que detiene la reacción. Finalmente las muestras se colocaron en un lector de ELISA a 450 nanómetros. Se consideró caso positivo cuando la densidad óptica DO del PPD bovino menos el Nil fue ≥ 0.1 y; la DO del PPD bovino menos la DO de PPD aviar fue ≥ 0.1 . Se consideró caso negativo cuando la DO de PPD bovino menos el Nil fue < 0.1 o la DO de PPD bovino menos la DO de PPD aviar fue < 0.1 .

Al evaluar la vacuna a nivel de campo mediante las pruebas de tuberculina y IFN- γ , se obtuvo como resultado que uno de los dos becerros vacunados fue reactor en la prueba de tuberculina, a los 2 meses de vacunado. Sin embargo, en la prueba de IFN- γ ambos becerros fueron negativos durante

3 semanas consecutivas y las últimas 2 semanas el becerro rector a la prueba de tuberculina fue positivo a IFN- γ . Cabe destacar, que sólo fue posible obtener los resultados de la prueba de IFN- γ del segundo mes de aplicada la vacuna debido a que las muestras de sangre del primer mes se leyeron con valores erróneos del lector de ELISA y no se guardó un duplicado de las muestras.

Prueba de tuberculina

Se procedió a evaluar el estatus sanitario con respecto a la Tuberculosis bovina dentro del hato. Para esto, se realizó la prueba de tuberculina a los animales que conforman el hato, mayores a 6 meses de edad. Ésta prueba se aplicó a 3 años de iniciado el programa de vacunación y buenas prácticas de manejo.

Antes de aplicar la tuberculina, se limpió la zona en donde se aplicó el biológico (región pliegue caudal). Además, se efectuó un minucioso examen de ambos pliegues, anotando cualquier irregularidad que pudiera confundirse con la prueba. Previo a la inoculación, se levantó el pliegue de piel en el centro del área limpia y se procedió a medir y registrar el grosor, utilizando un cutímetro. Posteriormente, se inoculó a nivel intradérmico 0.1ml de PPD Bovino. La lectura de ésta prueba se realizó a las 72h (± 6 h) después de la aplicación, midiendo con el cutímetro el grosor de la reacción. Cualquier animal que presenta una reacción palpable o visible en el sitio de la inyección con un aumento diferencial de grosor de ≥ 4 mm en comparación con el pliegue caudal opuesto será considerado como positivo a la prueba de tuberculina (OIE, 2004).

Análisis estadístico

Se estimó la tasa de tuberculosis bovina por generación, se determinó la cantidad de casos positivos a tuberculosis bovina por generación entre el número de animales analizados de esa generación. Las diferencias entre prevalencias al inicio y al final del estudio fueron comparadas por medio de un análisis de proporciones (Martín et al., 1987). El análisis de proporciones se realizó mediante la prueba de comparación de proporciones a través del programa Statistix 8.0 (2003). A sí mismo, las tasas de mortalidad en becerros se evaluaron por medio de regresión lineal en este mismo programa estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación entre las proporciones de las prevalencias antes y después del programa de vacunación y buenas prácticas de manejo se muestra en el Cuadro 1. La proporción de animales enfermos de tuberculosis en el año 2007 en comparación con los animales enfermos en el 2010 es estadísticamente significativa ($P=0.00$). Con lo cual se estable que las prevalencias del 2007 y 2010 son diferentes. Este resultado demuestra que la prevalencia de tuberculosis bovina en el año 2007 (75%) es mayor a la prevalencia de tuberculosis bovina en el año 2010 (53%). Los resultados obtenidos parecen constatar que la disminución de la prevalencia de tuberculosis bovina se debe a la implementación de un programa de vacunación y de buenas prácticas de manejo.

El análisis de la Tasa de mortalidad de los becerros por medio de regresión lineal se observa en la Gráfica 1, en donde la dispersión de los datos refleja una nula correlación entre la mortalidad y los años. Así mismo, la ecuación de la recta ($\text{Mortalidad}=1264.16-0.62000*\text{Año}$) tiene tendencia negativa a pesar de no haber una correlación en sí. Lo cual indica el cambio en la mortalidad de los becerros por cada año transcurrido. La significancia estadística de los resultados se ve afecta por diversos eventos acontecidos en el área de becerros en el transcurso de los años. Antes de iniciados los programas de vacunación y buenas prácticas de manejo en el año 2007, sucedieron brotes de rotavirus y coronavirus que ocasionaron un aumento en la mortalidad por problemas de diarrea durante los años 2006 y 2007. Para el

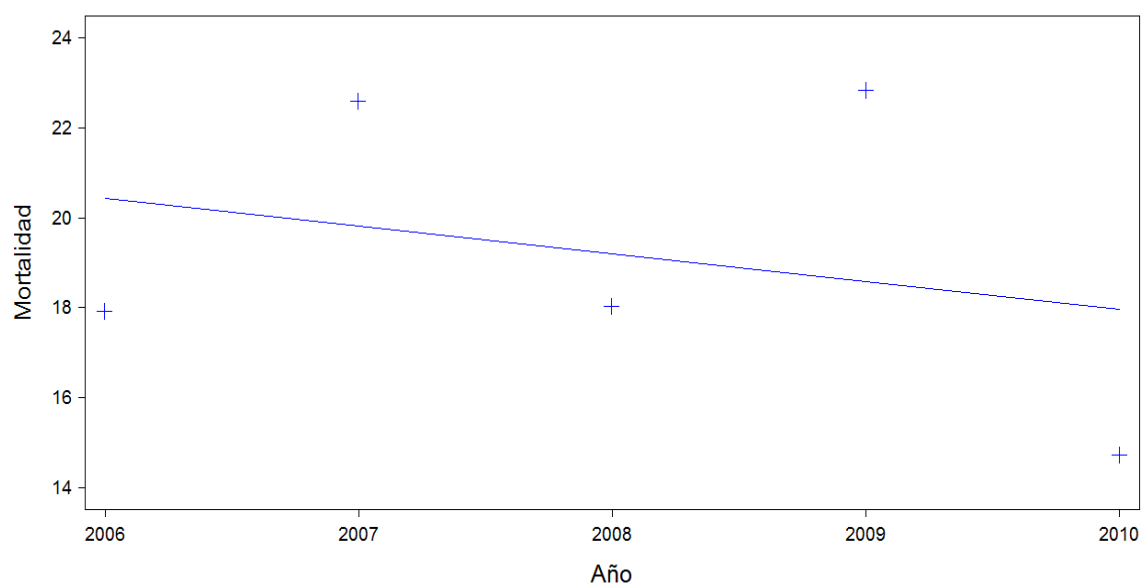
Cuadro 1. Prevalencia de tuberculosis bovina utilizando PPD bovino antes y después del programa de vacunación y buenas prácticas de manejo.

Año	Probados	Positivos	%
2007 (Antes)	540	405	75*
2010 (Después)	498	268	53

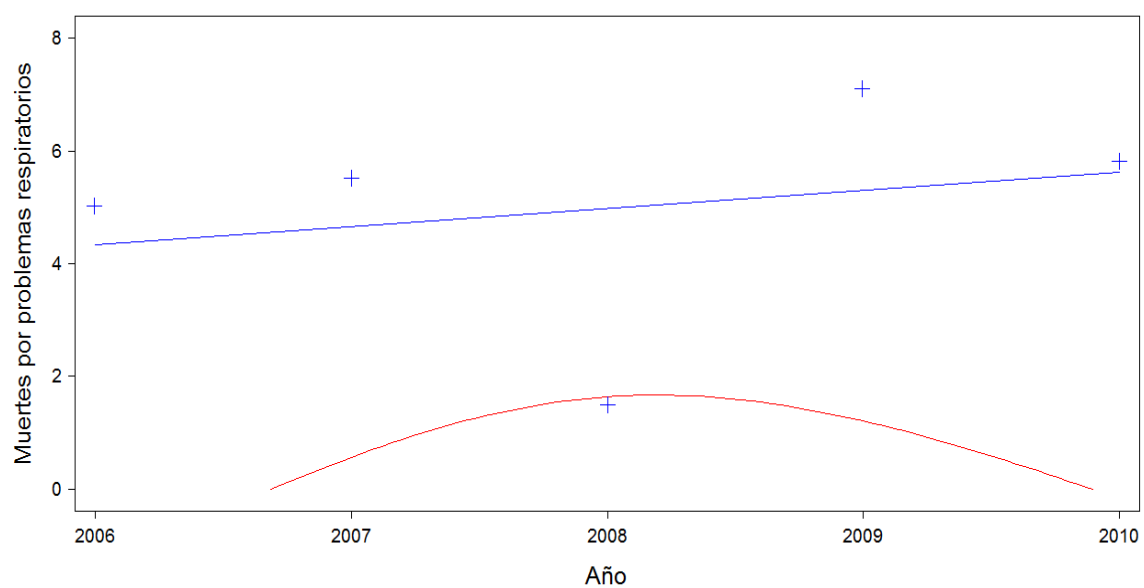
*Las prevalencias son estadísticamente diferentes ($P < 0.000$)

periodo 2008 y 2009, un aumento en el número de nacimientos ocasionó una sobrepoblación en el área de becerros, lo que provocó que se destetaran prematuramente como una medida de solución a la falta de espacio. En consecuencia, becerros de menor edad y no adaptados a las condiciones climáticas y de hacinamiento, cursaron con problemas respiratorios y murieron, ocasionando un aumento en la mortalidad durante este periodo.

La Gráfica 2 presenta la dispersión de los datos resultantes del análisis de regresión lineal de la mortalidad por problemas respiratorios, de los cuales se observa una pobre correlación con tendencia positiva estimada por la ecuación de la recta ($\text{respiratorio} = -637.580 + 0.32000 \cdot A$), la cual refleja el cambio en el número de casos de muertes por problemas respiratorios por cada año. La poca correlación entre las variables y la falta de significancia estadística resultan de diversos factores. En los años 2006 y 2007, antes de la implementación de los programas de vacunación y buenas prácticas de manejo, los problemas respiratorios se incrementaron por la falta de higiene en el área de becerros aunado al poco tiempo de espera entre un becerro y otro al utilizar la misma jaula. De similar manera en los años 2009 y 2010 el aumento en el número de becerros nacidos provocó el destete prematuro de los mismos, enfrentándolos al hacinamiento y a condiciones climáticas desfavorables como la lluvia y el frío, ocasionando un repunte en la mortalidad por problemas respiratorios.

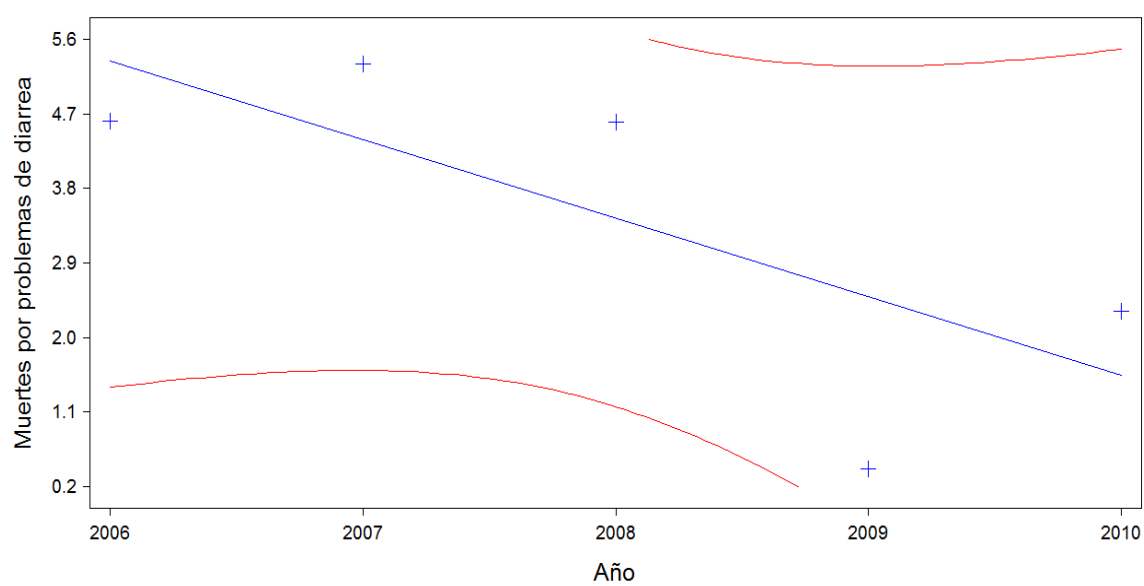


Gráfica 1. Recta de regresión de tasa de mortalidad en becerros (Mortalidad=1264.2 – 0.6200*Año 95% IC y predicción).



Gráfica 2. Recta de regresión mortalidad por problemas respiratorios (Respiratorio=-637.58 + 0.3200*Año 95% IC y predicción).

El análisis de la mortalidad por problemas de diarrea a través de los años se muestra en la Gráfica 3, la cual presenta el diagrama de dispersión, el cual denota una pobre correlación con tendencia negativa, en el cual, la ecuación de la recta estima el cambio en el número de casos de muertes por diarrea por cada año. La falta de relevancia estadística en los resultados, se debe a que en el área de becerros se presentó un brote de coronavirus y rotavirus durante los años 2006 y 2007, aunado a que antes del año 2007 no se habían implementado las buenas prácticas de manejo y el programa de vacunación. Los cambios no se hicieron evidentes hasta el periodo de 2009 en donde se observa que drásticamente la mortalidad disminuyó. Sin embargo, hay un ligero repunte en el año 2010, lo cual se adjudica a un aumento en la morbilidad de problemas de diarrea durante los primeros 3 meses de este año.



Gráfica 3. Recta de regresión mortalidad por problemas de diarrea (Diarrea=1911.0 - 0.9500*Año 95% IC y predicción).

CONCLUSIONES

La disminución del 22% en la prevalencia de tuberculosis bovina dentro del establo demuestra que sistemáticamente con un programa de vacunación y buenas prácticas de manejo se reduce generalmente la prevalencia de la enfermedad sin perder la totalidad del hato, garantizando de esta manera la producción y la calidad genética del ganado.

La tasa de mortalidad y sus causas por problemas respiratorios y diarreicos no proporcionan datos contundentes que reflejen una marcada tendencia a la baja que permita afirmar que el programa de vacunación y buenas prácticas de manejo contribuye a reducir la mortalidad dentro del establo.

Si bien, no hay diferencia estadística entre las tasas de mortalidad al implementar un programa de vacunación y buenas prácticas de manejo, la tasa de tuberculosis bovina si presenta diferencia estadística.

Por lo anterior podemos inferir que, la implementación de un programa de vacunación y buenas prácticas de manejo ofrece ventajas prometedoras en la reducción de la tuberculosis bovina a mediano plazo.

LITERATURA CITADA

- Alexander K.A., P.N. Laver, A.L. Michel, et al. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*. 16:1296–1299.
- Aranaz A.M. 1996. Aplicación de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en el Diagnóstico y Epidemiología de la tuberculosis en animales. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria.
- Aranaz A., L. de Juan, N. Montero, C. Sánchez, M. Galka, C. Delso, J. Álvarez, B. Romero, J. Bezos, A.I. Vela, V. Briones, A. Mateos and L. Domínguez. 2004. Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (6):2602–2608.
- Black, G.F., H.M. Dockrell, A.C. Crampin, S. Floyd, R.E. Weir, L. Bliss, L. Sichali, L. Mwaungulu, H. Kanyongoloka, B. Ngwira, D.K. Warndorff and P.E. Fine. 2001. Patterns and implications of naturally acquired immune responses to environmental and tuberculous mycobacterial antigens in northern Malawi. *J. Infect. Dis.* 184: 322-329.
- Biberstein E.L. and Y.C. Zee. 1990. *Rev. Vet. Microbiol.* Blackwell Scientific Publications. 202-212.
- Blood D.C. and O.M. Radostits. 1989. *Veterinary Medicine* (7 Ed). Bailliere Tindall. The University Press. Oxford (UK). 710-722.
- Buddle, B.M., B.J. Wards, F.E. Aldwell, D.M. Collins and G.W. de Lisle. 2002. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 20:1126–1133.
- Buddle B.M., D.N. Wedlock, M. Denis and M.A. Skinner. 2005. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:45-51.
- Brosch R., S.V. Gordon, M. Marmiesse, et al. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99 (6):3684–3689.
- Burman W.J. and R.R. Reves. 2000. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin. Infect. Dis.* 31:1390-1395.

- Center for Disease Control (CDC): A global perspective on tuberculosis.
<http://www.cdc.gov/tb/WorldTBDay/resources/global.htm>.
- Clifton-Hadley, R. S. 1996. Badgers, bovine tuberculosis and the age of reason. *Br. Vet. J.* 152: 243-246.
- Colditz, G.A., C.S. Berkey, F. Mosteller, T.F. Brewer, M.E. Wilson, E. Burdick and H.V. Fineberg. 1995. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: metaanalyses of the published literature. *Pediatrics* 96:29–35.
- Corner, L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40:53-63.
- Cotrina, N. 2001. Meeting of Animal Health Directors. San Salvador, july 10-11. PAHO/WHO.
- Cosivi, O., J.M. Grange, C.J. Daborn, M.C. Raviglioni, T. Fujikura, D. Cousins, R.A. Robinson, H.F. Huchzeimyer, I. Cantor and F.X. Meslin. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases.* 4:59-70.
- Cousins D.V., H.F.K.A. Huchzermeyer, J.F.T. Griffin, G. K. Bruckner, I.B.J. Rensburg and N.P.J. Kriek. 2004. Tuberculosis. In: Coetzer J.A.W. and R.C. Tustin (Edit). *Infectious Disease of Livestock*. Vol 3. Oxford Univ. Press. Southern Africa.
- Cousins, D.V. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:71–85.
- Chigerwe M., J.W. Tyler, J.R. Middleton, J.N. Spain , J.S. Dill and B.J. Steevens. 2008. Comparison of four methods to assess colostral IgG concentration in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 233(5):761-766.
- De Cantor, I.N. and V. Ritacco. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 112:111–118.
- Delahay, R.J., A.N.S. De Leeuw, A.M. Barlow, R.S. Clifton-Hadley and C.L. Cheeseman. 2002. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: a review. *Vet. J.* 164:90-115.
- DeNise S.K., J.D. Robison, G.H. Stott , et al. 1989. Effects of passive immunity on subsequent production in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 72:552–554.

- Della Latta P. 2004. Mycobacteriology and mycobacterial susceptibility tests. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Second edition. Henry D. Isenberg Editor in Chief. ASM Press.
- De Waard, J.H and J. Robledo. 2007. Conventional Diagnostic Methods. In: Palomino J.C, S.C. Leão and V. Ritacco. Tuberculosis 2007 From Basic Science to patient care. In: www.TuberculosisTextbook.com.
- Duffield, B. J., J. H. Norton, and D. Hoffmann. 1989. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in northern Queensland. Aust. Vet. J. 66:307–308.
- Dungworth, D.L. 1993. The respiratory system. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N.C. (Eds.). Pathology of Domestic Animals. Academic Press. London. pp. 641–652.
- Elizondo S.J.A and A.J. Heinrichs. 2009. Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy heifers: Effects on growth characteristics and blood parameters. *J. Dairy Sci.* 92:3265–3273.
- Fine, P.E.M. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346:1339–1345.
- Gradmann C. 2006. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes. Infect.* 8: 294-301.
- Grange J.M., M.D. Yates and I.N. de Kantor. 1996. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second edition. WHO/EMC/ZOO/96.4
- Haagsma, J., L.M. O'Reilly, R. Dobbelaar and T.M. Murphy. 1984. A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculin in naturally infected tuberculous cattle, *J. Biol. Stand.* 10:273–273.
- Hines N., J.B. Payeur and L.J. Hoffman. 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 243-50.
- Innis M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press.
- Jackson R. 2002. The role of wildlife in *Mycobacterium bovis* infection of livestock in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 50:49-52.

- Jubb K.V.F., P.C. Kennedy and N. Palmer (Eds.). 1985. Pathology of domestic animals, vol. 2. Third ed. Academic Press. Orlando, FL.
- Kaneene J.B. and D. Pfeiffer. 2006. Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. In: *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. O. Thoen, H. Steele and J. Gilsdorf. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. p. 35.
- Keating L.A., R.R. Wheeler, H. Mansoor, et al. 2005. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. Mol. Microbiol. 56:163-174.
- Keet, D. F., N. P. J. Kriek, R. G. Bengins, D. G. Grobler and A. Michel. 2000. The rise and fall of tuberculosis in a free-ranging Chacma baboon troop in the Kruger National Park. Onderstepoort. J. Vet. Res. 67:115-122.
- Leão S.C., A. Martin, G.I. Mejia, J.C. Palomino, J. Robledo, M.A.S. Telles and F. Portaels. 2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Brugges, Vanden. BROELLE. 164 p. Available at: <http://www.ESMycobacteriology.eu>.
- Liebana, E.; Aranaz, A.; Mateos, A.; Villafranca, M.; Gomez-Mampaso, E.; Tercero, J.C.; Alemany, J.; Suarez, G.; Domingo, M.; Dominguez, L. 1995. simple and rapid detection of *mycobacterium tuberculosis* complex organism in bovine tissue sample by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 33: 33-36.
- López, V.G., J.A. Hernández y E. Sierra. 1997. Diagnóstico post mortem en decomisos sugestivos a tuberculosis en ganado bovino sacrificado en rastros e Baja california. Vet.Mex. 28 (3):235-239.
- López V.G. 2009. Evaluación en Campo de la Vacuna: *Mycobacterium bovis*-BCG contra la Tuberculosis en Ganado Bovino. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán.
- McFadden J.J., Z. Kunze and Seechum P. 1990. DNA probes for detection and identification. Molecular Biology of the Mycobacteria. McFadden ITJ (Ed). Academic Press Ltd, London (UK).
- Martin, S.W., A.H. Meek and P Willeberg. 1987. Veterinary Epidemiology. Principles and Methods. Iowa State University Press, USA. pp: 124-128.
- Menzies F.D. and S.D. Neill. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet. J. 160: 92-106.

- Michel, A.L. 2002. Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 969:251-255.
- Milian S.F., M.D. Salman, C. Ramírez, J.B. Payeur, J.C. Rhyan and M. Santillan. 2000. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. *Am. J. Vet. Res.* 61:86-89.
- Montgomery, R. H. 1999. Mycobacteria in New Zealand. *Surveillance.* 26:6-8.
- Morris R.S., D.U. Pfeiffer and R. Jackson. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections, *Vet. Microbiol.* 40:153–177.
- Mullis K.B. and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase—catalyzed chain reaction. *MeCh. Enzymol.* 155:335-351.
- National Animal Health Monitoring Service (NAHMS). 2007. *Dairy, part 1: reference of dairy cattle health and management practices in the United States.* USDA, APHIS, Veterinary Services, Centers for Epidemiology and Animal Health. Fort Collins, Colo.
- Neill, S. D., J.M. Pollock, D.B. Bryson and J. Hanna. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle, *Vet. Microbiol.* 40:41–52.
- Nishi, J. S., B. T. elkin and T. R. Ellsworth. 2002. The Hook Lake Wood Bison Recovery Project: can a disease-free captive wood bison herd be recovered from a wild population infected with bovine tuberculosis and brucellosis? *Ann N. Y. Acad. Sci.* 969:229-235.
- Norby B., P.C. Bartlett¹, S.D. Fitzgerald, L.M. Granger, C.S. Bruning-Fann, D.L. Whipple, J.B. Payeur. 2004. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:126-131.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995), Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), *Diario Oficial de la Federación*, 03 de Agosto de 1996.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-017-ZOO-2005), Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), *Diario Oficial de la Federación*, 08 de Marzo de 2005.
- Norton J.C. 1904. President's annual address. In: *Proceedings of the 7th Annual Meeting of the Interstate Association of Livestock Sanitary Boards.* St. Louis, Mo, USA. pp. 7–35.

- OIE (World Organization for Animal Health), 2004. Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. Available from: <http://www.oie.int>.
- Olmstead A.L and P.W. Rhode. 2004. An impossible undertaking: the eradication of bovine tuberculosis in the United States. *Journal of Economic History*. 64(3):734–772.
- O'Reilly L.M and C.J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis*. 76 (Suppl. 1) 1–46.
- Palmer M.V. and W.R. Waters. 2011. Bovine Tuberculosis and the Establishment of an Eradication Program in the United States: Role of Veterinarians. *Vet. Med. Int*.
- Palmer M.V., W.R. Waters, T.C. Thacker, R. Greenwald, J. Esfandiari and K.P. Lyashchenko. 2006. Effects of Different Tuberculin Skin-Testing Regimens on Gamma Interferon and Antibody Responses in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol*. 13(3):387–394.
- Phillips C.J.C., C.R.W. Foster, P.A. Morris and R. Teverson. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science*. 74:1–15.
- Pritchard, D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888–1988: Conquest and controversy. *J. Comp. Pathol*. 99:357-399.
- Quinn P.J. and J.D. Collins. 2006. The Effect of Wildlife Reservoirs of *Mycobacterium bovis* on programs for the eradication of Tuberculosis in Cattle in Ireland. In: *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans*. O.C. Thoen, J.H. Steele and M. J. Gilsdorf. Blackwell Publishing. Iowa. p.124.
- Raviglione, M.C., D.E. Snider and A. Kochi. 1995. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 273:220-226.
- Ritacco, V., P. Torres, M.D. Sequeira, A. Reniero and I.N. Kantor. 2006. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean. In: Thoen, Ch., Steele, J.H., Gilsdorf, M.J. (Eds.). *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans*, 2nd ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. In press (Chapter 16).

- Rentería T. and J. Hernández. 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of colostrum and milk. *Prev. Vet. Med.* 27:23-27.
- Rodriguez J.G., G.A. Mejia, P. Del Portillo, M.E. Patarroyo and L.A. Murillo. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*. 141: 2131-2138.
- Schmitt, S. M., D. J. O'Brien, C. S. Bruning-Fann and S. D. Fitzgerald. 2002. Bovine tuberculosis in Michigan wildlife and livestock. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 969:262-268.
- Stamp J.T. 1948. Bovine pulmonary tuberculosis. *J. Comp. Pathol.* 58:9-23.
- Steele, J.H. 1995. Regional and Country Status Report. In: Thoen, C.O., J.H., Steele. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. State university Press. Ames, Iowa. Pp: 162-172.
- Stetter, M.D., S. K. Mikota, A. F. Gutter, E. R. Monterroso, J. R. Dalovisio, C. Degraw and T. Farley. 1995. Epizootic of *Mycobacterium bovis* in a zoologic park. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207:1618-1621.
- Sreevatsan S., X. Pan, K.E. Stockbauer, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, T.S. Whittam and J.M. Musser. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:9869–9874.
- Singh M. and C. Espitia. 2007. Immunological Diagnosis. In: Palomino J.C, S.C. Leão and V. Ritacco. *Tuberculosis 2007 From Basic Science to patient care*. In: www.TuberculosisTextbook.com.
- Suazo, F.M., A.M.A. Escalera and R.M.G. Torres. 2003. A Review of *M. bovis* BCG protection against Tb in cattle and other animal species. *Preventive Veterinary Medicine.* 58:1-13.
- Thoen, C.O. and R.G. Barletta. 2006. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: *Mycobacterium Bovis* infection in animals and humans. Thoen, C.O., Steel J.H. and M.J. Gilsdorf. Blackwell Publishing. Iowa, USA. In press(Chapter 4).
- Tizard, I.R. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. Hipersensibilidad de Tipo IV: Hipersensibilidad retardada. Ed. ELSEVIER. Barcelona, España. p. 366-377.
- Tryland, M. 2000. Zoonoses of arctic marine mammals. *Infect. Dis. Rev.* 2:55-64.

