

Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

Grau de Ciència i Salut Animal

**INFLUENCIA DE *MYCOBACTERIUM AVIUM*
SUBSP *PARATUBERCULOSIS* SOBRE
PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE VACAS
LECHERAS DE ALTA PRODUCCIÓN**

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Alumna:

Laia Picó López

Tutora:

Dra. Irina García-Ispuerto, Departamento de Producción Animal

Cotutora:

Dra. Irene, López Helguera, Departamento de Producción Animal

Lleida, 10 de Julio de 2015

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
2. Objetivo	6
3. Materiales y métodos.....	7
<i>Rebaño y manejo</i>	7
<i>Posparto</i>	7
<i>Inseminación y diagnóstico de gestación</i>	8
<i>Toma de muestras</i>	8
<i>Análisis laboratorial</i>	8
<i>Recogida y análisis de datos</i>	9
4. Resultados.....	10
<i>Análisis de regresión logística</i>	10
<i>Análisis Kaplan-Meier</i>	13
5. Discusión	13
6. Conclusiones.....	17
7. Agradecimientos.....	18
8. Referencias	18

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) sobre parámetros reproductivos en una explotación de vacas lecheras de alta producción. Se detectaron anticuerpos contra MAP mediante un test ELISA en el cual 16,3 % fueron positivas. Mediante un modelo de regresión binaria se vio que la seropositividad frente a MAP no afectó a ningún parámetro reproductivo estudiado (retención de placenta, mastitis, endometritis, quistes ováricos, vacas repetidoras y pérdida de gestación). Se vio que la retención de placenta se veía afectada por el número de lactación y la estación de parto, de manera que las vacas con 4 o más lactaciones tienen 3,7 más de posibilidades de padecer retención placentaria (P=0,000) y, las vacas que parieron en verano sufren 2,7 veces más retenciones de placenta que aquellas que lo hicieron en invierno (P=0,001). La posibilidad de sufrir mastitis solamente se veía afectada por el número de lactaciones, las vacas con 4 o más lactaciones eran 2,6 veces más propensas a sufrir mastitis que las de 3 lactaciones o menos (P=0,000). La endometritis se ve influenciada por la retención de placenta, siendo que aquellas vacas que han sufrido retención de placenta tienen 5,3 veces más de riesgo de padecer endometritis (P=0,000). Los quistes ováricos están vinculados al hecho de sufrir endometritis, las vacas que habían sufrido endometritis tenían 2 veces más de posibilidades de tener quistes ováricos (P=0,032). Las variables que influyeron para que una vaca fuera repetidora eran: la época de parto (P=0,030), tener mastitis (P=0,005), producción lechera (P=0,000) y sufrir pérdidas de gestación (P=0,000). Por último, las pérdidas de gestación se ven influenciadas los quistes ováricos (P=0,003) y por tener una gestación gemelar (P=0,000). En conclusión, la presencia de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* no afecta a la reproducción de las vacas lecheras de alta producción.

Abstract

The aim of this study was to determine the influence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) on reproductive parameters in a farm of high production dairy cows. MAP antibodies were detected by an ELISA test in which 16.3% were positive. Using a binary regression model it was found that the MAP seropositivity did not affect any reproductive parameter studied (retained placenta, mastitis, endometritis, ovarian cysts, repeat breeding and pregnancy loss). Retention of placenta was affected by the number of lactation and calving season. Cows with 4 or more lactations are 3.7 more

likely to have placental retention ($P=0.000$) and the cows that calved in summer suffer 2.7 more times placenta retention than those who did in winter ($P=0.001$). The possibility of suffering mastitis was affected by the number of lactation, cows with 4 or more lactations they were 2.6 times more likely to develop mastitis than 3 lactations or less ($P=0.000$). Endometritis is influenced by placenta retention, being that those cows that have been retained placenta have 5.3 times the risk of developing endometritis ($P=0.000$). Ovarian cysts are linked to endometritis. Cows that had suffered endometritis were 2 times more likely to have ovarian cysts ($P=0.032$). The variables that influenced a repeat breeding were: the time of delivery ($P=0.030$), having mastitis ($P=0.005$), milk production ($P=0.000$) and suffer losses of gestation ($P=0.000$). Finally, pregnancy losses are influenced by ovarian cysts ($P=0.003$) and by having a twin pregnancy ($P=0.000$). In conclusion, the presence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* not affect the reproduction of high producing dairy cows.

1. Introducción

Desde el inicio de la agricultura, el ganado vacuno entre otros rumiantes ha estado muy apreciado debido a su capacidad de convertir el pasto en comida altamente palatable y nutritiva. De hecho, la cría de ganado ha jugado un papel importante en el desarrollo económico desde el Neolítico. Desde 1992 hasta 2013 en Catalunya ha habido una disminución en el número de explotaciones, han desaparecido 3628 explotaciones o lo que es lo mismo un 84% de ellas, sobre todo por el abandono de las pequeñas explotaciones. Las explotaciones que continúan con su producción lechera han aumentado su tamaño tanto en vacas presentes, en el 2006 las vacas presentes/ hectárea era de 2,54 y en 2013 de 3,29, cómo en base territorial, aumentando un 24,7% desde 2006 a 2013, y en mano de obra, aumentando las UTA pero disminuyendo el porcentaje de UTA familiar (Observatori de la llet; informe anual 2013).

En los últimos años la producción lechera ha ido en aumento. En concreto este incremento ha sido de 557 litros por vaca presente y año desde el 2006 al 2013 (Observatori de la llet; informe anual 2013). A pesar de las mejoras tanto en genética cómo en nutrición, la eficacia reproductiva de las explotaciones va disminuyendo año tras año (Pryce and Veerkamp, 2001; López-Gatius, 2003; Pryce et al., 2004) desde la década de los 80. Esta disminución no se puede asociar únicamente al aumento de la producción lechera sino a un origen multifactorial (García-Ispierto and López-Gatius, 2011; Walsh et al., 2011).

Por otro lado, las enfermedades infecciosas también tienen una gran repercusión sobre la eficacia reproductiva de las explotaciones. Debido a la intensificación de la producción, también se incrementa la densidad animal y aumenta el movimiento de animales facilitando así que algunas enfermedades atraviesen barreras geográficas (Rossanigo et al., 2011). Esto, provoca una mayor aparición de enfermedades en las granjas tales como Neosporosis, Diarrea Vídica Bovina, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Paratuberculosis.

La paratuberculosis o enfermedad de Jhone es una infección crónica del tracto gastrointestinal y de distribución mundial, la cual afecta principalmente a los rumiantes (bovino, ovino y caprino, se observa generalmente en el ganado lechero), aunque también puede afectar a caballos, cerdos, entre otros. (Ramírez et al., 2011). Se trata de una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), su identificación es de declaración obligatoria y debe ser notificada a la OIE. Está causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), el cual es un organismo observado por primera vez por Johne y Frothingham en 1895 (OIE *Terrestrial Manual* 2014). MAP es un patógeno intracelular, ácido-alcohol resistente, facultativo y dependiente de micobactina para su crecimiento *in vitro* (Ramírez et al., 2011). Además, la bacteria es resistente al calor, al frío y la desecación, además puede sobrevivir extensos periodos en el suelo y aun más en agua (Whittington et al., 2005; OIE *Terrestrial Manual* 2014).

Las principales fuentes de transmisión de la enfermedad son por vía feco-oral, leche o calostro contaminados con MAP, siendo la ingestión de heces la forma más común de infección. Afecta en mayor medida a los terneros, en especial los más susceptibles a contraer la enfermedad son los menores de 6 meses y, la probabilidad de infección disminuye a medida que aumenta la edad (Soto et al., 2002; Windsor and Whittington, 2010). Además, los animales también se pueden infectar por vía transplacentaria, siendo esta vía menos común (Whittington and Windsor, 2009).

El diagnóstico temprano de esta enfermedad es difícil debido a que tiene un periodo de incubación muy largo (Ramírez et al., 2011). Además, la excreción del microorganismo es intermitente (Soto et al., 2002). El diagnóstico de la paratuberculosis se divide en dos partes: una es el diagnóstico de los síntomas clínicos (enfermedad clínica) y la otra

es la detección de la infección subclínica. Para identificar al agente, se pueden llevar a cabo análisis histopatológicos post-mortem con muestras de intestino y nódulo linfático mesentérico, realizar tinciones Ziehl-Neelsen en frotis de heces o de muestras de la mucosa intestinal, hacer cultivos in vitro o realizar la prueba de PCR que es útil para distinguir el *Mycobacterium avium paratuberculosis* de otro *Mycobacterium*. Para detectar anticuerpos contra MAP, se pueden realizar test ELISA, test de fijación del complemento, test de Inmunodifusión en gel de agar y test de inmunidad mediada por células (Tiwari et al., 2006; OIE *Terrestrial Manual* 2014).

Esta enfermedad causa grandes pérdidas económicas a los ganaderos debido a la disminución de la producción de leche causada por un balance energético negativo en los animales (Meyer and Hall, 1994; Lombard et al., 2005). Las vacas que están infectadas con *M. paratuberculosis*, tienen un mayor riesgo de estar en balance energético negativo debido a la reducción de la absorción intestinal de nutrientes. Esta reducción, está provocada por la enteritis granulomatosa y el engrosamiento de la mucosa, que son característicos de la paratuberculosis, y dan como resultado un síndrome de mala absorción con una enteropatía perdedora de proteínas (Kreeger, 1991). Además, la paratuberculosis también provoca un menor valor de los animales en el matadero (Kudahl and Nielsen, 2009), un aumento en la tasa de mortalidad, siendo esta un 3% superior en los rebaños infectados a (Johnson-Ifearulundu et al., 1999) y, un incremento en la infertilidad y en los días abiertos (Johnson-Ifearulundu et al., 2000).

El mecanismo biológico para el empeoramiento de la reproducción en vacas positivas a paratuberculosis seguramente se debe a la acción indirecta del aumento del BEN. Un balance de energía negativo puede reducir el crecimiento y desarrollo de cuerpos lúteos y resultar en una reducción de la progesterona sérica (Terhune, 1993; Van DeHaar et al., 1995). Debido a estas alteraciones en los cuerpos lúteos, se incrementa el anestro y aumentan los días abiertos (Johnson-Ifearulundu et al., 2000). En el postparto, un balance de energía negativo puede provocar una disfunción ovárica, que producirá un incremento en el intervalo de la primera ovulación, una menor cantidad de folículos y una reducción del crecimiento de los folículos pre-ovulatorios (Terhune, 1993; Britt, 1994). Los folículos pre-ovulatorios que se desarrollan cuando hay un balance negativo de energía producen menos estradiol, resultando en la reducción de la expresión del estro, lo cual puede conducir a una reducida detección del estro (Lucy et al., 1992).

Debido a estos folículos, se incrementa el periodo de anestro postparto, aumentando los días abiertos. Las vacas ELISA positivas tuvieron un incremento de 28 días abiertos en comparación con las ELISA negativas (Johnson-Ifearulundu et al., 2000). Esto, reduciría la eficiencia reproductiva de la explotación a pesar de que la tasa global de concepción podrá no verse afectada. Además, un estudio ha demostrado que la infección por MAP subclínica, medida por ELISA positivo, puede estar asociada con un aumento en la tasa de gestación (Marcé et al., 2009), pero esta asociación va disminuyendo conforme aumenta la edad y el número de lactación.

Aunque algunos artículos han demostrado que ciertos parámetros reproductivos se ven afectados por la paratuberculosis, aún falta mucho por estudiar sobre este tema.

2. Objetivo

Determinar el efecto de la seropositividad frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sobre los parámetros reproductivos de vacas lecheras de alta producción, tales como retención de placenta, mamitis, endometritis, quistes ováricos, tasa de concepción y pérdidas de gestación.

3. Materiales y métodos

Rebaño y manejo

El estudio se realizó en una explotación comercial de vacas lecheras Frisona- Holstein en el noreste de España, con 750 vacas en lactación con una media de producción de 13500 kg. Las vacas parieron durante todo el año, fueron ordeñadas tres veces al día y se alimentaron con raciones completas, en línea con las recomendaciones del NRC (Consejo Nacional de Investigación 2001). Todas las vacas fueron inseminadas con semen de toros de fertilidad probada.

Los programas de vacunación para la prevención de la diarrea vírica bovina (BVD) y la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) también incluyeron el uso de vacunas vivas modificadas para aquellos animales de 6-8 meses de edad. Las vacas gestantes recibieron vacunas muertas (Triangle 4®, BoehringerIngelheim, Barcelona, España) durante el séptimo mes de gestación. Las vacas múltiparas que no estaban gestantes en el día 150 después del parto recibieron una vacuna muerta adicional.

Se analizaron los datos de 491 vacas, de las que se recogieron datos desde el 19 de setiembre de 2013 hasta el 18 de julio de 2014.

Postparto

Los controles postparto implicaron el diagnóstico y tratamiento de las siguientes enfermedades puerperales hasta su remisión o el sacrificio del animal: signos de lesiones en el área genital (laceraciones vaginales o recto-vulvares), enfermedades metabólicas tales como hipocalcemia y cetosis (esta última, diagnosticada durante la primera o la segunda postparto), retención de placenta (membranas fetales retenidas más de 12 horas postparto) y endometritis (inflamación del endometrio sin afectar a las capas restantes del útero, la cual se detecta por la presencia de líquido intrauterino, un diámetro del cuello uterino ≥ 4 cm o un grosor endometrial de $\geq 0,75$ cm. Además, 30-36 días después del parto, se examinó el tracto reproductivo de cada animal mediante ecografía para comprobar la normalidad de la involución uterina y de las estructuras ováricas. Los trastornos reproductivos diagnosticados en ese momento como quistes ováricos o piometras fueron tratados hasta su remisión. La presencia de líquido purulento intrauterino en presencia de un cuerpo lúteo se interpretó como piometra y el

quiste ovárico se diagnosticó cuando se detectó una estructura folicular mayor de 20 mm de diámetro en uno o ambos ovarios con ausencia de cuerpo lúteo.

Las vacas con retención de placenta y endometritis se trataron introduciendo bolos de oxitetraciclina en el útero. Además se administró prostaglandina F2 α (Enzaprost, CEVA Salud Animal, Barcelona, España) al final del tratamiento para la retención de placenta y endometritis y también para tratar la piometra y los quistes ováricos. En el caso de los quistes ováricos, el tratamiento con el agente luteolítico fue posterior a la ruptura manual de la estructura quística a través del recto.

Inseminación y diagnóstico de gestación

El estro fue detectado utilizando podómetros (AfiFarm System; SAE Afikim, Kibbutz Afikim, Israel). Los valores de actividad se registraron en la sala de ordeño (tres veces al día) y se analizaron automáticamente mediante el programa informático de gestión del rebaño. Las vacas fueron inseminadas después de confirmar el estro mediante el examen del tracto genital y del flujo vaginal. El diagnóstico de gestación se realizó por ecografía 28-34 días después de la inseminación artificial. La gestación se confirmó por palpación rectal 90-96 y 180-186 días después de la inseminación. La pérdida fetal se registró cuando la confirmación de la gestación los días 90-96 resultó negativa.

Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena coccígea en tubos de vacío heparinizados (BD VacutainerTM, Becton-Dickenson and Company, Plymouth, UK). Los tubos se centrifugaron (10 min, 1.600 \times g) dentro de los 30 minutos tras su recogida y el plasma se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Análisis laboratorial

Se detectaron anticuerpos contra *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en muestras de plasma mediante un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA) en NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Este ELISA, de la casa IDEEX, incluye una etapa previa de adsorción de los posibles anticuerpos inespecíficos presentes en el plasma. Presenta un formato de cribado y otro de

confirmación de positivos. La especificidad es de 99,6-99,8% y la sensibilidad de 35,3-46,7%.

Recogida y análisis de datos

Para cada animal se registró: número de identificación de la vaca, tipo de técnica diagnóstica realizada y el resultado del análisis (categorizando el resultado en negativo = 0 y positivo = 1), fecha del diagnóstico, fecha de nacimiento de la vaca, nº lactación, estación de parto (invierno (octubre-abril) = 0, verano (mayo-septiembre) = 1), problemas uterinos como retención de placenta, endometritis (0 = ausencia, 1 = presencia), fecha de la endometritis, quistes ováricos (0 = ausencia, 1 = presencia), fecha de los quistes ováricos, mastitis (0 = ausencia, 1 = presencia), fecha de la mastitis, síndrome de la vaca repetidora (0 = 1-3 inseminaciones, 1 = ≥ 4 inseminaciones para quedar gestantes), fecha inseminación gestante, nombre del toro, producción de leche en la fecha de la inseminación gestante (0 = 0-44 litros, 1 = ≥ 45 litros), días abiertos (0 = 0-90 días, 1 = 91-150 días, 2 = ≥ 151 días), gestación gemelar (0 = ausencia, 1 = presencia), pérdida de gestación (<90 días post IA), número de inseminación en la que ocurre la pérdida de gestación, si ésta gestación era gemelar o no (0 = ausencia, 1 = presencia), fecha en la que ha ocurrido la pérdida de gestación.

En la regresión logística binaria, las variables que se analizan y por tanto son dependientes son: retención de placenta, mastitis, endometritis, quistes ováricos, vacas repetidoras y pérdida de gestación. Las variables independientes para las vacas repetidoras son el resultado del análisis frente a fueron las descritas anteriormente.

Se realizó una curva de supervivencia para el tiempo de concepción hasta día 356 para vacas seronegativas y seropositivas frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Los datos se analizaron mediante utilizando el programa informático SPSS versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.) con un nivel de significación de $p < 0,05$.

4. Resultados

En el estudio realizado, la media del número de lactación, número de inseminación gestante y de días abiertos (media \pm desviación estándar) fue de $3,4 \pm 1$, $3,2 \pm 2,3$ y $141 \pm 70,9$ respectivamente. El 16,3% de las vacas eran seropositivas para paratuberculosis (80/491).

Análisis de regresión logística

-Retención de placenta

No se encontró que la seropositividad afectara a la retención de placenta. Basándonos en los Odds ratio, las vacas con 4 o más lactaciones son 3,7 veces más propensas a sufrir una retención de placenta que las vacas con 3 lactaciones o menos. Las vacas que parieron en verano sufren 2,7 veces más retenciones de placenta que aquellas que lo hicieron en invierno (Tabla 1).

Tabla 1. Odds ratio de las variables incluidas en el modelo final de regresión logística de los factores que afectan a la retención de placenta:

Factor	Categoría	n	% retención placenta	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Número de lactaciones	0-3	10/193	5,2	Referencia		
	≥ 4	48/298	16,1	3,7	1,8-7,6	0,000
Estación de parto	Invierno	27/324	8,3	Referencia		
	Verano	31/167	18,6	2,7	1,5-4,7	0,001

R² Nagelkerke = 0,102

-Mamitis

No se encontró que la seropositividad ni la estación de parto afectaran a la mamitis. Basándonos en los Odds ratio, las vacas con 4 o más lactaciones son 2,6 veces más propensas a sufrir mamitis que las de 3 lactaciones o menos (Tabla 2).

Tabla 2. Odds ratio de las variables incluidas en el modelo final de regresión logística de los factores que afectan a la mamitis:

Factor	Categoría	n	% mamitis	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Número de lactaciones	0-3	82/193	42,5	Referencia		
	≥ 4	196/298	65,8	2,6	1,8-3,8	0,000

R² Nagelkerke = 0,069

-Endometritis

No se encontró que la seropositividad, la estación de parto y el número de lactaciones afectaran a la endometritis. Basándonos en los Odds ratio, las vacas que han tenido retención de placenta tienen 5,3 más de probabilidades de sufrir endometritis que las vacas que no la han tenido (Tabla 3).

Tabla 3. Odds ratio de las variables incluidas en el modelo final de regresión logística de los factores que afectan a la endometritis:

Factor	Categoría	n	% endometritis	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Retención de placenta	No	51/433	11,8	Referencia		
	Si	24/58	41,4	5,3	2,9-9,6	0,000

R² Nagelkerke = 0,094

-Quistes ováricos

No se encontró que la seropositividad, la estación de parto, número de lactación y retención de placenta afectaran a los quistes ováricos. Basándonos en los Odds ratio, las vacas que han tenido endometritis tienen 2 veces más de probabilidades de sufrir quistes ováricos que las vacas que no han padecido endometritis (Tabla 4).

Tabla 4. Odds ratio de las variables incluidas en el modelo final de regresión logística de los factores que afectan a los quistes ováricos:

Factor	Categoría	n	% quistes ováricos	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Endometritis	No	50/416	12	Referencia		
	Si	16/75	21,3	2	1-3,7	0,032

R² Nagelkerke = 0,016

-Vacas repetidoras

No se encontró que la seropositividad, el número de lactación, la retención de placenta, los quistes ováricos y la endometritis afectaran a que una vaca sea repetidora. Basándonos en los Odds ratio, las vacas que han parido en verano tienen 1,6 veces más de probabilidades de ser una vaca repetidora que las que han parido en invierno. Aquellas vacas que han sufrido mamitis tienen 1,9 más de probabilidades de ser repetidoras que aquellas que no han tenido mamitis. Las vacas que producen 45 litros o más de leche tienen 0,1 menos de probabilidades de ser una vaca repetidora de las que producen entre 0 y 44 litros. Las vacas que han sufrido una pérdida de gestación tienen

3,9 más de probabilidades de ser repetidoras que las que no han perdido la gestación (Tabla 5).

Tabla 5. Odds ratio de las variables incluidas en el modelo final de regresión logística de los factores que afectan a las vacas repetidoras:

Factor	Categoría	n	% vacas repetidoras	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Estación de parto	Invierno	137/416	32,9	Referencia		
	Verano	33/75	44	1,6	1,1-2,6	0,030
Mamitis	No	60/213	28,2	Referencia		
	Si	110/278	39,6	1,9	1,2-3	0,005
Leche producida	0-44	129/214	60,3	Referencia		
	≥45	41/277	14,8	0,1	0,1-0,2	0,000
Pérdida de gestación	No	123/422	29,1	Referencia		
	Si	47/69	68,1	3,9	2,1-7,2	0,000

R² Nagelkerke = 0,353

-Pérdida de gestación

No se encontró que la seropositividad, la estación de parto, el número de lactación, la retención de placenta, la mamitis y la endometritis afectaran a que una vaca sufriera una pérdida de gestación. Basándonos en los Odds ratio, las vacas que han tenido quistes ováricos tienen 2,6 más de probabilidades de perder la gestación que una vaca que no ha tenido quistes, y aquellas vacas que han tenido una gestación gemelar tienen 4,8 más probabilidades de sufrir una pérdida de gestación que las que tienen una gestación simple (Tabla 6).

Tabla 6. Odds ratio de las variables incluidas en el modelo final de regresión logística de los factores que afectan a la pérdida de gestación:

Factor	Categoría	n	% Pérdida de gestación	Odds ratio	Intervalo de confianza 95%	p
Quistes ováricos	No	50/425	11,8	Referencia		
	Si	19/66	28,8	2,6	1,4-5	0,003
Gestación gemelar	No	38/402	9,5	Referencia		
	Si	31/89	34,8	4,8	2,7-8,4	0,000

R² Nagelkerke = 0,141

Análisis Kaplan-Meier

La figura 1 es la curva de supervivencia para el tiempo de concepción hasta día 356 para vacas seronegativas y seropositivas frente a *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. El resultado no fue significativo ($P=0,913$).

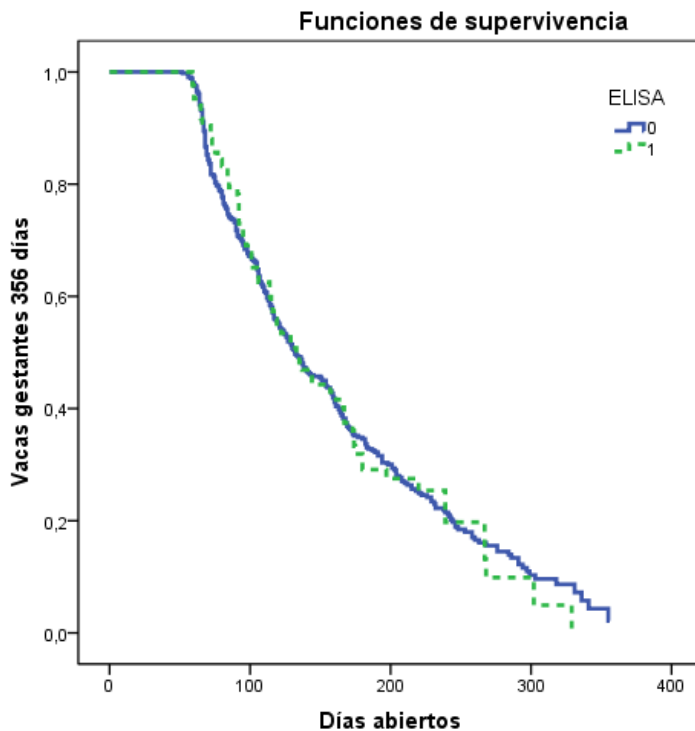


Figura 1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para el tiempo de concepción hasta día 356 para vacas seronegativas (0) y seropositivas (1) frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Log Rank $p = 0,913$).

5. Discusión

En el presente estudio, se han obtenido resultados que indican que no hay una influencia de MAP sobre los parámetros reproductivos en vacas lecheras de alta producción. Este resultado no es el esperado, ya que está ampliamente descrito que la paratuberculosis aumenta el BEN (Johnson-Ifearulundu et al., 2000). A su vez, el BEN afecta negativamente a los parámetros reproductivos, tanto a la ciclicidad, la fertilidad como a las pérdidas de gestación (Terhune, 1993; Van DeHaar et al., 1995; Johnson-Ifearulundu et al., 2000).

El efecto de la paratuberculosis sobre la reproducción sigue sin tenerse claro. Algunos autores (Terhune, 1993; Johnson-Ifearulundu et al., 2000; McKenna et al., 2006) demuestran el empeoramiento reproductivo de los animales. Por ejemplo Johnson-Ifearulundu et al., (2000), determinó un incremento de 28 días abiertos en las vacas seropositivas en comparación con las seronegativas. Por el contrario, un estudio ha demostrado que la infección por MAP subclínica, puede estar asociada con un aumento

en la tasa de gestación (Marcé et al., 2009). Esto puede ser debido a que en este estudio se utilizaron animales con infección subclínica, los cuales fueron sacrificados antes de que apareciera ningún signo clínico, por lo que no tendrán un BEN tan pronunciado como las vacas con enfermedad clínica.

Los resultados en este estudio se contradicen con los autores que afirman que la fertilidad disminuye en vacas infectadas por MAP. Las diferencias obtenidas pueden ser debidas al buen manejo de las granjas altamente productoras, como es el caso de la explotación analizada en la que para llegar a estos niveles de producción el manejo debe ser extraordinario. Aparte del manejo, las diferencias pueden ser debidas al método de diagnóstico utilizado, ya que, durante las primeras etapas de la enfermedad la excreción del microorganismo es intermitente (Soto et al., 2002), y por lo tanto el diagnóstico mediante PCR en heces no es muy efectivo. Por otro lado, la técnica de ELISA que es la más utilizada, tiene una baja sensibilidad (Nielsen and Toft, 2006) con lo cual puede haber más falsos negativos.

En este estudio se observó que la retención de placenta se veía afectada por el número de lactación y la estación de parto. Aquellas vacas con un número de lactación superior mostraron un mayor riesgo de sufrir retención de placenta, tal y como demostraron otros autores (Hossein-Zadeh and Ardalan, 2010). En nuestro estudio, aquellas vacas que parieron en verano son las que tenían más posibilidad de tener una retención placentaria, cosa que coincide con la mayoría de estudios que se han realizado sobre este tema (DuBois and Williams, 1980; Gaafar et al., 2010), aunque se contradice con lo reportado por Hossein-Zadeh and Ardalan (2010), Markusfeld (1984) y Wetherill (1965) que informaron que la mayor incidencia de retención de placenta ocurre en aquellas vacas que parieron en invierno. Según Wetherill (1965), el cambio de la alimentación de invierno a una alimentación verde es una de las razones, para la reducción de la incidencia de retención de placenta en verano en comparación con el invierno.

En lo que respecta a la endometritis, en este estudio se ha visto que solamente se ve influenciada por la retención de placenta, siendo que aquellas vacas que han sufrido retención de placenta tienen un mayor riesgo de sufrir endometritis. Esto ya ha sido demostrado por otros autores (LeBlanc, 2008; Recce et al., 2014). La endometritis, se asocia con la foliculogénesis anormal, incluyendo el desarrollo de quistes ováricos y

anestro prolongado (Opsomer et al., 2000; Mateus et al., 2002). Por eso mismo, esta fue un factor de riesgo para la endometritis.

Aquellas vacas que paren en verano tienen más probabilidades de ser una vaca repetidora que las que han parido en invierno. Las vacas más productoras, en este caso que producen 45 litros o más, tienen menos posibilidades de ser una vaca repetidora. Esto ya fue demostrado por López-Gatius et al., (2006), sus resultados indicaron que individualmente una alta producción de leche está relacionada con una alta fecundidad. Por otro lado, Gustafsson and Emanuelson (2002) describieron que una vaca sea una gran productora es un factor de riesgo para ser repetidora. Lo encontrado por este autor, puede ser en parte debido a la disposición de los productores de leche a invertir más inseminaciones en vacas de alta producción antes de tomar la decisión de sacrificarlas. Las pérdidas de gestación también influyen en que una vaca sea repetidora, ya que como se ha descrito anteriormente una vaca repetidora es aquella a la que se le insemina más de tres veces y, por lo tanto al perder la gestación se la vuelve a inseminar y así aumenta el número de inseminaciones realizadas. Además, sufrir mamitis es un factor de riesgo para que las vacas sean repetidoras igual que lo demostraron Gustafsson and Emanuelson (2002). Según Scott et al., (1999) cuando la mamitis clínica ocurre después de la primera inseminación la vaca tiene un 50% menos de probabilidades de quedar gestantes.

La mamitis solamente se ve afectada por el número de lactaciones de las vacas, lo que concuerda con lo reportado por Breen et al. (2009). Se cree que esto es debido a que estas vacas tienen un mayor tiempo de exposición del orificio del pezón a los patógenos que causan la mamitis, y esto aumenta la probabilidad de entrada de los mismos. Además, el sistema inmunológico de las vacas viejas podría no ser tan eficiente como el de las vacas jóvenes y esto contribuir a un aumento en la tasa de infección.

Por último, las pérdidas de gestación se ven influenciadas por tener quistes ováricos y por tener una gestación gemelar. La gestación gemelar ha sido descrita como el factor principal de naturaleza no infecciosa relacionada con la pérdida de gestación en rebaños de alta producción (López-Gatius et al., 2009).

Por último, se vio que no había diferencias significativas entre vacas positivas y negativas frente a MAP en los días abiertos. Esto es contrario a otros autores que afirman que cuando una vaca es positiva aumentan los días abiertos (Ifearulundu et al., 2000), debido a que el BEN reduce el crecimiento y desarrollo de cuerpos lúteos. Por el

contrario, un estudio ha demostrado que la infección por MAP subclínica, puede estar asociada con un aumento en la tasa de gestación y por tanto una menor cantidad de días abiertos (Marcé et al., 2009).

Las diferencias encontradas en este estudio en comparación a los de otros autores, sugieren que aún estamos lejos de saber y entender el funcionamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, aún es necesario realizar más estudios en vacas altas productoras.

6. Conclusiones

La presencia de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* no afecta a la reproducción de las vacas lecheras de alta producción.

7. Agradecimientos

Querría expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que, gracias a su colaboración, han contribuido a la realización de este trabajo fin de grado:

En primer lugar, deseo expresar mi gratitud a Irina García-Ispierto, tutora de este proyecto, por su consejo, ayuda y dedicación durante el desarrollo de este trabajo.

A Irene López Helguera, cotutora de este trabajo, por enseñarme como analizar los datos y gracias a la cual me ha sido posible ir a granja a recogerlos.

Finalmente, a la explotación de ganado vacuno lechero estudiada por permitirme realizar este estudio, mejorar mi conocimiento de la realidad de los sectores productivos y hacer de mis días en granja unos días muy agradables y valiosos.

8. Referencias

Breen, J., Green, M., Bradley, J., 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *Journal of dairy Science* 92, 2551-2561.

Britt, J.H., 1994. Follicular development and fertility: potential impacts of negative energy balance. *Proceedings, National Reproduction Symposium, Pittsburgh, PA*, 103-112.

DuBois, P.R., and Williams, D.J., 1980. Increased incidence of retained placenta associated with heat stress in dairy cows. *Theriogenology* 13(2), 115-121.

Gaafar, H.M.A., Shamiah, Sh.M., Shitta, A.A., Ganah, H.A.B., 2010. Factors affecting retention of placenta and its influence on postpartum reproductive performance and milk production in Friesian cows. *Slovak Journal of Animal Science* 43(1), 6-12.

García-Ispierto, I., and López-Gatius, F., 2011. Factores que afectan a la fertilidad del vacuno lechero de alta producción. *Mundo ganadero* 241, 36-40.

Gutasfsson, H., and Emanuelson, U., 2002. Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43(2), 115-125.

Hosseini-Zadeh, N.G., and Ardalan, M., 2011. Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows. *Veterinary Research Communications* 35, 345-354.

Johnson-Ifeorlundu, Y., Kaneene, J.B., Lloyd, J.W., 1999. Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 822-825.

Johnson-Ifeorlundu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W., 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 46, 171-181.

- Kreeger, J.M., 1991. Ruminant paratuberculosis-a century of progress and frustration. *Journal of veterinary Diagnostic Investigation* 3, 373-383.
- Kudahl, A.B., and Nielsen, S.S., 2009. Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92(9), 4340-4346.
- LeBlanc, S.J., 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Veterinary Journal* 176(1), 102-114.
- Lombard, J.E., Garry, F.B., McCluskey, B. J., Wagner, B. A., 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1975-1981.
- López-Gatius, F., 2003. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 60, 89-99.
- López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Santolaria, P., Yániz, J., Nogareda, C., López-Béjar, M., 2006. Screening for high fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 65(8), 1678-1689.
- López-Gatius, F., Szenci, O., Bech-Sàbat, G., García-Ispuerto, I., Serrano, B., Santolaria, P., Yániz, J., 2009. Factors of non-infectious nature affecting late embryonic and early foetal loss in high producing dairy herds in north-eastern Spain. *Magyar Allatorvosok Lapja* 131, 515-531
- Lucy, M.C., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Erickson, P.S., Cleale, R.M., Firkins, J.L., Clark, J.H., Murphy, M.R., Brodie, B.O., 1992. Influence of diet composition, dry matter intake, milk production, and energy balance, on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Animal Production* 54 (3), 323-331.
- Marcé, C., Beaudeau, F., Bareille, N., Seegers, H., Fourichon, C., 2009. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 71, 807-816.
- Markusfeld, O., 1984. Factors responsible for post-parturient metritis in dairy cattle. *Veterinary Record* 114, 539-542.
- Mateus, L., da Costa, L.L., Bernardo, F., Silva, J.R., 2002. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 31-35.
- McKenna, S.L.B., Keefe, G.P., Tiwari, A., VanLeeuwen, J., Barkema, H.W., 2006. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne* 47, 1089-1099.
- Meyer, A.L., and Hall, H.H., 1994. Economic analysis of the impact of paratuberculosis on the Kentucky cattle industry. Department of Agricultural Economics, University of Kentucky. Staff paper #343.

Nielsen, S.S., and Toft, N., 2006. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* 89(2), 569-579.

Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., de Kruif, A., 2000. Risk factors for post partum in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53, 841-857.

Pryce, J.E., Royal, M.D., Garnsworthy, P.C., Mao, I.L., 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86, 125-135.

Pryce, J.E., Veerkamp, R.F., 2001. The incorporation of fertility indices in genetic improvement programmes. *BSAS Occasional Publication* 26, 237-250.

Ramírez, N., Rodríguez, B., Fernández, J., 2011. Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 16(3), 2742-2753.

Recce, S., Russi, N., Massera, A.F., Signorini M.L., 2014. Identificación de factores de riesgos asociados a la presentación de endometritis en bovinos lecheros. *Avances en Ciencias Veterinarias* 29(1), 23-28.

Rossanigo, C. E., Bengolea, A., Sager, R. L., 2011. Patologías emergentes de la intensificación bovina en la región semiárida-subhúmeda del centro de la Argentina. *Información técnica. EEA San Luis*, 179.

Scott, H., Loeffler, S.H., de Vries, M.J., Schukken, Y.H., 1999. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82(12), 2589-2604.

Soto, J.P., Kruze, J., Leiva, S., 2002. Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. *Archivos de Medicina Veterinaria* 34(2), 253-263.

Terhune, A.F., 1993. The association of preovulatory follicular events with morphology and progesterone of corpora lutea in heifers fed high or low energy diets. M.S. Thesis. Michigan State University, Michigan, 1-20, 57-62.

Tiwari, A., VanLeeuwen, J.A., McKenna, S.L., Keefe, G.P., Barkema, H.W., 2006. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal* 47(9), 874-882.

Van DeHaar, M.J., Sharma, B.K., Fogwell, R.L., 1995. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-I in liver and corpus luteum of heifers. *Journal of Dairy Science* 78, 832-841.

Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans A.C.O., 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science* 123, 127-138.

Wetherill, G.D., 1965. Retained placenta in the bovine - a brief review. *The Canadian Veterinary Journal* 6, 290-294.

Whittington, R.J., and Windsor, P.A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal* 179(1), 60-69.

Whittington, R.J., Marsh, I.B., Reddacliff L.A., 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9), 5304-5308.

Windsor, P.A., and Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veterinary Journal*, 184(1), 37-44.