



FALLA DE ORIGEN
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILAN

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

FALLA DE ORIGEN
"DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA
MEDIANTE LA PRUEBA DOBLE COMPARATIVA Y
DETECCION DEL INTERFERON GAMMA EN UN
HATO DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE
EN EL ESTADO DE MEXICO".

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

HECTOR MIGUEL MORENO VAZQUEZ

ASESORES:

M. en C., FERNANDO DIAZ OTERO

M.V.Z., RAFAEL PEREZ GONZALEZ

M.V.Z., JOSE ANTONIO LICEA VEGA

CUAUTILAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.B. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"Diagnóstico de tuberculosis bovina mediante la prueba doble comparativa y detección de interferón gamma en un hato de bovinos productores de leche en el Estado de México".

que presenta el pasante: Hector Miguel Moreno Vázquez
con número de cuenta: 8758800-2 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 9 de junio de 1995

PRESIDENTE	MVZ. Luis Navarro Morales	
VOCAL	MVZ. Javier Hernández Balderas	
SECRETARIO	MVZ. Rafael Pérez González	
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Silviano Trejo Nuñez	

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por permitirme llegar hasta donde estoy ahora y seguir adelante, porque nunca me ha dejado desfallecer, ya que su energía es infinita y llena todo.

A mi Padre: Hector Ernesto, por su amor, cariño, confianza y gran paciencia hacia mi persona, y por no dejar nunca de ser mi padre, mi maestro y principalmente y lo más importante Mi Amigo, bendito seas.

A mi Madre: María Teresa; por su comprensión, su abnegado amor, por ser mi guía y apoyo ante las vicisitudes de la vida y lo mejor y más importante de todo, nunca dejarme claudicar. Bendita sea.

A mis Hermanos: Adriana Margarita, Alma Xochitl, Zentictl Beatriz y Ulises Raymundo por su amor, cariño, respeto, apoyo incondicional y por ser mis mejores amigos, benditos sean.

A mis asesores: Dr. Fernando, Dr. Rafael y Dr. Antonio por todo el tiempo que usaron en apoyo a este trabajo, para darle la calidad y esmero, muchas gracias.

A mis compañeros: Por darme su apoyo, un poco de su tiempo, muchos y agradables momentos y su colaboración incondicional y permanente; Ciro, Victor Leyva, Alejandro Martínez, Blanca Moreno, Leticia Torres, German, Antonia, Lenia, Juan, Enrique.

A mis profesores: Por sus muchos o pocos conocimientos que ayudaron a transformar mi mucha y completa ignorancia en algo tangible y realizable.

A los animales: Por su condición de carácter y nobleza, envidiables valores a imitar.

A la Universidad (FES-C / UNAM): Por permitirme formarme en ella profesionalmente al hacer uso de sus instalaciones. Gracias.

Al INIFAP: Por darme la oportunidad de trabajar dentro de su laboratorio de tuberculosis y hacer uso de sus materiales para la elaboración de este trabajo. Gracias.

ÍNDICE

	Página
I.- RESUMEN	5
II.- INTRODUCCIÓN	7
2.1 Definición de Tuberculosis	7
2.2 Etiología	7
2.3 Epidemiología	9
2.4 Patogenia	10
2.5 Signos Clínicos	11
2.6 Lesiones	13
2.7 Transmisión	15
2.8 Inmunología de la Tuberculosis	15
2.9 Diagnóstico	18
III. Y IV.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS	23
V.- MATERIAL Y MÉTODOS	24
VI.- RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
VII.- DISCUSIÓN	40
VIII.- CONCLUSIONES	43
IX.- BIBLIOGRAFÍA	44

I RESUMEN

Para el diagnóstico de tuberculosis tanto en humanos como en bovinos, se ha tenido limitaciones grandes en cuestión de las técnicas, ya que éstas han mostrado ser ineficientes tanto en especificidad como en sensibilidad para la detección de anticuerpos para antígenos micobacterianos esto por un lado; y por el otro tenemos como pueden ser afectadas las pruebas de evaluación de inmunidad celular por estar presentes antígenos comunes a otras micobacterias, corynebacterias, actinomicetos y nocardias. El objetivo de este trabajo fue el de concordar la prueba de intradermorreacción (IDR)(in vivo) con la prueba de detección del interferón-gamma (IFN-G)(in vitro), ambas pruebas, utilizando PPD bovino y aviar, como antígenos. Se utilizaron 90 bovinos hembras Holstein-Friesian divididos por lotes de 30 animales (3 lotes) de acuerdo a su producción lechera. Todas estas hembras fueron sangradas en presencia de anticoagulante, se colocó 1.5 ml de sangre completa en 3 diferentes pozos (pozo # 1 control, pozo # 2 PPD bovis y pozo # 3 PPD avium). Se incubaron 24 hrs. a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 20 min. Con el plasma se realizó una prueba de ELISA para la detección de interferón-gamma para Mycobacterium bovis (IDEXX, Maine EE.UU) por anticuerpos monoclonales. Los valores de corte que se utilizaron entre Mycobacterium bovis/Mycobacterium avium para animales preferentemente sensibles al PPD bovino fue de 1.8 de absorbancia. Para considerar que el animal fue más sensible al PPD avium el valor de corte fue considerado como menor o igual a 0.7. Los resultados muestran que en los animales positivos a la IDR, del Lote A graficados de acuerdo a la interpretación estándar, el 93.33 % se encontraron sobre la pendiente de positividad, cuando estos mismos animales fueron evaluados por IFN-G, mostraron un 83.33 % hacia la positividad de dicha prueba. Con respecto a los animales negativos comprobados por IDR y graficados, se encontró un 6.66 % sobre la pendiente de la de negatividad y estos mismos animales analizados por IFN-G mostraron una similitud del 16.66 %. Con respecto al Lote B encontramos un 56.66 % de positivos a la IDR utilizando el mismo método que en lote anterior, y estos mismos animales por IFN-G dieron de resultado un 16.66 % de similitud. Por otro lado los animales negativos nos dieron a la prueba de IDR un 43.33 % sobre la

pendiente de negatividad, y al hacer uso de la IFN-G nos resultó un 83.33 % de similitud. Por último al trabajar el Lote C en animales positivos a la IDR nos resultó en un 40 % y al IFN-G nos dió un 36.66 % en cuestión de similitud. Y al observar los animales negativos nos topamos con 60 % a la prueba de IDR y de un 63.33 % al IFN-G en su similitud. El uso de este método de diagnóstico, en la campaña de control y erradicación de la tuberculosis, puede dar apoyo para dicho fin.

II INTRODUCCION

2.1 DEFINICIÓN DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, debilitante y progresiva que ocasionalmente puede asumir un curso águo rápidamente progresivo. Fué descrita hace más de 2000 años, y las lesiones halladas en las momias egipcias prueban que atacaba al hombre desde mucho antes. Como es natural, tanto en la antigüedad como en la edad media hubo gran confusión con otras enfermedades, confusión que persistió hasta la mitad del siglo XIX. Muchos autores afirman que la enfermedad era infecciosa, otros la consideraban como una forma de tumor maligno y no infecciosa, hasta que se descubrió el agente causal y los experimentos realizados disiparon todas las dudas acerca de su naturaleza. (5,22,23,24,26). Ahora se sabe que existen diversos tipos de bacilos tuberculosos responsables de la enfermedad en los animales. El tipo bovino, Mycobacterium bovis (M. bovis) está estrechamente relacionado con el tipo humano y algunos lo consideran una subespecie de M. tuberculosis. El tipo aviario M. avium difiere de los tipos encontrados en los mamíferos en muchos aspectos y produce principalmente enfermedad en los pájaros, generalmente no es patógeno para el hombre ni para los animales domésticos.(5,24,26,59).

2.2 ETIOLOGIA

Mycobacterium bovis es la causa más frecuente de tuberculosis en el ganado bovino. Son bacilos Gram positivos, no ramificados, relativamente, cortos, delgados, ácido-resistentes e inmóviles.y que desdoblan azúcares por oxidación. Son además aerobios obligados que crecen mejor en atmósfera de 3 a 10 % de dióxido de carbono y a la temperatura óptima de 37°-38°C en medios complejos que contengan yema de huevo y harina de papa. Las colonias de M. bovis son redondas, lisas e irregulares tras una incubación de 3 a 6 semanas y con un crecimiento discreto ("crecimiento disgónico").(5,9,44).

No forma esporas pero tiene resistencia moderada al calor, desecación y muchos desinfectantes. Es destruido fácilmente por la luz directa del sol a menos que se encuentre en ambiente húmedo. En un ambiente cálido, húmedo y protegido puede permanecer viable durante periodos muy prolongados.(5,41).

No se ha demostrado sean capaces de producir exotoxinas; ni la forma com producen la enfermedad. Tiene una concentración elevada de lípidos 20 a 40 % del peso seco, que es en gran medida responsable de su capacidad de resistir a los mecanismos de defensa humoral y a los desinfectantes ácidos y álcalis; sin embargo, los fenoles (5 %), la sosa (3 %) y ácidos cresílicos son considerablemente eficaces. (9).

La pared celular gruesa de la micobacterias es rica en ácido micólico, un polisacárido de arabinogaláctanas y otros lípidos complejos que la hacen hidrofóbica e impermeable a las tinciones acuosas sin calor. En la tinción de Ziehl-Neelsen se aplica calor.(9,22,26). Algunos de los lípidos específicos son los siguientes:

-Ac. micólico: Origina la fijación ácida; propiedad de retener carbol-fucsina luego de aplicar el decolorante alcohol-ácido.(9).

-Cera D: Mucósido que aumenta la respuesta inmunológica. La cera D y diversas proteínas inducen hipersensibilidad tardía.(9).

-Mucósidos: Tipo colonia; permeabilidad celular (resistencia a enzimas hidrosolubles, antibióticos, desinfectantes, etc.).(9).

-Glicolípidos: Toxicidad, respuesta granulomatosa.(9).

Características bioquímicas: Es muy compleja, pero, da catalasa positiva y metabolismo respiratorio.(9).

Como nota especial podemos decir que el M. tuberculosis tiene entre su gran material

lípidos de superficie uno conocido como 6,6'-dimicocillorehalosa que ha sido aislado y denominado "factor cuerda", debido a que su presencia produce que el organismo crezca en forma de cuerdas en el cultivo líquido. Es abundante en cepas virulentas y su remoción las torna avirulentas, y se piensa que puede contribuir a la virulencia del organismo pero no es el único factor involucrado.(22,26).

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

Se observa tuberculosis en todos los países del mundo y adquiere importancia especial en el ganado lechero. Puede ocurrir el padecimiento en todas las especies, incluyendo al humano, y es de suma importancia por razones de salud pública, así como su efecto nocivo en la producción de los animales. En bovinos el animal infectado es la principal fuente de infección. Los microorganismos son eliminados en aire expirado, esputo, heces (procedentes de lesiones intestinales y del esputo deglutido, que a su vez deriva de lesiones pulmonares), leche, orina, secreciones vaginales, uterinas y de ganglios linfáticos abiertos. La entrada suele efectuarse por inhalación (principal fuente de contagio), cuando los animales permanecen en establos; o ingestión cuando los animales permanecen en campos de pastoreo y contaminan los alimentos y el agua común de bebida. En condiciones naturales, el agua estancada puede producir infección hasta 18 días después de haber hecho uso de la misma un animal tuberculoso. Puede aislarse M. tuberculosis viable de las heces de bovinos infectados y de terreno en contacto con ellas durante 6 a 8 semanas, después de la depositación del microorganismo, pero la duración de la capacidad infecciosa de M. bovis depositado en pasto para bovinos susceptibles es sumamente variable.(5,22,24,26).

La ingestión de la leche infectada por animales jóvenes es uno de los métodos más frecuentes de diseminación de la tuberculosis.(5,57). Como vía menos común cabe citar la infección intrauterina durante el coito, por uso de semen infectado o de una inseminación contaminada o de pipetas uterinas, y la infección intramamaria por empleo de copas de máquinas de ordeño infectadas. El albergue de los animales predispone a la

enfermedad, lo mismo que el pastoreo a bajas temperaturas, de modo que es más frecuente y más grave donde se realizan dichas prácticas de cría.(5,57,59).

2.4 PATOGENIA

La enfermedad de tuberculosis tanto en el ganado vacuno como en el hombre inicia con la formación de un foco primario que se encuentra en los pulmones en un 90 % de los casos. El drenaje linfático del foco primario en los mamíferos lleva a la formación de lesiones caseosas en el correspondiente ganglio linfático, y esta lesión junto con el foco primario, es conocida como "complejo primario". Este complejo primario rara vez cura en los animales, pero puede progresar lentamente o rápidamente. (40,41,42,57).

Donde quiera que los microorganismo se localicen, su actividad estimula la formación de masas de tipo tumoral llamadas tubérculos. Por el crecimiento continuo de los microorganismos, estos tubérculos aumentan de tamaño. Conforme los granulomas crecen, se produce necrosis de sus porciones centrales. Finalmente éstas son reducidas a masas caseosas que tienden a calcificar. En los mamíferos, los tubérculos pueden quedar encerrados en tejido fibro denso, y la enfermedad queda detenida. Cuando la enfermedad progresa, el tubérculo aumenta de tamaño, frecuentemente se rompe e infecta los tejidos contiguos. Cuando los bacilos escapan del foco primario, viajan por las corrientes de los vasos sanguíneos y linfáticos, se alojan en otros órganos y tejidos y establecen otros tubérculos. La forma aguda de generalización, conocida como tuberculosis miliar, es fatal. Si entran pequeños números de bacilos en la circulación a partir del complejo primario, se forma una o más lesiones aisladas en otros órganos. Estas lesiones generalizadas pueden volverse encapsuladas y seguir siendo pequeñas durante largos períodos de tiempo, generalmente sin causar signos detectables.(19,20,40,41,42,57).

2.5 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos que se presentan varían de acuerdo con la distribución de los tubérculos en el cuerpo, en general el curso de la enfermedad es crónico. Las lesiones pequeñas, localizadas en los ganglios linfáticos profundos, pueden no dar signos clínicos, pero los ganglios superficiales aumentados de tamaño proporcionan un signo diagnóstico útil. Los signos generales son debilidad, anorexia o apetito caprichoso, emaciación, actitud de indiferencia, apatía, aspecto del tegumento rugoso o liso y fiebre fluctuante.(14,19,20,24,55).

La tuberculosis pulmonar se manifiesta por una tos seca, y que más tarde se hace más frecuente, dolorosa, y húmeda. En casos avanzados la respiración está acelerada y es dificultosa, incluso acompañada de gemidos. Especialmente es notable la disnea después de los esfuerzos físicos así como en clima caluroso-húmedo, aumentando hacia el final de la enfermedad. La auscultación de los pulmones da en parte respiración vesicular intensificada, en parte debilitada; en algunas regiones puede faltar por completo, de manera tal que solo se escucha la respiración bronquial. Cuando las lesiones tuberculosas son avanzadas, en las áreas afectadas se perciben rales secos o húmedos.(22,26,40,41,42,48).

Los animales padecen una tos entrecortada y violenta que después se hace dolorosa y frecuente a medida que progresa la enfermedad y al final es débil y húmeda. Las dificultades respiratorias son cada vez mayores en el curso de la enfermedad. Los animales bajan la cabeza, sacan la lengua y lanzan quejidos o ronquidos al respirar. Los miembros torácicos y en especial los codos, aparecen desviados hacia afuera.(40,41,42,48,61).

La tuberculosis de la pleura, al igual que la del pericardio, provoca notables sonidos de frote. En la pericarditis tuberculosa no suele ser sincrónicos con los tonos cardíacos. (5,48,61).

La hiperplasia tuberculosa de los ganglios linfáticos mediastínicos, puede causar timpanismo redicivo por su presión sobre el esófago o sobre el nervio vago, mientras que la afección grave de los ganglios de la entrada del tórax, puede causar éstasis venosa (ingurgitación) de las venas yugulares.(14,22,26,48,61).

La enfermedad de la mucosa nasal se comprueba por el flujo mucoso-purulento y por los nódulos o úlceras que hay sobre ella y alcanzan el tamaño de 1.5 cm; simultáneamente están agrandados los ganglios linfáticos laríngeos, en los que incluso pueden palpase pequeños nódulos.(22,26,29,48,53,61).

En animales jóvenes de 1 a 3 años de edad, ocasionalmente se presenta una estenosis parcial de la cavidad faríngea (ruidos roncantes) a causa de un hiperplasia tuberculosa de uno o ambos ganglios linfáticos faríngeos.(22,26,48,61).

Los trastornos respiratorios se pueden deber también a procesos tuberculosos ubicados en la laringe o tráquea, percibiéndose entonces rales o sonidos más silbantes. Según la ubicación y extensión de las modificaciones, una disnea de este tipo puede intensificarse hasta provocar asfixia. Además, regularmente hay tos fuerte y dolorosa, incluso espasmódica. Los granulomas tuberculosos ubicados en el interior de la laringe causan hiperplasia o asimetría de ésta. Apoyando sobre ella la mano, se nota un temblor durante la inspiración. Es más raro que también esté afectada la voz del animal; incluso puede faltar completamente (afonía).(14,22,26,40,41,42,48,53).

En la palpación rectal a veces se comprueban en el lado derecho de la cavidad abdominal formaciones nudoso-firmes del tamaño de una papa, que corresponden a los ganglios linfáticos mesentéricos tuberculosos.(22,26,48).

Las eventuales modificaciones tuberculosas en los ganglios linfáticos sacros, lumbares o iliacos mediales, pueden palpase desde el recto.(22,48,57).

2.6 LESIONES

En los bovinos tuberculosos los órganos torácicos, es decir los pulmones y los ganglios linfáticos broncomediastínicos, son los más frecuentemente afectados. El complejo primario se compone aquí de varios nódulos, de hasta el tamaño de 2 cm, muchas veces caseificados, que sobresalen de la superficie de un lóbulo grande o en otra parte bien ventilada del pulmón. Las lesiones surgidas por generalización precoz consisten en numerosos tubérculos típicos, del tamaño de 1 a 2 mm, o un número reducido de nódulos del tamaño de 1.5 cm al de 2 cm, que muchas veces ya están caseificados o pueden estar delimitados por tejido conectivo.(48,53,57,61).

En la tuberculosis crónica de los pulmones. el tejido pulmonar normal o grupos de lobulillos modificados por neumonía, en parte parciales y en otras repartido por todo el órgano, aparecen nódulos del tamaño de 1 a 2 mm al de 1.5 cm a veces aislado, y otras veces conglomerados. Por la confluencia de estos pequeños nódulos se forman focos firmes del tamaño de un puño, lobulados, que están bien circunscritos y delimitados por el tejido sano. Más tarde estos nódulos se caseifican; en casos muy avanzados puede haber formación de cavernas. Si en esto hay focos tuberculosos en ganglios linfáticos regionales, entonces provienen del período de infección primaria, reconociéndose como tales por la edad de las lesiones.(22,26,36,41,42,48,53,57).

Si en relación con la tuberculosis pulmonar crónica se produjo la generalización tardía, en la necropsia hay una neumonía caseosa. Entonces, los focos caseosos tienen un tamaño variado y su superficie de corte está salpicada de puntos hemorrágicos y es amarillo-ópaca. Cerca de las modificaciones caseosas puede haber tubérculos miliares aislados o agrupados, en los ganglios linfáticos aparecen las lesiones exudativas correspondientes.(36,41,42,48).

En los casos abiertos o activos, la presencia de bronconeumonía o hiperemia en torno a las lesiones pulmonares constituye índice indudable de enfermedad activa.(5,40).

Las lesiones cerradas son netamente discretas y nodulares y poseen material caseoso espeso, anaranjado o amarillo, con frecuencia calcificado o rodeado de una cápsula fibrosa gruesa. (5,40,41,42).

El pus tiene color crema o anaranjado característico, y su consistencia varía de la crema espesa a la del queso grumoso. (5,41,42).

La cuestión microscópica está primordialmente relacionada con los tubérculos los cuales se desarrollan de esta forma: después de penetrar al cuerpo los microorganismos, se localizan en el tejido. Su presencia ocasiona necrosis del tejido y una infiltración de neutrófilos. Posteriormente, los macrófagos empiezan a aparecer y es posible que sean atraídos por productos de la respuesta inmune específica, tales como las linfocinas, y acaban con los desechos de las células. Otro tipo de células que entra en acción son las células gigantes de tipo Langhans, que están formadas por células epitelioides, ya sea por fusión o por desarrollo constante y multiplicación de los núcleos, sin división del citoplasma; es muy común observar bacilos tuberculosos en el citoplasma de estas células a medida que crece la masa tuberculosa. (22,26,51). Los últimos en aparecer son los linfocitos y leucocitos que también emigran al lugar de la infección y contribuyen a la infiltración celular. Este tubérculo joven consta de un centro compuesto de neutrófilos, macrófagos muertos, bacterias destruidas y bacterias extracelulares vivas. El núcleo del tubérculo se compone de micobacterias, células epitelioides, células gigantes y linfocitos. El centro caseoso necrótico de la lesión se va ensanchando según se activan los mecanismos de coagulación y se trombosan los capilares, arteriolas y vénulas. Posteriormente el tubérculo es encapsulado por los fibroblastos, los cuales, maduran y se convierten en células adultas del tejido conectivo fibroso. Como resultado de la acción tóxica del microorganismo, se presenta la necrosis caseosa central. En ausencia del fermento proteolítico elaborado por los neutrófilos el tejido necrótico caseoso permanece en forma sólida. La calcificación de los tubérculos tiene lugar en el hombre y el ganado vacuno, pero rara en otras especies domésticas. (22,26,51).

2.7 TRANSMISIÓN

La tuberculosis se transmite principalmente por vía aerógena, debido al contacto directo de los animales sanos e infectados (4,5,40,48), en donde, tanto el hombre como el ganado vacuno, al toser arrojan gotitas que contienen bacilos tuberculosos y que flotan un tiempo en el aire húmedo, que los animales inspiran. Así también los agentes eliminados en excretas que se encuentran en el suelo del establo, pueden llegar al aire con el polvo ambiental y ser inhalados.(22,26,48,57).

En terneros o bovinos jóvenes la principal vía de transmisión es la enterógena (5,40,48), debido a la contaminación del calostro y leche infectadas con grandes cantidades de bacilos tuberculosos (22,26,48,57). La vía enterógena también puede ocurrir en adultos cuando el agua de bebida y los alimentos se encuentran contaminados por las secreciones de los animales tuberculosos(5,22,26,40,41,48,57).

Otra de las vías de transmisión de la tuberculosis en terneros es la intrauterina (hematógena).(5,40,48).

2.8 INMUNOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

Desde el decenio pasado se descubrió que este fenómeno de la intradermoreacción (tuberculina) se debe a la inmunidad celular. (22,26).

La infección inicial por M. bovis sensibiliza una gran cantidad de linfocitos T específicamente contra los antígenos de este microorganismo. Durante una exposición posterior o reexposición, al bacilo, estos linfocitos T específicos y de memoria proliferan y producen linfocinas, las cuales, entre otras propiedades útiles, tienen la capacidad de activar a los macrófagos.(5,22,26,59).

Una vez que las bacterias han penetrado en los tejidos, los macrófagos de animales normales (no enfermos) pueden fagocitar rápidamente a la micobacteria, pero sin destruirla, permitiendo que ésta se reproduzca intracelularmente. En contraste, los macrófagos de animales tuberculosos pueden ser activados mediante linfocinas para destruir al bacilo con más efectividad. A pesar que esta cadena de eventos inicia con la interacción específica entre los linfocitos T y los antígenos del bacilo tuberculoso, la mayor capacidad bactericida de los macrófagos no es específica; esto es, los macrófagos activados tienen mayor cantidad de lisosomas y son capaces de destruir a otras bacterias intracelulares facultativas, tales como Brucella y Listeria. (22,26,59).

Los macrófagos transportan a los bacilos por los vasos linfáticos aferentes a los ganglios linfáticos regionales. La interacción bacilos-macrófagos conduce a la movilización de los granulocitos y a la formación de células gigantes. Esta reacción celular constituye la base estructural del granuloma tuberculoso con objeto de fijar y localizar el proceso infeccioso. (24,26,31,39,44,65).

La activación de los macrófagos es de corta duración, persistiendo sólo unas cuantas semanas, a menos que dicha activación se mantenga por una estimulación subsecuente de células T o de liberación de linfocina causada por la presencia de las bacterias de M. bovis virulento o de una cepa vacunal viva modificada que producirán una inflamación crónica de larga duración; por lo que dicha estimulación continua y prolongada de tipo quimiotáctico hace que lleguen nuevos macrófagos y fibroblastos, y que se deposite un exceso de colágena en torno al foco de irritación. La lesión desarrollada de esta manera se llama "granuloma".(18,22,26,43,59,65).

Las lesiones tisulares resultantes, así como el curso que adopte el proceso, depende de la virulencia del agente etiológico y de la susceptibilidad y respuesta inmunitaria del huésped. Se trata de una reacción tisular a la que el huésped debe, en el mejor de los casos, la encapsulación del bacilo con la formación de los característicos tubérculos (forma productiva) en el llamado complejo primario completo (órgano y ganglio linfático regional) o incompleto (solo el ganglio linfático). Si la respuesta inmunitaria es deficiente,

el complejo primario puede proseguir su desarrollo para dar origen a una forma infiltrativa y difusa o exudativa, con la propagación de la infección a los tejidos vecinos o con la generalización.(24,26,31,39,40,44,65).

En el curso de la infección con el bacilo tuberculoso, el huésped se sensibiliza a los antígenos del microorganismo y desarrolla hipersensibilidad tardía contra estos antígenos. Estos se demuestran con facilidad mediante la positividad a la prueba cutánea de la tuberculina y que en este caso se restringen al sitio local donde se depositó la tuberculina, y que sirve para reconocer el estado de la inmunidad celular y se emplea por su gran valor diagnóstico en la vigilancia de animales infectados y sensibilizados o libres de tuberculosis. El nombre de hipersensibilidad tardía o retardada, se le da por que necesita por lo menos de 24 horas después de que se administra el antígeno para que la respuesta alcance su máxima intensidad (22, 24, 26, 27, 31, 39, 40, 44, 50, 65). Es una reacción inmunitaria resultante del reconocimiento de un antígeno, por los linfocitos T sensibilizados y conducen sin la participación de los anticuerpos a una lesión tisular, la cual se caracteriza por un eritema y una induración-histológicamente, está formada por células mononucleadas: linfocitos y sobre todo monocitos y macrófagos.(26,51,59).

Durante la reacción inflamatoria, los linfocitos T sensibilizados liberan sustancias biológicamente activas llamadas linfocinas y la aparición de linfocitos T citotóxicos. Las linfocinas atraen a los macrófagos, los cuales fagocitan al antígeno inoculado y finalmente lo destruyen desapareciendo así el estímulo, para que continúe la producción de linfocinas, con lo cual los tejidos vuelven al estado normal. Las linfocinas actúan sobre diversas poblaciones celulares, que de manera general permiten regular las actividades celulares, entre ellas interleucina 2 (IL-2), la cual produce la proliferación de clonas de células; tanto de linfocitos T y células NK de las cuales se deriva una glucoproteína conocida como interferón-gamma (IFN-G), el cual en el presente trabajo será de vital importancia ya que su activación es fundamental para el desarrollo de resistencia frente a ciertos microorganismos intracelulares patógenos, en particular M. bovis, los anticuerpos no pueden dar protección contra estos microorganismos. Sin embargo, durante la evolución de las infecciones por esos agentes, se estimula una respuesta de inmunidad

mediada por células en la cual los linfocitos T liberan IFN- γ . Este provoca que los macrófagos aumenten de tamaño, movilidad y actividad metabólica. Aumentando también el número de sus receptores Fc (Factor cristalizante), con lo que se intensifica la fagocitosis.(36,59,65).

2.9 DIAGNOSTICO

Prueba Doble Comparativa Cervical: (IDR Intradermorreacción)

En ocasiones los bovinos reaccionan a la prueba de tuberculina cuando se usa PPD bovino (PPD o DPP = derivado proteico purificado bovino o aviar), sin estar infectados, como una respuesta inespecífica, ya que la inmunidad generada por micobacterias es inespecífica. Es por esto que se usa simultáneamente PPD aviar y, de este modo se puede determinar si el animal tiene tuberculosis.(5,11,14,37,53).

a) La zona más adecuada para el sitio de inoculación de PPD, es el tercio medio del cuello. En el caso de la prueba comparativa con tuberculinas PPD bovino y aviar, ambas se aplican aproximadamente a 12 cm de distancia entre si. Se debe depilar previamente la zona y medir el espesor de la piel con un vernier, antes de la inoculación intradérmica.(5,11,37,53).

b) La tuberculina aviar debe inocularse aproximadamente a 10 cm por debajo de la cresta del cuello y la tuberculina bovina más abajo, sobre una línea paralela a la espina de la escápula(11,37)

c) Se emplea una jeringa de prueba tuberculínica con su respectiva aguja, cuidando siempre de emplear una para la tuberculina bovina y otra distinta para la tuberculina aviar.(5,11,14,37).

d) Las dosis a emplear en la prueba doble comparativa son:

- Tuberculina PPD de M. bovis (1 mg/ml), 1 dosis = 0.1 mg /0.1 ml.
- Tuberculina PPD de M. avium (1 mg/ml), 1 dosis = 0.1 mg/0.1 ml. (24,36).

e) La lectura de la prueba se efectúa a las 72 horas (+/- 6 horas) después de la inoculación. Se mide con un vernier el espesor de la piel en el sitio inoculado y, se registra la diferencia obtenida, gráficamente de acuerdo a las normas establecidas por la campaña contra la tuberculosis (ver anexo).

Prueba de detección del interferón gamma: (IFN-G Interferón Gamma)

Los interferones modulan la actividad de casi todos los componentes del sistema inmunitario, reforzando la capacidad del organismo para sofocar los ataques de la mayoría de los agentes causantes de enfermedad: parásitos, bacterias y virus. Los interferones pueden promover o inhibir la diferenciación de diversas células y pueden inhibir la división celular, lo que explicaría en parte por que atentan contra la proliferación de tumores.(31,33,59).

Los linfocitos T supresores (CD8), estimulados estos por el IFN-G, inhiben la reproducción de anticuerpos por los linfocitos B; los interferones también retrasan la síntesis de ciertas citocinas en otras células.(59).

Un método alternativo para el diagnóstico de TB bovina, se relaciona con la identificación y cuantificación del IFN-G en plasma obtenido después de haber estimulado sangre completa con PPD bovino y aviar durante 24 horas.(49,63,64).

Este ensayo detecta IFN-G bovino liberado en respuesta a un antígeno específico en un sistema de cultivo de sangre completa, el cual utiliza dos anticuerpos monoclonales para el IFN-G bovino biológicamente activo.(49,63,64). En investigaciones recientes se describe el desarrollo de la prueba de IFN-g como un método in vitro simple y rápido para

el diagnóstico de TB; esta prueba ha sido evaluada experimentalmente y en campo con resultados bastante alentadores.(63, 64).

Diagnóstico diferencial:

Se debe realizar un diagnóstico diferencial principalmente con enfermedades que tienen lesiones o signos similares a la tuberculosis, entre estas encontramos a la paratuberculosis causada por M. johnei (bacilo de Jonhe), la cual se asemeja con M. bovis por causar una emaciación gradual del animal. Otra enfermedad es la actinomicosis cuya etiología es Actinomyces bovis y cuya semejanza con M. bovis es la producción de abscesos; este microorganismo causa una enfermedad subaguda o crónica progresiva caracterizada por lesiones granulomatosas supurativas, duras que involucran tanto al hueso como a tejidos blandos principalmente de la mandíbula, por lo que el animal deja de comer debido a la inflamación y dolor, y enflaquece gradualmente; rara vez se observan casos de orquitis, mastitis y lesiones en hígado y otros órganos.(9, 57).

Con Nocardia asteroides (antes N. farcinica o N. farcinicus) por ser ácidorresistente, aerobio y desdoblar azúcares por oxidación. Esta infección se inicia como una pústula o nódulo que endurece, se rompe, supura y forma abscesos adicionales. En bovinos afecta ganglios linfáticos subcutáneos, preescapulares y poplíteos que aumentan de tamaño por producir abscesos; rara vez afectan pulmones y otros órganos. Principalmente relacionada con mastitis aguda y crónica con lesiones granulomatosas por lo que se pide realizar un diagnóstico diferencial con mastitis tuberculosa. Conocida como muermo bovino es de tipo linfadenitis; por lo que también se hará este diagnóstico diferencial con corynebacterium pseudotuberculosis, que en bovinos es sumamente rara la afección por este microorganismo.(9, 57).

Criterios de Interpretación, Prueba Doble Comparativa.

LECTURAS	CRITERIO ESTANDAR	CRITERIO ESTRICTO
$B (+) > 4 > A (+)$ $B (+), A (-)$	POSITIVO	POSITIVO
$B (+) = 3 \text{ ó } 4 > A (+)$	SOSPECHOSO	POSITIVO
$B (+) = 1 \text{ ó } 2 > A (+)$	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
$B (+) = 1 \text{ ó } 2 < A (+)$ $B (+) = A (+)$	NEGATIVO	SOSPECHOSO
$B (-), A (+ \text{ ó } -)$ $B (+) > 2$	NEGATIVO	NEGATIVO

B = Tuberculina bovina.

A = Tuberculina aviar.

> = Mayor que (mm.)

< = Menor que (mm.)

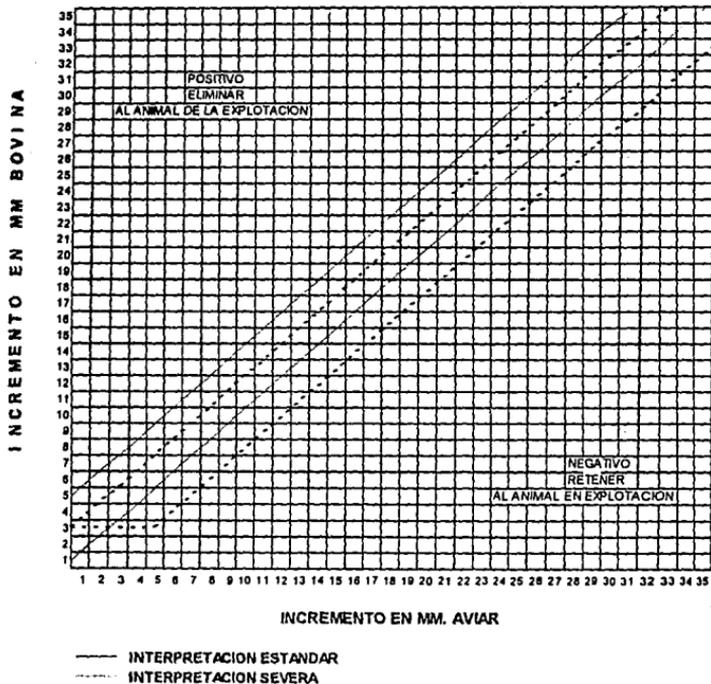
Todas las medidas realizadas pre y post inoculación de los PPD bovino y aviar son en milímetros (mm.). Nos indica el criterio estandar que:

- Si la medición a las 72 horas de la zona de inoculación del PPD bovino es mayor por cuatro mm. o mas a la de PPD aviar el animal se considera positivo.
- Si la medición a las 72 horas de la zona de inoculación de PPD bovino es igual que uno o cuatro mm mayor que la medida de PPD aviar el animal será considerado sospechoso
- Si la medición a las 72 hrs. de la zona de inoculación del PPD bovino es igual uno o dos mm menor que la del PPD aviar el animal será clasificado como negativo, aunado a esto que el animal no tenga reacción alguna, esto es que quede la medida postinoculación igual que la de preinoculación.



Tuberculosis bovina y Brucelosis

INTERPRETACION DE LA PRUEBA CERVICAL COMPARATIVA



III OBJETIVOS

a) Realizar el diagnóstico de tuberculosis bovina mediante el uso de la prueba doble comparativa cervical en un hato de bovinos productores de leche.

b) Realizar el diagnóstico de tuberculosis bovina mediante la detección del interferón-gamma (IFN-G) en los mismos bovinos productores de leche.

c) Establecer la concordancia que existe entre los resultados obtenidos en las pruebas de tuberculina doble comparativa vs. detección de IFN-G en animales positivos y negativos a ambas pruebas.

IV HIPÓTESIS

a) Los animales positivos a la prueba de intradermorreacción (tuberculinizados con PPD tanto bovino como aviar) serán positivos a la prueba de detección del interferón-gamma.

b) Los animales negativos a la prueba de intradermorreacción serán positivos a la prueba de IFN-G.

c) Los animales positivos a la prueba de intradermorreacción serán negativos a la prueba de IFN-G.

V MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

90 bovinos de la raza Holstein-Friesian, divididos por lotes de 30 animales:

LOTE "A": 30 hembras Holstein-Friesian, de 2 o más partos y más de 100 días de lactancia.

LOTE "B": 30 hembras Holstein-Friesian, de primer parto y más de 100 días de lactancia.

LOTE "C": 30 hembras Holstein-Friesian, de reemplazo con edad de 14 a 16 meses.

Manejo del hato:

Las condiciones de manejo del hato son explotadas en forma intensiva y tecnificada. Cuenta con diferentes corrales para su adecuada lotificación de acuerdo a la producción láctea, y cada uno cuenta con bebedero, comedero y cama de arena con techado de acuerdo a las condiciones ambientales del Valle de México, 19° 51' 25" latitud norte, 98° 59' 8" longitud oeste, clima Bs Kw, precipitación total anual 624.9 mm, temperatura media anual 16.3°C. Cuenta con asesoría técnica en el área de reproducción, nutrición y programa sanitaria (mastitis y reproducción).

Reactivos:

1. Derivado Proteico Purificado de Mycobacterium avium.
(PRONABIVE).
2. Derivado Proteico Purificado de Mycobacterium bovis.
(PRONABIVE).
3. Placas ELISA recubiertas con anticuerpos contra el Interferón (IFN) gamma bovino.(con 96 pozos).
4. Control positivo IFN-Gamma bovino liofilizado, en tampón con estabilizantes proteicos.
5. Control negativo muestra no reactiva hacia el IFN-Gamma bovino.
6. Concentrado para lavado (10x) conservado con gentamicina.
7. Conjugado peroxidasa de rábano (HRPO); anticuerpo contra el IFN-Gamma bovino, en tampón con estabilizantes proteicos.
8. Concentrado de TMB (tetrametilbencidina).
9. Diluyente para TMB -tampón citrato-fosfato que contiene agua oxigenada.
10. Solución de paro -ácido fluorhídrico diluido.

Materiales requeridos no proporcionados en el juego de prueba IDEXX.

1. Espectrofotómetro para placas de 96 pozos, con capacidad para lectura de la absorbancia a 650 nm.(650 nanómetros).
2. Pipetas de precisión de 0.01, 0.10 y 1.0 ml, o pipeteadores de canales múltiples.
- 3.- Puntas de pipetas desechables.
- 4.- Agua destilada o desionizada.
- 5.- Tubos vacutainer con heparina sódica en concentración final de 15 unidades por ml.
- 6.- Estufa de incubación.
- 7.- Rasuradora de pelo para animales.
- 8.- Jeringas (inglesas) de tuberculina con sus respectivas agujas.

Prueba de Detección de Interferón Gamma

Esta prueba se hizo utilizando un producto comercial llamado Mycobacterium bovis gamma-Interferon Test Kit, Herd Chek, IDEXX, producido en USA. (Juego de prueba para el Gamma-Interferón en respuesta al Mycobacterium bovis). Este es un análisis por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), el cual detecta IFN-G bovino en plasmas, obtenidos de muestras completas de sangre de bovino, previamente estimulas con PPD; tal y como es descrita en el manual del productor. Se usó sangre heparinizada, obtenida de cada vaca (90 para ser exactos), con tubos con vacío, en los mismo días en que se realizó la prueba de IDR con la inoculación de PPD .

La sangre obtenida se incubó en placas de 24 pozos, en las 16 horas posteriores a su recolección durante 24 horas a 37°C, dividiéndose cada muestra en tres (1.5 ml en cada pocillo de la placa de 24 por vaca trabajada), en el primer pocillo con PPD bovis, en el segundo con PPD aviar esta para identificar reacciones inespecíficas al PPD de Mycobacterium bovis y en el tercero sin PPD (control).

Posteriormente se extrajo el plasma por pipeteo con pipetas de precisión, y se analizó cada una de las 3 muestras para verificar si el IFN-G bovino se encontraba presente, de la forma siguiente:

Se agregó plasma de cada una de las muestras (100 microlitros) en la placa de microtitulación, en diferentes pozos; cada placa esta recubierta con anticuerpos monoclonales específicos para el IFN-G bovino, posteriormente se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora; aquí, el IFN-G si es que llegase a existir, formó un complejo con los anticuerpos monoclonales inmovilizados en el recubrimiento.

Después de incubadas se retiró el líquido contenido y se desechó, luego se lavó cada pozo 4 veces con 300 microlitros de solución de lavado, posterior al último lavado se retiró el líquido y se secó la placa golpeando suave pero firmemente sobre un material absorbente.

Posterior a ello se adiciono 100 microlitros de conjugado HRPO anticuerpos monoclonales contra el IFN-G, y se incubó durante 30 minutos a temperatura medio ambiente, estos anticuerpos agregados se unen al IFN-G ligado a los anticuerpos monoclonales inmóviles del recubrimiento.

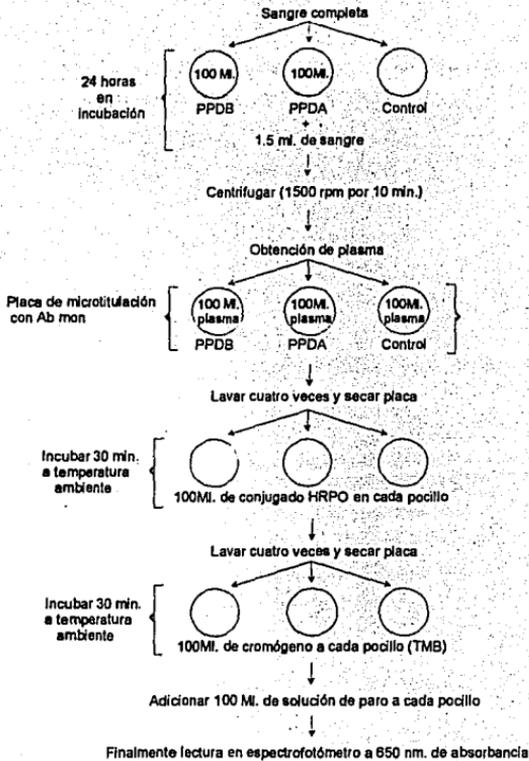
Ya pasado el tiempo, se extrajo el líquido contenido y se desechó; se volvieron a lavar los pozos de las placas 4 veces con 300 microlitros de solución de lavado, después del último lavado se extrajo el líquido y se golpeó la placa suave pero con firmeza sobre un material absorbente.

Ya lavada y secada la placa se le agregaron 100 microlitros de sustrato enzimático (cromógeno llamado tetrametilbencidina más agua oxigenada) a cada pozo, y se incubó durante 30 minutos a temperatura medio ambiente.

Ya terminada la incubación se adicionaron 100 microlitros de solución de paro a cada pozo, para detener la reacción enzimática que se estaba dando.

Por último la placa se leyó en un espectrofotómetro, utilizando un filtro de 650 nanómetros (650 nm) de absorbancia, y usando aire como blanco.

Diagrama de Flujo de la Prueba de IFN-G



Interpretación de Resultados de la prueba de IFN-G

Para que el análisis sea válido, la diferencia entre el promedio de los controles positivos (CPx) (P-N) debe ser mayor o igual que 0.500, y el promedio de los controles negativos debe ser menor o igual que 0.250. Si la prueba no es válida, debe sospecharse que hubo un error en la técnica, y el análisis debe repetirse.

Determine el valor limite para cada animal. Para hacerlo, agregue 0.100 al valor de A(650) del tubo 1. La presencia o ausencia del gamma-interferón bovino se determina mediante la relación del valor de A(650) del tubo 2 con el valor limite para cada animal. El valor de A(650) del tubo 1 generalmente se encuentra dentro de (+/-) 0.100 unidades de absorbancia del promedio para los controles negativos.

De vez en cuando, el valor de A(650) del tubo 1 (control) es elevado, lo cual indica la presencia de gamma-interferón natural en la sangre. En este caso, se debe tomar una muestra del animal en una fecha posterior y repetir el análisis. Si el valor de A(650) para el tubo 2 es menor que el valor limite (tubo 1 + 0.100), la muestra se clasifica como NEGATIVA para el gamma-interferón bovino.

Si el valor limite de A(650) para el tubo 2 es mayor o igual que el valor limite, la muestra se clasifica como POSITIVA para el gamma-interferón bovino, el resultado debe compararse con el resultado para el tubo 3.

Si la relación $\frac{A(650) \text{ del tubo 2}}{A(650) \text{ del tubo 3}}$ es mayor que 1.8, debe considerarse que el animal es preferentemente SENSIBLE al PPD de Mycobacterium bovis.

Como alternativa, si la relación $\frac{A(650) \text{ del tubo 2}}{A(650) \text{ del tubo 3}}$ es menor o igual que 0.7, debe considerarse que el animal es preferentemente SENSIBLE al PPD de Mycobacterium avium.

VI RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Prueba de IDR y Concordancia de Resultados de Ambas Pruebas (IDR E IFN-G).

Se realizó el cálculo de los resultados, obteniendo la diferencia entre la medida inicial y la segunda (a las 72 hrs.); para clasificar a los animales utilizados, se hizo uso de la gráfica de interpretación de esta prueba utilizando el criterio estándar, elaborado por la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina en México, por la Dirección de Campañas Zoonositarias (24,45).

CUADRO 1: Resultados de los 3 lotes de animales, en los cuales se presenta los totales de cada lote con sus porcentajes tanto positivos como negativos a la intradermorreacción.

LOTE	ANIMALES (+)	(%)	ANIMALES (-)	(%)
A	28	(93.33 %)	2	(6.66 %)
B	17	(56.66 %)	13	(43.33 %)
C	12	(40 %)	18	(60 %)

En el cuadro número 1 se representan numéricamente, los animales (90 animales) positivos (+) y negativos (-) y sus equivalencias en porcentajes a la prueba de IDR de los 3 lotes manejados, y de los cuales se dan la información o características siguientes:

- **LOTE A:** 30 hembras Holstein-Friesian de 2 ó más partos y más de 100 días de lactancia.
- **LOTE B:** 30 hembras Holstein-Friesian de primer parto y más de 100 días de lactancia.
- **LOTE C:** 30 hembras Holstein-Friesian de 14 a 16 meses de edad.

Se realizó un conteo de los 90 animales (30 por lote respectivamente) con las pruebas de IDR e IFN-G, para establecer la concordancia de los resultados de ambas

pruebas; y así establecer un mejor y más amplio criterio para la eliminación de animales tuberculosos.

CUADRO 2: Resultados de los 3 lotes de animales en los cuales se presenta por separado el número de animales que concordaron a ambas pruebas (IDR e IFN-G) tanto positivos como negativos.

LOTE	NUMERO DE ANIMALES QUE CONCORDARON A LAS PRUEBAS DE IDR E IFN-G TANTO POSITIVOS (+) COMO NEGATIVOS (-).
A	DE 25 ANIMALES = 24 CONCORDARON (+) Y 1 (-)
B	DE 18 ANIMALES = 5 CONCORDARON (+) Y 13 (-)
C	DE 25 ANIMALES = 9 CONCORDARON (+) Y 16 (-)

Explicación de resultados del cuadro 2

El Lote A cuenta con un 83.33% de concordancia entre los resultados de IDR e IFN-G. Existe un 3.33% más de sensibilidad ya que detectó un animal negativo a IDR y de resultado positivo a IFN-G. Ahora hay un 13.33% de diferencia ya que detectó a 4 animales como negativos a IFN-G, lo cual nos sugiere que se de la posibilidad de que estos hayan reaccionado positivamente a IDR por alguna respuesta inmune cruzada. Evitando el desecho de estos animales; hasta confirmarlos.

En el Lote B se encontró un 60% de concordancia (18 animales) y un 40% diferentes entre IDR e IFN-G, lo cual nos indica que existen 12 animales como probables falsos positivos a IDR, ya que la especificidad de la prueba de IFN-G nos lo reporta como negativos. Motivo por el cual estos 12 animales no serian causa de desecho bajo el criterio de la campaña de control y erradicación de la tuberculosis.

Por último en el Lote C, en este grupo existe una concordancia de un 83.33% en las pruebas realizadas (IDR e IFN-G), lo cual nos habla de una sensibilidad en la prueba de

IFN-G bastante confiable. Además contamos con un 10% más de sensibilidad, ya que nos detectó a 3 animales negativos a IFN-G y positivos a IDR, los cuales se considerarían como falsos positivos a IDR. Así como también nos detectó un 6.66% de falsos negativos a IDR ya que resultaron positivos a IFN-G.

Resultados: Análisis Estadístico de χ^2 (ji cuadrada) y Tablas de Contingencia.

Contrastes de significación:

En la práctica, las frecuencias esperadas se calculan sobre la base de una hipótesis H_0 . Si bajo tal hipótesis el valor calculado para χ^2 dado por (1) ó (3) es mayor que algún valor crítico (tal como $\chi^2_{.95}$ ó $\chi^2_{.99}$, que son los valores críticos de los niveles de significación 0.05 y 0.01 respectivamente), debemos concluir que las frecuencias observadas difieren "significativamente" de las frecuencias esperadas y rechazaremos H_0 al correspondiente nivel de significación; en caso contrario, la aceptaremos (o al menos no la rechazaremos). Este procedimiento se llama el "test" o "contraste ji cuadrado" de hipótesis o significación.

Hay que hacer constar que las circunstancias en las que χ^2 sea "demasiado próximo a cero", pues es raro que las frecuencias observadas coincidan "demasiado bien" con las frecuencias esperadas. Para examinar tales situaciones, podemos determinar si el valor calculado de χ^2 es menor que $\chi^2_{.05}$ ó $\chi^2_{.01}$, en cuyo caso hablaremos de decidir que el acuerdo es "demasiado bueno" al nivel de significación 0.05 ó 0.01, respectivamente.

Se utilizó el modelo estadístico de las tablas de contingencia para ji cuadrada (χ^2), en este trabajo por permitirnos un mejor análisis de los resultados obtenidos en las pruebas de intradermorreacción y detección de interferón-gamma. Ahora se dará conocimiento de como están distribuidos los resultados en las tablas de contingencia y el uso de la fórmula para determinar que hipótesis de las planteadas (3 para ser exacto: dos verdaderas y una nula) se aceptará según el resultado final de acuerdo a la ji cuadrada de tablas* (3.84) y por consiguiente cual no.

Los números o cantidades colocadas en las tablas de contingencia son el resultado de los siguiente:

A) Animales que fuerón positivos a las pruebas de intradermorreacción (IDR) y detección de interferón-gamma (IFN-G) (cuadro superior de la izquierda).

B) Animales que fuerón negativos a las pruebas de IDR y detección de IFN-G (cuadro inferior derecho).

C) Animales que fuerón positivo-negativo (IDR + \ IFN-G -) o negativo-positivo (IDR - / IFN-G +), a las pruebas de intradermorreacción y detección de interferón-gamma (cuadros superior derecho e inferior izquierdo).

D y E*) Estos números son el resultado de la sumatoria de los cuadrados de la tabla de contingencia, tanto horizontal como verticalmente* y después su propia sumatoria nos da el número con el cual iniciamos a aplicar la fórmula; la cual es:

$$\text{Fórmula: } \chi^2 = \frac{(O_j - E_j)^2}{E_i}$$

Ejemplo:

Lote A:

	IDR +	IDR -	
IFN	A)	C)	
GAMMA +	24	5	29 D) *
IFN	C)	B)	
GAMMA -	5	1	6 D) *
	29	6	35
	D) *	D) *	E) *

*: χ^2 de tablas = 3.84. Si $\chi^2 > \chi^2$ calculada = Ho. Si $\chi^2 < \chi^2$ calculada = Hi.

$$(29)(29) / 35 = 24.02 \text{ ***** } (6)(29) / 35 = 4.97$$

$$(29)(6) / 35 = 4.97 \text{ ***** } (6)(6) / 35 = 1.02$$

$$\frac{(24 - 24.02)^2}{24.02} + \frac{(5 - 4.97)^2}{4.97} + \frac{(5 - 4.97)^2}{4.97} + \frac{(1 - 1.02)^2}{1.02}$$

$$0.0000166 + 0.000181 + 0.000181 + 0.00039 = 0.00077$$

Se acepta Ho, el resultado es independiente del tratamiento:

Lote A: $\chi^2 > \chi^2$ calculada = Ho.

Lote B: $\chi^2 > \chi^2$ calculada = Ho.

Lote C: $\chi^2 < \chi^2$ calculada = Hi.

CUADRO 3: Cuadro de porcentajes finales individuales de los 3 lotes de animales trabajados por las pruebas de IDR e IFN-G.

	IDR +	IFN-G +	IDR -	IFN-G -
Lote A (Hembras de dos o más partos)	93.33 %	83.33 %	6.66 %	16.66 %
Lote B (Hembras de primer parto)	56.66 %	16.66 %	43.33 %	83.33 %
Lote C (Hembras de 14 a 16 meses de edad)	40 %	36.66 %	60 %	63.33 %

Lote A: Fueron reactoras positivas a tuberculosis bovina por prueba de IDR en un 93.33% y como negativas el resto (6.66%); estos mismos animales fueron para la prueba de IFN-G 83.33% positivos y el resto negativos (16.66%).

Lote B: Resultaron positivas a tuberculosis bovina en 56.66% por la prueba de IDR y negativas el resto (43.33%); con la prueba de IFN-G el 16.66% de estas mismas vacas dio positivo y las demás negativas (83.33%).

Lote C: Se detectaron como positivas a tuberculosis bovina un 40% por la prueba de IDR y negativas las restantes (60%); a la prueba de IFN-G el 36.66% de estas hembras dio positivo, y negativas las demás (63.33%).

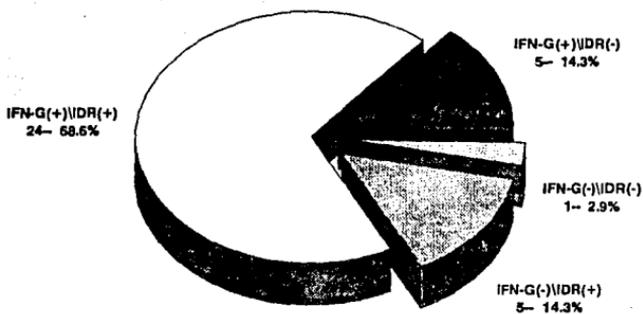


Fig. 1 Concordancia de las pruebas de IFN-G e IDR de 30 animales de 2 o más partos.

Lote A: Fueron reactoras positivas a tuberculosis bovina por prueba de IDR en un 93.33% y como negativas el resto (6.66%); estos mismos animales fueron para la prueba de IFN-G 83.33% positivos y el resto negativos (16.66%).

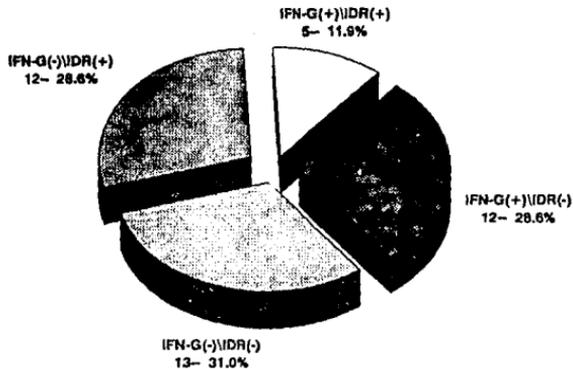


Fig. 2 Concordancia de las pruebas de IFN-G e IDR de 30 animales de 1er. parto.

Lote B: Resultaron positivas a tuberculosis bovina en 56.66% por la prueba de IDR y negativas el resto (43.33%); con la prueba de IFN-G el 16.66% de estas mismas vacas dio positivo y las demás negativas (83.33%).

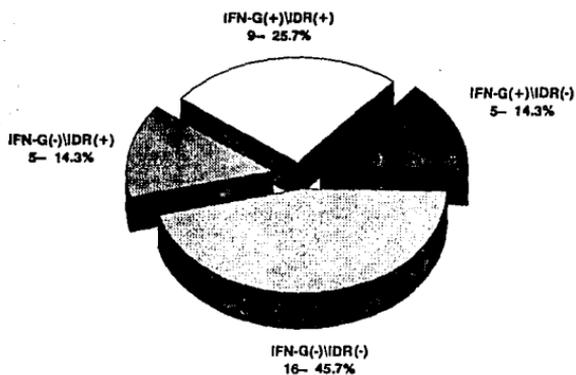


Fig. 3 Concordancia de las pruebas de IFN-G e IDR de 30 animales de 14 a 16 meses de edad.

Lote C: Se detectaron como positivas a tuberculosis bovina un 40% por la prueba de IDR y negativas las restantes (60%); a la prueba de IFN-G el 36.66% de estas hembras dio positivo, y negativas las demás (63.33%).

VII DISCUSION

La eficiencia para el diagnóstico de tuberculosis bovina se observa acompañada de dos riesgos; el primero de ellos es, el no diagnosticar animales tuberculosos y como segundo al considerar positivos a animales no tuberculosos, en la actualidad su importancia puede ser menor que la anterior; claro está que su importancia no debe dejarse o considerarse despreciable ya que es predecible su aumento, por lo que estos dos puntos son antagónicos entre sí.(23,48).

Como todos los métodos biológicos, las reacciones a la tuberculina tienen fallas, en México el número de animales positivos a la IDR es sumamente muy elevado; tomando en cuenta que de acuerdo a los criterios de la campaña de control y erradicación de tuberculosis bovina, estos deben ser sacrificados y se hace evidente la inestabilidad de dicho criterio.(17).

Se escogió trabajar con la prueba de IDR doble comparativa cervical, por que discrimina o descarta a aquellas infecciones causadas por micobacterias del complejo avium y atípicas, además de que la sensibilidad de la IDR es mayor cuando se aplica en el cuello en comparación con la que se aplica en la región caudal.(5,11,53).

Un reciente estudio realizado por Wood y colaboradores, la prueba de IFN-G demostró ser más sensible y específica para el diagnóstico de tuberculosis bovina, en comparación con la prueba de IDR; además hace mención de que cuando se suman los resultados de la prueba de IDR y la prueba de IFN-G se obtiene una alta especificidad y la más alta sensibilidad.(64).

Wood (1991) reporta que la prueba de IFN-G es una prueba con altísima especificidad de un 96.2% a 98.1% y una sensibilidad entre el 76.8% a 93.6%. En este trabajo se encontró una especificidad en el Lote A de un 83.33% por lo tanto, si existe una relación con los resultados reportados por Wood (1991); en cuanto a la sensibilidad se encontró que solo el 16.66% nos lo reportan como negativos a IFN-G, siendo posibles

negativos por reacción cruzada, un porcentaje de 3.33% de un animal posiblemente falso negativo o anérgico a la respuesta celular.

En cuanto al Lote B se reporta que tuvo una especificidad del 16.66% por lo que no hay una relación con lo reportado por Wood (1991) y la sensibilidad aquí fue de un 83.33%, los cuales son dados como negativos a IFN-G, estos resultados podemos manejarlos como animales anérgicos por la edad y etapa de producción lechera a la cual van entrando.

En lo que corresponde al Lote C: se encontró un 36.66% de especificidad por lo cual no hay relación alguna con lo que reporta Wood (1991), en cuanto a la sensibilidad se dio un 63.33% que tampoco se relaciona con la que Wood (1991) reporta.

La razón de la mayor sensibilidad de la prueba de IDR comparándola con la prueba de IFN-G, puede deberse a que los valores de corte preestablecidos para esta última prueba no sean del todo correctos, debido a que existe un rango bastante amplio que no está clasificado, específicamente del 0.7 al 1.8 de densidad óptica.

Es muy común, que hatos con baja incidencia de tuberculosis resulten en pruebas posteriores con elevado índice de reactivos a la tuberculina (recaídas), esto es posible debido a que las pruebas no logran detectar animales anérgicos y animales en etapas tempranas de la enfermedad o con lesiones latentes que pueden convertirse en fuentes de infección en un periodo incierto, que puede ser corto. (10,23,46,49,58).

Animales en etapas tempranas de la enfermedad han sido detectados por la prueba de IFN-G en otros países, aquí en este trabajo fué influenciado por lo antes mencionado edad, manejo zootécnico y producción lechera. (50).

El problema de los reactivos falsos negativos puede ser disminuido por la eliminación de todos los animales que reaccionen a la prueba de tuberculina inicial; en las pruebas siguientes puede incrementarse el número de animales infectados con M. bovis,

hallándose una respuesta al PPD de M.bovis en poblaciones donde la infección persiste; este criterio es bien aceptado por países en donde existe un acuerdo con el gobierno para reembolsar las pérdidas por los animales positivos a la IDR.(1,13,30,54).

Como objetivo primordial de evitar o disminuir en gran medida el sacrificio innecesario de bovinos, es primordial incluir en los criterios para su desecho, datos como son condición general, producción láctea, edad del animal y número de partos entre otras; evitando con esto el sacrificio de animales sin antecedentes o cuadro clínico de la tuberculosis, jóvenes, en buen estado de carnes, buena producción o de 1 a 2 partos y venta al rastro de animales de elevada calidad genética por ser reactivos a la tuberculina; además de realizarse otros estudios de apoyo como en este caso del IFN-G.

El control y la erradicación de la tuberculosis puede lograrse con cualquier prueba de diagnóstico, siempre y cuando los criterios implementados por los responsables directos de la campaña logren persuadir a los ganaderos para que modifiquen su actitud.

Se deberá hacer mayor énfasis en la promoción de líneas de investigación con el fin de purificar y elaborar antígenos más específicos, con lo que aumentaría la sensibilidad y la especificidad de las pruebas y disminuiría el número de reactivos falsos positivos y por consiguiente las mermas por desechos; en la elaboración y aplicación de vacunas, así como el planteamiento y uso de tratamientos.

Cabe hacer mención que para aplicar el criterio de erradicación se tendrá que establecer un seguimiento e inspección en rastro de los animales reactivos positivos, así como la toma y envío de muestras para buscar el aislamiento.

VIII CONCLUSIONES

1. - La prueba doble comparativa de tuberculina sigue siendo la prueba in vivo más rápida y de mejores resultados en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.
2. - La prueba de detección del interferón gamma demostró ser útil como prueba complementaria para el diagnóstico de tuberculosis bovina, porque disminuye el número de falsos positivos y negativos.
3. - El número de reactivos positivos a ambas pruebas aumenta proporcionalmente a la edad y/o producción del animal (vacas). Esto se explica por dos razones: la primera, es que al existir animales portadores de la enfermedad en el hato, estos la diseminan más ampliamente; y la segunda, es que todo animal expuesto a un estrés merma su capacidad de defensas, por lo cual la enfermedad se encuentra en un medio propicio para proliferar.

IX BIBLIOGRAFIA

- 1. - Auer,L.A., Schleeuaf,S.M.: Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with Mycobacterium bovis. Veterinary Microbiology.,18:1,51-61; 13 ref.(1988).**
- 2. - Barret,J.T.: Inmunología "Inmunoquímica e Inmunobiología".4ªed.Edit. Interamericana S.A. de C.V., México,D.F., 1985. pp: 73-461.**
- 3. - Benet, J.J.: The campaign against bovine tuberculosis in France in 1985. Epidemiologie et Sante Animale.,10:37-43.(1986).**
- 4. - Biberstein,E.L.,Zec,Y.CH.: Review Veterinary Microbiology. Blackwell Scientific Publications Inc., Boston, Massachusetts, U.S.A. 1990.pp:69-426.**
- 5. - Blood,D.C.,Henderson,J.A.: Medicina Veterinaria.6ªed. Edit. Interamericana S.A., México,D.F. 1988.pp:691-710.**
- 6. - Brock,T.D.: Biología de los microorganismos.2ªed. Edit.Omega S.A., Barcelona, España. 1978.pp:323-459.**
- 7. - Bryan,A.H.,Bryan,CH.A.,Bryan,CH.G.: Bacteriología.9ªed. Edit. C.E.C.S.A., México,D.F. 1984.pp:321-322.**
- 8. - Carpenter,P.L.: Microbiology.4ªed. Edit.W.B.Saunders Company: Philadelphia,N.Y.,U.S.A.1977.pp.418-495.**
- 9. - Carter,G.R.: Bacteriología y Micología Veterinarias. Edit.El Manual Moderno,S.A. de C.V., México,D.F. 1985.pp:127-260.**

- 10.- Chavez,P.R.,et al.: Optimization of the tuberculin test using purified protein derivate (PPD) of bovine and avium origin in tuberculosis free herds. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*.18:3/4, 97-104.13 ref.(1987).
- 11.- Contreras Pérez,J.: Prueba comparativa de tuberculinización en ganado bovino lechero mediante el empleo de PPD de elaboración inglesa (WEYBRIDGE) y PPD nacional (ProNaBiVe). Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. FES-Cuautitlan.UNAM.1981.
- 12.- Corner,L.A.,et al.: Identification of Mycobacterium bovis isolates using a monoclonal antibody. *Veterinary Microbiology*. 18:2, 191-196. 11 ref.(1988).
- 13.- De Jong,A.,et al.: A rapid method for identification of Mycobacterium species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble cell proteins. *Med Microbiology*. 34:1-5 (1991).
- 14.- De la O Ramírez,F.J.: Efectividad de la Prueba tuberculínica Doble Comparativa PPD (Aviar y Bovina), Aplicada en Ganado de Raza Holstein-Friesian del Centro de Recría en Cd. Jiménez Chih. y del Establo San Juan de la Colmena, del Municipio de Cd. Ojinaga Chih. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. FES Cuautitlan.UNAM.1984.
- 15.- Donchenko,A.S.: Para-allergic reactions to tuberculin among cattle of tuberculosis-free herds. *Veterynariya Moscow,URSS*. 12:37-38.(1987).
- 16.- Doseñ Durán,J.G.: Análisis del Daño Económico Producido por la Tuberculosis Bovina en Once Establos Lecheros Durante un Programa de Control. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. FES-Cuautitlan.UNAM.1993.
- 17.- Francis,J.: The sensitivity and specificity of various tuberculins test using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Record*. 103:420-435.(1978).

- 18.- Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.: Methods in Immunology. 3^{ed}. Edit. The Benjamin/Cummings publishing company. Massachusetts, U.S.A. 1983. pp:467-470.
- 19.- Gibbons, W.J.: Medicina y cirugía de los bovinos. Edit. La Prensa Médica Mexicana, S.A., México, D.F. 1984. pp:158-164.
- 20.- Grange, J.M., Collins, C.H.: Bovine tubercle bacilli and disease in animals and man. Epidemiology and infection. 99:2, 221-234; 69 ref. (1987).
- 21.- Greenough, P.R.: Lameness in cattle. Edit. Wright-Scientific. Bristol, Great Britain. 1981. pp:118-119.
- 22.- Hagan, W.A., Bruner, D.W.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 2^{ed}. Edit. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1961. pp:290-329.
- 23.- Heidrich, H.D., Gruner, J.: Manual de patología bovina. Edit. Acribia. Zaragoza, España. 1976. pp:6-209.
- 24.- Hitos, O.F.J., Angulo, B.G.: Tuberculosis en el ganado bovino. Dirección General de Sanidad Animal. Subdirección de Referencia en Salud Animal, Km.37.5, carretera México-Pachuca, Tecamac, Edo. de México. 1987. pp:7-10.
- 25.- Holt, K.: Investigation and control of a major tuberculosis breakdown. State Veterinary Journal, 41:119, 160-164. (1987).
- 26.- Howard, J.G., Frances, J.T.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4^{ed}. Edit. La Prensa Médica Mexicana, S.A., México, D.F. 1983. pp:228-261.

- 27.- Instituto Politécnico Nacional.: Laboratorio de producción y control de biológicos.4ªed.Edit. Depto. Publicaciones de la E.N.C.B., México,D.F.1984.pp.135-146.
- 28.- Kazda,J.,Cook,B.R.: Mycobacteria in pond waters as a source of non-specific reactions to bovine tuberculin in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*.36:4, 184-188. 19 ref.(1988).
- 29.- Kelly,W.R.: Diagnóstico clínico veterinario. Edit.C.E.C.S.A., S.A.,México,D.F.1981.pp:298-417.
- 30.- Khodun,L.M.,Kurdyuk,V.P.: Seasonal variation in the allergic reaction of cattle to tuberculin. *Veterinariya Moscow,URSS*. 12:38-39. 7 ref.(1987).
- 31.- Klein,J.: Immunology "The Science of Self-Nonself Discrimination. Edit.Wiley-Interscience. New York,U.S.A.1982.pp: 597-600.
- 32.- Lara y Lara,J.,Vado Solis,J.A.: Prevalence of tuberculin reactors among cattle supplying milk to Merida city. *Veterinaria México*.18:2, 143-144. 4 ref.(1987).
- 33.- Libros de Investigación y Ciencia "Scientific American". 2ªed.Edit.Prensa Científica.Barcelona, España.1984.pp:146-155.
- 34.-Livingstone,P.,Chalmers,M.: Tuberculosis "blowout" in Owaka valley (South Otago). *Surveillance,New Zealand*. 14:3, 22-23.(1987)
- 35.-López Díaz,G.E.: Tratamiento de la tuberculosis en ganado bovino lechero, utilizando una combinación de Isoniazida, Estreptomicina y un Compuesto Orgánico de Yodo. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. FES-Cuautitlan.UNAM.1987.

- 36.- Moguel Novelo, J.M.: Relación entre la Prueba de intradermorreacción, Hallazgos postmortem y Estudio bacteriológico en el Diagnóstico de tuberculosis bovina. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. FES-Cuautitlan. UNAM. 1981.
- 37.- Morilla, G.A., Bautista, G.C.: Manual de Morilla. 1ª ed. Edit Diana, S.A., México, D.F. 1986. pp:261-264.
- 38.- Neill, S.D., et al.: Mycobacterium bovis in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Veterinary Record*. 122:8, 184-186. 11 ref. (1988).
- 39.- Nicolet, J.: Compendio de Bacteriología Médico Veterinaria. 1ª ed. Edit. Acribia, S.A., Zaragoza, España. 1985. pp:185-196.
- 40.- O.M.S., O.P.S., B.I.D.: Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina (PROASA): Cuarentena Animal, Volumen 1 ""Enfermedades cuarentenables"". Edit. O.M.S. 1984. pp:179-183.
- 41.- O'Reilly, L.M., Costello, E.: Bovine tuberculosis. *Iris Veterinary News*. U.S.A. 10:8, 17-25. 32 ref. (1988)
- 42.- O'Reilly, L.M., Costello, E.: Bovine tuberculosis with special reference to the epidemiological significance of pulmonary lesions. *Iris Veterinary News*. U.S.A. 10:10, 11-21. 33 ref. (1988).
- 43.- Ovdienko, N.P., et al.: Frequency of tuberculin injections in cattle. *Veterinariya Moscow, URSS*. 8:29-33. (1987).
- 44.- Pastoret, P.P., Govaerts, A., Bazin, H.: *Inmunologie Animale*. 2ª ed. Edit. Flammarion Medicine Sciences; Paris, France. 1990. pp:24-306.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 45.- Programa de acreditación de M.V.Z., material para la actualización técnica en brucelosis y tuberculosis bovina. 1ªed. México, Colegio Nacionalde M.V.Z. de México.1990.pp:88.
- 46.- Ramírez Casillas,I.C.: Diagnóstico de tuberculosis bovina diferentes a la tuberculización. Memorias de cursos previos a la III reunión de egresados en Patología Veterinaria y Congreso de la Sociedad Mexicana de Patología Veterinaria,A.C.,México,D.F. Octubre de 1992.pp:59-65.
- 47.- Ritacco,V.,et.al.: Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*.U.S.A.50:3, 365-367; 8 ref.(1991).
- 48.- Rosenberger,G.: Enfermedades de los bovinos (Tomo II).Edit. Hemisferio sur,Buenos Aires, Argentina.1983.pp:139-150.
- 49.- Rothel,J.S., et.al.: A sandiwch enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma ant its usa the detection of tuberculosis in cattle.*Aust Vet. J.*,67:134-137.(1990).
- 50.- Rothel,J.S.,et.al.: The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture.*Aust. Vet. J.*,69.1-4.(1992).
- 51.-Runnells,R.A.,et.al.:Principios de Patología Veterinaria: Anatomía Patológica. 7ªde. Edit.C.E.C.S.A., México, D.F.1982.pp: 258-259.
- 52.- Ryan,T.J.,et.al.: The performance of the skin and gamma-interferon tests for diagnosis of tuberculosis infection in cattle in New Zealand.Publication Veterinary Continuing Education,Massey University. 132: 143-150; 6 ref.(1991).

- 53.- Sandoval Villalpando, J.A.: Primera tuberculinización realizada en el Hato de bovinos productores de leche del Rancho Almaraz, como prueba inmunodiagnostica. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. FES-Cuautitlan. UNAM. 1980.
- 54.- Schiavo, A.: Comparative intradermal tuberculin test in the prophylaxis of bovine tuberculosis. Summa., 4:3, 161-163. 25 ref. (1987).
- 55.- Serrano, E., et al.: Lymphocyte transformation in cattle reacting suspiciously to the intradermal tuberculin test. Medicina Veterinaria., 3:11, 565-569. 16 ref. (1986).
- 56.- Shehata, H.A., et al.: Studies of some blood and serum constituents in tuberculin negativa and tuberculin positive cattle and buffaloes. Veterinary Medical Journal. 35:2, 213-224. 32 ref. (1987).
- 57.- Siegmund, O.H.: Manual de Veterinaria (Merck). Edit. Merck Sharp & Dohme Research Laboratories. Rahway, New Jersey, U.S.A. pp: 295-300.
- 58.- Thongkrajai, P., et al.: Improved ELISA with immunoabsorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. Med. Microbiol., 30:101-104. (1989).
- 59.- Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. 3ª ed. Edit. Interamericana, México, D.F. 1987. pp: 84-342.
- 60.- Weber, A., et al.: Detection of Mycobacterium bovis reinfections in cattle herds. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift., R.F.A. 101:9, 302-307. 11 ref. (1988).
- 61.- Wiesmer, E.: Enfermedades del ganado bovino. Edit. Acribia, Zaragoza, España. 1973. pp. 123-398.

- 62.- Wood,P.R.,et.al.: Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 25:1, 37-46. 29 ref. (1990)
- 63.- Wood,P.R.,et.al.: Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma-interferon.*Research in Veterinary Science*. 49:1, 46-49. 21 ref. (1990).
- 64.- Wood,P.R.,et.al.: Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.*, 68:9, 286-290. 16 ref.(1991).
- 65.- Wood,P.R.,et.al.: A field evaluation of serological and cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiology*.,31:71-79.(1992).
- 66.- Yuding,G.A.: Causes, frequency and prevention of non-specific reactions to tuberculin in cattle. *Veterinariya Moscow,URSS.*, 12:29-32. 23 ref.(1987).