



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

### **CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**

Proyecto de investigación previo a la  
obtención del título de Ingeniero  
Zootecnista

#### **Título del Proyecto de Investigación:**

**“Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de *Mycobacterium bovis* en el Camal Municipal del cantón Buena Fe”.**

#### **Autor:**

Plúas Choez Leonel Alfonso

#### **Director:**

**Dra. Diana Lucía Vasco Mora**

**Quevedo – Los Ríos – Ecuador**

**2019**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **LEONEL ALFONSO PLUAS CHOEZ**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

---

Leonel Alfonso Pluas Choez

# **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

La suscrita, **Dra. Diana Lucía Vasco Mora**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado **Leonel Alfonso Pluas Choez**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “**Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de *Mycobacterium bovis* en el Camal Municipal del cantón Buena Fe**”. previo a la obtención del título de Ingeniero Zootecnista, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Dra. Diana Lucía Vasco Mora

**DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, la suscrita Dra. Diana Lucía Vasco Mora, en calidad de Directora del Proyecto de Investigación titulado “**Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de *Mycobacterium bovis* en el Camal Municipal del cantón Buena Fe**”. de autoría del estudiante **LEONEL ALFONSO PLUAS CHOEZ**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 7%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



## Urkund Analysis Result

Analysed Document:	tesis pluas.docx (D53078273)
Submitted:	5/29/2019 2:46:00 AM
Submitted By:	leonel.pluas2013@uteq.edu.ec
Significance:	7 %

Atentamente

Dra. Diana Lucía Vasco Mora

**DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTECNICA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

**“Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de *Mycobacterium bovis* en el Camal Municipal del cantón Buena Fe”.**

**Presentado al Consejo Académico como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Zootecnista.**

**Aprobado por:**

---

**Ing. Adolfo Sánchez**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**Dr. Ítalo Espinoza**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**Dr. Martin González**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR**

**2019**

## **RESUMEN EJECUTIVO**

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica de los rumiantes que guarda estrecha relación con la tuberculosis humana y provoca un deterioro progresivo del estado general de salud del animal, pérdida de peso, muy a menudo con tos y, a la larga, la muerte. El impacto de esta enfermedad para la salud humana y la sanidad animal, la economía y el comercio es significativo y, por esta razón están entre las enfermedades de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal, con el objetivo de determinar la prevalencia de tuberculosis en el camal del cantón Buena Fe se utilizó la técnica Lamp en tejidos pulmonares de los animales faenados, durante la investigación se evaluó a 280 animales que se le extrajeron tejido pulmonar una vez faenados en el camal se estudiaron las siguientes variables; edad, sexo, procedencia y raza, 228 animales tenían edades de cinco y seis años, 100 bovinos provenían de Santo Domingo, el 70% de los animales evaluados fueron hembras, la raza Brahmán presento mayor números de animales con 198, de los 280 bovinos se diagnosticaron 157 animales positivos que corresponde al 56.07% de las muestras evaluadas, 114 animales positivos fueron hembras y 138 correspondieron a edades cinco años en adelante, la raza Brahmán presento mayor números de animales positivos con 82, y 66 bovinos positivos fueron provenientes de la provincia de Santo Domingo, la implementación de la técnica Lamp para la detección de la bacteria *Mycobacterium bovis* represento un costo de (3.90) tres dólares con noventa centavos.

**Palabras clave:** tuberculosis, prevalencia, *Mycobacterium bovis*, bovinos, Lamp, diagnostico.

## **ABSTRACT**

Bovine tuberculosis is a chronic disease of ruminants that is closely related to human tuberculosis and causes a progressive deterioration of the general health of the animal, weight loss, very often with cough and, eventually, death. The impact of this disease on human health and animal health, economics and trade is significant and, for this reason, they are among the diseases of mandatory notification to the World Organization for Animal Health, with the objective of determining the prevalence of tuberculosis in the canton cantonal good faith the Lamp technique was used in lung tissues of slaughtered animals. During the investigation, 280 animals were evaluated, which were extracted lung tissue once slaughtered in the canton Buena Fe and the following variables were studied. ; age, sex, origin and race, 228 animals had ages of five and six years, 100 cattle came from Santo Domingo, 70 5 of the animals evaluated were females, the brahmin race presented greater numbers of animals with 198, of the 280 cattle 157 positive animals were diagnosed corresponding to 56.07% of the evaluated samples, 114 positive animals were females and 138 corresponded to ages 5 years and older, the Brahmin breed showed more positive numbers with 82, and 66 positive bovines were from the Province of Santo Domingo, the implementation of the lamp technique for the detection of *Mycobacterium bovis* bacteria represented a cost of (3.90) three dollars and ninety cents.

**Key words:** tuberculosis, prevalence, *Mycobacterium bovis*, bovines, Lamp, diagnosis.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	i
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	ii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iii
RESUMEN EJECUTIVO.....	v
ABSTRACT .....	vi
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	x
CÓDIGO DUBLÍN.....	1
Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
1.1. Problema de investigación .....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación de problema. ....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	4
1.2. Objetivos .....	5
1.2.1. Objetivo general. ....	5
1.2.2. Objetivos específicos. ....	5
1.3. Justificación .....	6
CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
2. Fundamentación teórica de la investigación .....	8
2.1. Marco conceptual.....	8
2.1.1. Enfermedad infecciosa.....	8
2.1.2. Transmisión. ....	8
2.1.4. Zoonosis.....	8
2.1.5. Tuberculosis.....	9
2.2. Marco referencial.....	9
2.2.1. Característica de la Tuberculosis.....	10
2.2.1.1. Infección por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	12
2.2.1.2. Presentación.....	13
2.2.1.3. Tuberculosis bovina: características, estado y proyecciones de control.....	13
2.2.1.5. Morbilidad y mortalidad .....	15

2.2.1.6.	El hospedero: resistencia natural a la tuberculosis.....	16
2.2.2.	¿Cómo prevenir o controlar esta enfermedad? .....	16
2.2.4.	LAMP.....	18
2.2.5.	El empleo de la prueba intradérmica usando el derivado proteínico purificado (PPD)	19
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>24</b>
<b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>		<b>24</b>
3.1.	Localización.....	25
3.1.1.	Trabajo de campo.....	25
3.1.2.	Análisis de laboratorio .....	26
3.2.	Tipo de investigación.....	26
3.3.	Método de investigación.....	26
3.4.	Fuentes de recolección de información.....	26
3.5.	Diseño de la investigación.....	27
3.6.	Instrumentos de la investigación.....	27
3.6.1.	Extracción por el método de TENS .....	27
3.6.2.	Variables a evaluar.....	28
3.7.	Tratamientos de los datos .....	29
3.8.	Recursos humanos y materiales .....	29
3.8.1.	Recursos humanos.....	29
3.8.2.	Materiales.....	29
3.9.	Procedimientos.....	31
3.9.1.	Toma de muestras.....	31
3.9.2.	Elaboración de reactivos.....	31
3.9.2.1.	Elaboración de TENS.....	31
3.9.2.2.	Elaboración de TE.....	32
3.9.2.3.	Elaboración de TAE 1X.....	33
3.9.3.	Extracción de ADN.....	33
3.9.4.	Técnica de LAMP .....	34
<b>CAPÍTULO IV .....</b>		<b>37</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>37</b>
4.1.	Resultados y Discusión.....	38
4.1.1.	Resultados de los análisis del laboratorio.....	38
<b>CAPÍTULO V.....</b>		<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>		<b>43</b>
5.1.	Conclusiones.....	44

<b>5.2. Recomendaciones</b> .....	45
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	46
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	46
Bibliografía .....	47
<b>CAPITULO VII</b> .....	50
<b>ANEXOS</b> .....	50

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Tuberculosis bovina por Provincia .....	11
<b>Ilustración 2.</b> Mapa del cantón Buena Fe .....	25
<b>Ilustración 3</b> Gel de agarosa con muestras positivas .....	39
<b>Ilustración 4.</b> Faenamamiento de los bovinos .....	51
<b>Ilustración 5.</b> Corrales del camal del canton Buen Fe .....	51
<b>Ilustración 6.</b> Área de sacrificio y despiece .....	51
<b>Ilustración 7.</b> Pulmón de bovino .....	52
<b>Ilustración 8.</b> Esterilización de materiales .....	52
<b>Ilustración 9.</b> Almacenamiento de las muestras de pulmón.....	52
<b>Ilustración 10.</b> Extracción de muestra del microtubo .....	52
<b>Ilustración 11.</b> Deposito de la muestra en gel de agarosa.....	53
<b>Ilustración 12.</b> Gel de agarosa en la cámara foto documentadora .....	53
<b>Ilustración 13.</b> Gel de agarosa en el transiluminador .....	53
<b>Ilustración 14</b> Extracción de la muestra.....	54
<b>Ilustración 15</b> Recolección de muestras de pulmón.....	54
<b>Ilustración 16</b> Presencia de granulomas en toda la canal.....	54
<b>Ilustración 17</b> Bovino positivo con tuberculosis.....	54

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Resultados de los análisis del laboratorio.....	38
<b>Tabla 2</b> Sexo de los animales positivos a mycobacterium bovis.....	39
<b>Tabla 3</b> Animales positivos de acuerdo a las razas .....	40
<b>Tabla 4</b> Razas de animales positivos.....	40
<b>Tabla 5.</b> Resultados de los positivos de acuerdo a la procedencia .....	41
<b>Tabla 6</b> Prevalencia de la enfermedad.....	41
<b>Tabla 7</b> Análisis económico .....	42
<b>Tabla 8</b> Edades de los bovinos .....	55
<b>Tabla 9</b> Procedencia de los bovinos .....	55
<b>Tabla 10</b> Sexo de los bovinos.....	55
<b>Tabla 11</b> Razas de los bovinos .....	55
<b>Tabla 12</b> Costo de reactivos para la técnica Lamp .....	56
<b>Tabla 13</b> Costo de materiales .....	56
<b>Tabla 14</b> Costo de reactivos para el protocolo de Tens.....	57
<b>Tabla 15</b> Costo del gel de agarosa al 1%.....	57
<b>Tabla 16</b> Costo del gel de agarosa al 2 %.....	57

## CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de <i>Mycobacterium bovis</i> en el Camal Municipal del cantón Buena Fe”.				
Autor:	Pluas Choez Leonel Alfonso				
Palabras clave:	Tuberculosis	Prevalencia	Mycobacterium bovis	Bovinos	Lamp
Fecha de publicación:					
Editorial:					
Resumen:	<p>La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica de los rumiantes que guarda estrecha relación con la tuberculosis humana y provoca un deterioro progresivo del estado general de salud del animal, pérdida de peso, muy a menudo con tos y, a la larga, la muerte. El impacto de esta enfermedad para la salud humana y la sanidad animal, la economía y el comercio es significativo y, por esta razón están entre las enfermedades de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal, con el objetivo de determinar la prevalencia de tuberculosis en el camal del cantón Buena Fe se utilizó la técnica Lamp en tejidos pulmonares de los animales faenados, durante la investigación se evaluó a 280 animales que se le extrajeron tejido pulmonar una vez faenados en el camal se estudiaron las siguientes variables; edad, sexo, procedencia y raza, 228 animales tenían edades de cinco y seis años, 100 bovinos provenían de Santo Domingo, el 70% de los animales evaluados fueron hembras, la raza Brahmán presento mayor números de animales con 198, de los 280 bovinos se diagnosticaron 157 animales positivos que corresponde al 56.07% de las muestras evaluadas, 114 animales positivos fueron hembras y 138 correspondieron a edades cinco años en adelante, la raza Brahmán presento mayor números de animales positivos con 82, y 66 bovinos positivos fueron provenientes de la provincia de Santo Domingo, la implementación de la técnica Lamp para la detección de la bacteria <i>Mycobacterium bovis</i> represento un costo de (3.90) tres dólares con noventa centavos.</p>				

	<p><b>Abstract:</b> Bovine tuberculosis is a chronic disease of ruminants that is closely related to human tuberculosis and causes a progressive deterioration of the general health of the animal, weight loss, very often with cough and, eventually, death. The impact of this disease on human health and animal health, economics and trade is significant and, for this reason, they are among the diseases of mandatory notification to the World Organization for Animal Health, with the objective of determining the prevalence of tuberculosis in the canton cantonal good faith the Lamp technique was used in lung tissues of slaughtered animals. During the investigation, 280 animals were evaluated, which were extracted lung tissue once slaughtered in the canton Buena Fe and the following variables were studied. ; age, sex, origin and race, 228 animals had ages of five and six years, 100 cattle came from Santo Domingo, 70 5 of the animals evaluated were females, the brahmin race presented greater numbers of animals with 198, of the 280 cattle 157 positive animals were diagnosed corresponding to 56.07% of the evaluated samples, 114 positive animals were females and 138 corresponded to ages 5 years and older, the Brahmin breed showed more positive numbers with 82, and 66 positive bovines were from the Province of Santo Domingo, the implementation of the lamp technique for the detection of Mycobacterium bovis bacteria represented a cost of (3.90) three dollars and ninety cents.</p>
Descripción:	70 hojas; dimensiones, 29x21 cm + CD-ROM
URI:	

## Introducción

La tuberculosis bovina y la paratuberculosis o enfermedad de Johne's son enfermedades infecciosas en rumiantes, causadas por *M. bovis* y *M. paratuberculosis*, respectivamente. La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica de los rumiantes que guarda estrecha relación con la tuberculosis humana y provoca un deterioro progresivo del estado general de salud del animal, pérdida de peso, muy a menudo con tos y, a la larga, la muerte. La paratuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa del tracto intestinal y se caracteriza por provocar enteritis granulomatosa crónica y progresiva, y diarreas sin respuesta a un tratamiento. Ambas enfermedades afectan especialmente a los bovinos. Ambas bacterias son excretadas en la leche de los bovinos afectados, y por eso el consumo de leche cruda o queso fresco elaborado con leche cruda es la fuente de diseminación más importante de estas enfermedades, tanto para los animales y el hombre. El impacto de estas enfermedades para la salud humana y la sanidad animal, la economía y el comercio es significativo y, por esta razón están entre las enfermedades de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (1).

La transmisión puede ser debida a las secreciones pulmonares de animales tuberculosos, que expulsan el agente en las microgotas producidas al toser, material de ganglios o articulaciones ulceradas, materia fecal contaminada por eliminación hepática, intestinal o por deglución de productos pulmonares, orina, semen, secreciones genitales y leche de vacas tuberculosas, que resulta con frecuencia el vehículo de infección para los terneros o los cerdos alimentados con residuos de quesería o tambo (suero, leche total) (2).

La argumentación anteriormente expuesta muestra la importancia de un buen control de ambas enfermedades en nuestros rebaños de producción. Las medidas de prevención y control de la tuberculosis bovina y paratuberculosis comprenden buenas prácticas sanitarias, y el diagnóstico oportuno para identificar los animales infectados. Bovinos infectados deben ser sacrificados en el caso de tuberculosis bovina o ser separados de su cría y los otros animales del rebaño en el caso de paratuberculosis para así proteger los animales y rebaños no infectados. Por tanto, el diagnóstico es crucial en el control de ambas enfermedades (1).

Además, la desventaja de los países subdesarrollados, predispone a las personas a contraer enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, esto es, debido a la pobreza, el

alcoholismo, la desnutrición, y otras. Por tanto, es inasequible a equipos para el buen diagnóstico clínico, rápido y eficiente (3)

Sin embargo, existen técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pero tiene un alto costo debido al equipamiento que usa y su larga duración para la entrega de resultados, la Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR), Amplificación basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos (NASBA), y Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA) son otros métodos en forma de kits y es introducido en el diagnóstico de rutina con garantía de obtener buenos resultados (4). No obstante, una prueba molecular altamente sensible que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas mediada por Loop (LAMP) permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas, y el sistema permite la discriminación visual de resultados sin equipos especializados costosos (5).

LAMP ofrece resultados rápidos con alta sensibilidad y especificidad y requiere de un baño maria a una sola temperatura entre 60°C a 65°C, cuatro cebadores como mínimo y seis como máximo, todos altamente especializados, la DNA polimerasa es la Bst polimerasa, que tiene actividad desplazante de cadena, que proviene de *Bacillus stearo-thermofilus*; en caso de amplificar RNA se hace uso de una transcriptasa reversa (3).

Este trabajo tuvo como finalidad determinar la presencia de tuberculosis bovina en los animales del Camal Municipal de Buena Fe, empleando el método de LAMP.

**CAPÍTULO I**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de investigación**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades más perjudiciales y mortales, porque afecta al desarrollo pecuario, y una vez detectada esta enfermedad impide la comercialización de la carne bovina y sus derivados. Es una enfermedad zoonótica que en el 2006 fue responsable de cien muertes diarias de seres humanos en países en desarrollo, uno de los focos de infección se debe al consumo de productos y subproductos de animales infectados, provenientes de los camales que faenan animales sin realizar un control sanitario antes del sacrificio.

### **1.1.2. Formulación de problema.**

¿Existirá la prevalencia epidemiológica de la tuberculosis bovina en el cantón Buena Fe?

### **1.1.3. Sistematización del problema.**

¿Cuál será el índice de prevalencia epidemiológica de la tuberculosis bovina en el cantón Buena Fe?

¿Qué razas bovinas son más susceptibles a esta enfermedad?

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general.**

- Aplicar la técnica LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección de *Mycobacterium bovis* en el camal Municipal del cantón Buena Fe.

### **1.2.2. Objetivos específicos.**

- Establecer la prevalencia epidemiológica de la *M. bovis* en el camal Municipal del cantón Buena Fe.
- Realizar un análisis económico sobre la aplicación de la técnica LAMP para la detección de *M. bovis*.

### **1.3. Justificación**

La tuberculosis bovina afecta a los animales causando en ellos una baja producción destinada a cualquier propósito (carne y leche) y como resultado afecta a la rentabilidad en las ganaderías, es una enfermedad zoonótica que puede ocasionar la muerte en seres humanos, se transmite por medio de la leche cruda y consumo de carne mal cocida contaminada de *M. bovis*. Esto se debe a un mal manejo sanitario en las ganaderías y centros de faenamiento que no realizan una inspección previa al sacrificio animal y de esta manera se comercializa carne contaminada de tuberculosis bovina. Este trabajo se ejecutó con el fin de obtener resultados sobre la prevalencia epidemiológica de esta enfermedad. Con el fin de acelerar el progreso de los resultados en el análisis de la epidemia de tuberculosis, esta investigación es una buena opción para incorporar la técnica de LAMP como pruebas de rutina en el laboratorio debido a su bajo costo y a su simplicidad en cuanto a equipos. Además, es una de las alternativas para el posible mejoramiento, respecto a los métodos tradicionales, de algunas de las características requeridas para el diagnóstico de la tuberculosis como la portabilidad, el tiempo de respuesta, la especificidad, la sensibilidad y la relación costo-beneficio.

**CAPÍTULO II**  
**FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2. Fundamentación teórica de la investigación**

### **2.1. Marco conceptual.**

#### **2.1.1. Enfermedad infecciosa.**

Una enfermedad infecciosa es la consecuencia de la presencia de una infección en el cuerpo provocada por bacterias, hongos, virus, protozoos, etc. Cuando la infección viene ocasionada por agentes biológicos patógenos de tamaño macroscópico se considera una infestación. (6)

#### **2.1.2. Transmisión.**

Es la forma en que el agente infeccioso pasa del individuo infectado a un nuevo susceptible. La transmisión puede ser: Directa inmediata: en el mismo momento en que se elimina el agente lo recibe el susceptible. Ej. Transmisión sexual, por contacto de mucosas o por mordeduras. Directa mediata: existe un pequeño espacio de tiempo y distancia entre la eliminación y la recepción del agente. Ej. Transmisión por micro gotas al estornudar. La transmisión directa de una enfermedad se denomina contagio. Indirecta: Media espacio físico y de tiempo entre la eliminación del agente y su recepción por el susceptible, incluyendo vehículos o vectores entre ambos (2).

#### **2.1.3. Enfermedad infecciosa**

Es el apartamiento del estado de salud provocado por la acción patógena de un agente microbiano sobre el organismo animal. Los agentes microbianos comprenden los hongos, las bacterias, los micoplasmas, las chlamydias, las rickettsias, los virus y los priones. Puede incluirse también a los protozoarios, aunque en algunos casos las enfermedades producidas por ellos se estudian dentro de las enfermedades parasitarias (2).

#### **2.1.4. Zoonosis**

Zoonosis (del griego zoon: animal) en relación con enfermedades infecciosas transmisibles desde animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales. Los agentes infecciosos involucrados incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos y rickettsias, entre otros (7).

Se pueden dividir en: Antropozoonosis: Son las enfermedades que padece el hombre al recibir el agente de una enfermedad prevalente en los animales (Rabia, Brucelosis,

Encefalomiелitis Equina, Trichinelosis, Hidatidosis) y Zooantroponosis: Son las enfermedades que padecen los animales al recibir el agente de una enfermedad prevalente en el hombre (Tuberculosis del cerdo por *M. tuberculosis*) (8).

### **2.1.5. Tuberculosis**

El término tuberculosis se utiliza para las enfermedades que son causadas exclusivamente por agentes del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*; *M. bovis*; *M. africanum*; *M. microti*) (8).

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, crónica, zoonótica, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas localizadas preferentemente en ciertos órganos (pulmón, ganglios, hígado) o diseminadas, acompañadas por caquexia progresiva, nódulos ganglionares, períodos febriles y lentitud del crecimiento, producida por micobacterias (2).

### **2.1.6. Lamp.**

El ensayo LAMP (amplificación isotérmica mediada por un lazo), esta técnica se basa en el uso del Bst ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus* y de otras especies de *Geobacillus*, que tienen actividad de desplazamiento de la cadena junto con seis oligonucleótidos para la amplificación, que hibridan en ocho sitios del ADN diana. Los oligonucleótidos son: 2 externos (F3, B3); dos internos (FIP, (F1c-F2c), BIP (B1c-B2)) que tienen secuencias tanto de sentido y antisentido; y dos oligonucleótidos lazo (LF, LB) (9).

### **2.1.7. Período de incubación**

El período de incubación es el intervalo de tiempo entre la invasión por un agente infeccioso y la aparición de los primeros signos o síntomas de la enfermedad.

También puede definirse como el período de tiempo que transcurre desde que una persona entra en contacto con el agente infeccioso hasta que aparecen los primeros signos y síntomas de la enfermedad. (10)

## **2.2. Marco referencial**

### 2.2.1. Característica de la Tuberculosis

Algunas enfermedades tradicionalmente endémicas, incluso con programas de control, pueden en determinadas circunstancias aumentar su incidencia. Así ha sucedido con la tuberculosis, de gran importancia en los ámbitos de la salud pública y de la sanidad animal. Al respecto, se estima que entre los años 2002 y 2020 aproximadamente 1000 millones de personas se infectarán, más de 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis. Esta enfermedad, producida por *M. tuberculosis*, afecta principalmente al ser humano probablemente desde sus orígenes, pero hace 40 años se tuvo la esperanza de que la población pronto estaría libre de ella. Ahora que su incidencia aumenta, podemos considerarla una enfermedad re-emergente (8)

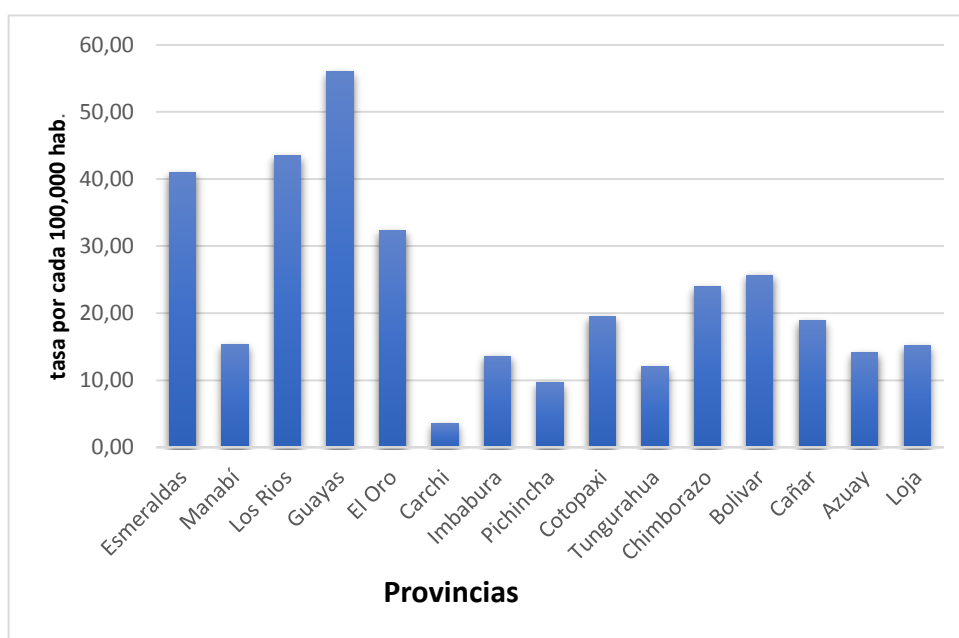
El inicio de la producción industrial de leche con establecimiento de grandes rebaños durante el siglo XX, preparó el terreno para el aumento de la infección por *M. bovis* en el ganado, lo que se reflejaría luego en la transmisión del agente a las personas, principalmente a través del consumo de leche, influyendo inicialmente en la epidemia de tuberculosis humana. Posteriormente, la pasteurización de la leche redujo drásticamente la incidencia de infección por *M. bovis*, pero en regiones en desarrollo o donde ha existido una producción de subsistencia con consumo de leche cruda, persiste el riesgo de zoonosis mientras no se controle la tuberculosis en el ganado o en otras poblaciones animales que compartan su hábitat y mantengan la infección. En algunos países desarrollados donde aún existe cierto consumo de leche no pasteurizada, como en el Reino Unido, se teme que la infección en el bovino pueda reflejarse en casos humanos. (8).

*Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* son especies estrechamente relacionadas, que, a pesar de algunas diferencias bioquímicas, tienen una homología nucleotídica que alcanza a un 99,95%. Las diferencias entre ambas especies corresponden a deleciones ocurridas en el genoma de *M. bovis* y a polimorfismos nucleotídicos únicos (single-nucleotide polymorphism) en genes que codifican para proteínas secretadas y de la pared celular. Todo ello sugiere que *M. bovis* evolucionó como especie a partir de *M. tuberculosis*, adquiriendo en el proceso la capacidad de infectar a un mayor rango de hospederos y también de transmitirse entre ellos (8).

En Latinoamérica, en humanos, se registra una baja prevalencia de alrededor de 1% de la tuberculosis causada por la infección con *M. bovis*. Sin embargo, se piensa que hay un subregistro y que éste se relaciona con la baja cobertura del cultivo para el diagnóstico de

tuberculosis en humanos, especialmente en áreas rurales donde el consumo de leche cruda o queso artesanal es más alto que en la ciudad (1).

Para el año 2011, el Ministerio de Salud Pública reportó los datos de TB totales por provincia (Ilustración 1), sin embargo, por la falta de estudios e identificación del patógeno se estima que la incidencia se encuentra relacionada con el resto de países de la zona. Destacando que el periodo de 1998-2005, en base a su crecimiento y/o características morfológicas, se aisló dos cepas de *M. bovis*, en dos niños con TB extrapulmonar, sospechando que la ruta de transmisión fue la ingestión de los microorganismos (11).



**Ilustración 1. Tuberculosis bovina por Provincia**  
Tuberculosis bovina por provincia en el año 2011 (MSP, 2011)

Según Vinuesa M. (2015), indica que el cantón Chambo mediante una prueba de tuberculización realizada 136 bovinos, 26 vaconas, 33 vacas secas y 75 vacas en producción se determinó una prevalencia del 0.73% en todas las categorías zootécnicas respectivamente. (12).

Echeverría G. (2011), señala que mediante una investigación realizada en camal municipal del cantón Cayambe determinó la prevalencia de tuberculosis bovina en un 4.059% mediante la aplicación de PCR en 271 biopsias que corresponden a 21 (7.75%) bovinos mayores o

iguales a 6 años y a 250 (72.25%) bovinos menores a 6 años, los 11 animales con positivo a *M. bovis* corresponden a 8 hembras y 3 machos (13).

Según Guamán M. (2011), muestra que en la comunidad de Molobog provincia de Chimborazo hay una incidencia de 5.55% de tuberculosis en bovinos machos (1 de 18) y 2.22% en hembras (1 de 45), esto se realizó mediante una prueba tuberculina en el pliegue ano caudal (14).

### **2.2.1.1. Infección por *Mycobacterium bovis***

*M. bovis* posee uno de los más amplios espectros de hospedadores entre los patógenos conocidos, la epidemiología de esta infección es muy compleja y engloba interacciones entre el hombre, animales domésticos y animales salvajes. Entre los posibles hospedadores de esta especie se encuentran el hombre, los primates no humanos, vaca, cabra, oveja, cerdo, jabalí, caballo, asno, gato, perro, ciervo, bisonte, búfalo, antílope, oryx, camello, llama, alpaca, reno, tejón, opossum, liebre, conejo, hurón, feneco, elefante, jirafa, rinoceronte, tigre, león, foca etc... En el ganado bovino, los resultados de infecciones experimentales por las vías respiratoria y digestiva, junto a la distribución de las lesiones encontradas en el ganado naturalmente infectado, muestran que aproximadamente un 80-90% del ganado se infecta por inhalación. Incluso en terneras ésta es la vía más importante, aunque en este un grupo de animales que puede ser infectado por vía digestiva. Parece ser que, aunque un número relativamente alto de bacilos se eliminan por las heces (con la consiguiente contaminación de los pastos), las terneras que pastan en estos campos no suelen contraer la infección hasta que no son estabuladas, momento en que la transmisión por vía aerógena cobra mayor importancia (15).

En la epidemiología de la infección por *M. bovis* se describen dos tipos de hospederos: los de manutención y los incidentales. Los primeros son capaces de infectarse, enfermar y diseminar la bacteria a otros individuos susceptibles, permitiendo el establecimiento de la infección en sus poblaciones. Los hospederos incidentales en cambio (conocidos como “spillover hosts”), son capaces de infectarse y cursar con la enfermedad, pero la diseminación a otros individuos es infrecuente, requiriendo una fuente externa de infección para mantener la enfermedad en la población (8).

El ser humano se encuentra en este grupo. Del total de especies susceptibles a *M. bovis*, unas pocas corresponden a hospederos de manutención y la gran mayoría se clasifican mejor como hospederos incidentales. No se ha demostrado predisposición genética de determinados hospederos a la infección por *M. bovis*, ni mayor susceptibilidad debido a edad, sexo o estado reproductivo (8).

#### **2.2.1.2. Presentación**

En los bovinos adultos la tuberculosis es habitualmente de inicio pulmonar, transmitida entre ellos por las microgotas producidas al toser. Es mucho más frecuente en vacas de tambo debido a que tienen un período de explotación más largo que las de carne y la frecuencia de la tuberculosis aumenta con la edad, se reúnen dos veces por día en espacios reducidos para el ordeño, lo cual facilita la transmisión aerógena y soportan el esfuerzo de la producción láctea. En los terneros se puede presentar inicio digestivo intestinal si se infectan a partir de la leche (2).

#### **2.2.1.3. Tuberculosis bovina: características, estado y proyecciones de control**

La enfermedad en el ganado genera una disminución de la productividad y por ello las pérdidas tendrán una relación directa con la prevalencia. La diseminación de la infección se produce por lo general sin que inicialmente se adviertan los signos clínicos de la enfermedad, que muchas veces se manifiestan tardíamente (16).

La principal vía de ingreso de la infección en los rebaños es mediante la introducción de bovinos enfermos o portadores de *M. bovis*. Debido a que el sistema respiratorio es la principal ruta por la cual ocurre y se disemina la infección, el contacto directo de nariz con nariz (lo que puede ser causa también de infección entre planteles vecinos) y el uso compartido de bebederos y comederos, son factores de gran riesgo que aumentan proporcionalmente con el tamaño del rebaño y la concentración de los animales. Todos los bovinos infectados son una fuente potencial de diseminación y una alta proporción de ellos excretarán *M. bovis* en algún momento de su vida. La importancia de la vía aérea en la transmisión se explica por la baja dosis infectiva que requiere *M. bovis* en el tejido pulmonar, con la posibilidad incluso de que una sola bacteria establezca una infección efectiva en el bovino a través de esta ruta (16).

Estudios epidemiológicos sugieren que los factores de riesgo más importantes en la ocurrencia y diseminación de la tuberculosis bovina dentro de un rebaño son el número de

animales infectados, la cantidad de animales susceptibles y las medidas tendientes a prevenir la diseminación. A pesar de que no todos los animales infectados transmiten la enfermedad, aquellos con cuadros respiratorios o con mastitis tuberculosa son los más infecciosos, y en muchos de éstos las micobacterias pueden estar presentes en orina, secreciones genitales, semen o deposiciones, lo que facilita su transmisión (16).

En América Latina la mayoría de los países emprenden iniciativas de control de la tuberculosis, pero aun así se estima que un 24% de la población bovina no está bajo ningún sistema de control de la enfermedad. Los datos de ocurrencia de tuberculosis en los países de la región son limitados y no pueden ser comparados, debido a que se refieren a poblaciones heterogéneas, o específicamente a cuencas lecheras y no a todo el país, a veces presentados como incidencia y a veces como prevalencia, u obtenidos mediante encuestas sanitarias realizadas sobre rebaños en los que no se aplica ninguna medida oficial de control, existiendo en el país además otra categoría de rebaños en programas voluntarios de certificación.

#### **2.2.1.4. Período de incubación**

Los síntomas de la tuberculosis generalmente tardan meses en desarrollarse en el ganado. Las infecciones también pueden permanecer latentes durante años y reactivarse durante períodos de estrés o en animales viejos (17).

##### **a. Tuberculosis primaria o período del complejo primario.**

La lesión se inicia en el órgano que actúa como puerta de entrada, en este lugar se establece el primer contacto fértil entre el Mycobacterium y el organismo, el cual se conoce como foco primario, en este punto de anidamiento del bacilo se desencadenan una serie de reacciones histológicas locales y una reacción general orgánica (Thoen y Ebel, 2006). Posteriormente o en algunos casos simultáneamente los bacilos drenan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales, produciéndose una adenopatía, originando una lesión similar a la del foco primario, generalmente son vehiculizados por los macrófagos. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el nódulo linfático regional constituye el complejo primario. Al producirse el complejo primario pulmonar, el bacilo penetra en los pulmones, se multiplica y se disemina en el mismo órgano, produciendo lesiones en forma de tubérculo que se traducen en signos clínicos, infectando al mismo tiempo los nódulos linfáticos bronquiales (12).

## **b. Tuberculosis secundaria o período de diseminación post primaria**

La infección se desarrolla a partir de la reactivación de una lesión antigua, al disminuir los mecanismos de defensa del animal (reinfección endógena) o por una nueva infección externa (reinfección exógena), también denominada tuberculosis extra primaria (aquí agregar la cita en el formato correspondiente). Los bacilos, dan origen a granulomas en los órganos donde se detienen; la extensión o diseminación de las lesiones se puede realizar por vía linfática, sanguínea o por contacto seroso. En el caso de diseminación por vía sanguínea los focos de infección se producen sobre todo en los pulmones, riñones, hígado y bazo; pudiendo llegar a los huesos, articulaciones, peritoneo, meninges. La tuberculosis extra pulmonar es menos común que la pulmonar (12).

### **2.2.1.5. Morbilidad y mortalidad**

En países con programas de control, la tuberculosis generalmente se manifiesta en 1 ó 2 animales del grupo. En 2 estudios de transmisión en el ganado bovino reactor, infectado naturalmente, del 0 al 40% de los casos susceptibles se infectaron y del 0 al 10% desarrollaron lesiones considerables. La gravedad de la enfermedad varía según la dosis del agente infeccioso y la inmunidad individual. Los animales infectados permanecen asintomáticos, se enferman únicamente después de sufrir estrés o envejecer; o bien, desarrollan una enfermedad crónica, debilitante y mortal. En los países desarrollados, la mayoría de los reactores se detectan durante análisis de rutina y la mortalidad es poco frecuente.

En los huéspedes no bovinos que mantienen la infección, la prevalencia y la gravedad de la enfermedad varían según la especie. En Irlanda, en algunos estudios se detectó que más del 40% de los tejones apartados portaban *M. bovis*. La mayoría de estos animales permanecieron sin afección: 50 al 80% de los tejones infectados no presentaron lesiones visibles y 5% o menos desarrollaron la enfermedad en forma generalizada. Por el contrario, la enfermedad generalmente es progresiva y mortal en los opósums de cola blanca en Nueva Zelanda; si bien más del 50% pueden estar infectados en ciertos lugares, la prevalencia de la infección en esta especie en general es del 1 al 10%. En la población de ciervos de cola blanca de Michigan, la prevalencia anual varía del 2% al 4%. En las regiones afectadas de Canadá, la prevalencia de *M. bovis* en alces silvestres parece ser del 1%, pero en los machos adultos puede ser de casi el 5%. Cuando la tuberculosis bovina no se controla en el ganado,

se puede observar una alta incidencia de la enfermedad en gatos; hasta el 50% de estos se pueden infectar en las granjas (17).

#### **2.2.1.6. El hospedero: resistencia natural a la tuberculosis.**

Es un hecho que varias características del hospedero, tales como la edad, el funcionamiento del sistema inmune, la desnutrición o la presencia de ciertas enfermedades son factores clave para el desarrollo de la tuberculosis activa. Pero además de estos factores, varios estudios han sugerido que tanto en humanos como en animales podría haber factores genéticos que predispongan a la enfermedad (18).

Esto resulta interesante en el caso de la TB bovina, para cuyo control una herramienta prometedora sería la identificación, caracterización y selección de bovinos naturalmente resistentes. La capacidad de controlar con eficiencia una infección es un aspecto poco considerado en la selección de las especies domésticas. La imperante necesidad de proveer mayor volumen de alimento a la población humana, ha centrado la atención sobre cualidades productivas, sin considerar la resistencia natural de algunos individuos a las enfermedades. Por lo anterior se hace necesaria la generación de un mayor conocimiento sobre los mecanismos de resistencia natural a ciertos patógenos, como *M. bovis*. La resistencia natural a enfermedades se define como la capacidad que tiene un individuo a no enfermarse cuando es expuesto a agentes patógenos sin que haya habido previa exposición o inmunización (19).

#### **2.2.2. ¿Cómo prevenir o controlar esta enfermedad?**

El método habitual para controlar la TB consiste en una prueba individual de detección seguida del sacrificio de los animales infectados. También han resultado muy útiles para contener o eliminar la enfermedad los programas de erradicación consistentes en: examen post mortem de la carne, medidas intensivas de vigilancia (comprendida la inspección de explotaciones), realización sistemática de pruebas individuales en los bovinos y eliminación de los animales infectados o que hayan estado en contacto con la infección, así como el control de los desplazamientos de los animales. En los exámenes post mortem se buscan tubérculos en los pulmones y ganglios linfáticos (Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE). La detección de los animales infectados impide que su carne penetre en la cadena alimentaria y pone a los servicios veterinarios tras la pista de su rebaño de origen, que es sometido a pruebas y, en caso necesario, eliminado. La pasteurización de la leche de animales infectados hasta una temperatura suficiente para matar a las bacterias ha

impedido que la enfermedad se propague en poblaciones humanas. Rara vez se intenta administrar un tratamiento a los animales infectados, porque resulta muy caro y prolongado, y porque el gran objetivo último se cifra en erradicar la enfermedad. En medicina humana se practica la vacunación, que sin embargo en los animales no se aplica a gran escala como medida preventiva: las vacunas animales existentes presentan una eficacia variable e infértil en con la realización de pruebas destinadas a erradicar la enfermedad. Actualmente se están ensayando una serie de nuevas vacunas experimentales (20).

### **2.2.3. La prevención de la TB mediante vacunación**

A partir de un aislado de *M. bovis*, los médicos franceses Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron el siglo pasado una cepa atenuada (el Bacilo de Calmette y Guérin o BCG) que es actualmente utilizada como vacuna para humanos en numerosos países. El BCG, que comenzó a ser utilizado en 1921, ha sido la vacuna de mayor uso en el mundo. Pero la protección conferida por esta vacuna varía enormemente, especialmente para el control de la tuberculosis pulmonar, para la cual se ha estimado un 50% de protección en promedio (21).

El desarrollo de vacunas más eficaces resulta apremiante. Sin embargo, tomando en cuenta la emergencia actual de la TB, numerosos expertos señalan la conveniencia de cubrir poblaciones con alta prevalencia de la enfermedad con la vacunación con el BCG, práctica que ha sido adoptada tanto en países en desarrollo como en grupos específicos de países desarrollados (22).

El caso de la prevención de la TB bovina resulta distinto. Para tal efecto, se aplican medidas como la identificación de animales infectados, eliminación y sacrificio, cuarentena de los hatos, y decomiso de órganos y canales. Durante muchos años se ha puesto en tela de juicio la efectividad del BCG para reducir la TB bovina, y un problema que ha impedido su práctica es la interferencia de la vacunación con la prueba de la tuberculina, lo cual condiciona la venta y exportación de animales y sus productos. Fernando Díaz Otero evaluó recientemente el grado de protección conferida por el empleo de la vacuna BCG3 o de proteínas del filtrado de cultivo (CFP, de las siglas en inglés culture filtrate proteins) de *M. bovis* contra la TB bovina, así como el efecto inmunomodulador del interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) en la respuesta de bovinos inmunizados con CFP. Para ello utilizó becerras Holstein de 8-12 meses de edad, sanas, y evaluó la protección al reto con una cepa silvestre de *M. bovis* (vía intratraqueal) en 4 grupos de animales: un grupo control no inmunizado, un segundo grupo inmunizado con

CFP de *M. bovis*, un tercer grupo inmunizado con CFP de *M. bovis* + IFN $\gamma$ , y un cuarto grupo vacunado con *M. bovis* BCG cepa Pasteur. De acuerdo con los resultados obtenidos, aunque los tres grupos de animales tratados presentaron una reducción en el grado y extensión de lesiones con respecto al grupo control, fue la inmunización con BCG la que mayor protección confirió, tanto por la reducción de las lesiones a nivel histopatológico como por la mayor producción de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de sangre periférica. Dos animales del grupo vacunado con el BCG se mostraron, inclusive, libres de lesiones, mostrando que el uso del BCG podría ser una excelente herramienta para disminuir la TB bovina (23).

#### **2.2.4. LAMP.**

El ensayo LAMP (amplificación isotérmica mediada por un lazo) del inglés Loop mediated isothermal amplification, fue reportado por primera vez en el año 2000 por Notomi ; este ensayo amplifica ADN con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas (60 – 65°C) en un tiempo relativamente corto (30 min a 1h) (9).

La técnica LAMP, al igual que la PCR, tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN (secuencia diana), lo que permite la detección altamente sensible de patógenos. La reacción LAMP es isotérmica, es decir toma lugar a una sola temperatura, lo que constituye una importante ventaja por sobre la PCR convencional. LAMP utiliza una enzima polimerasa de ADN cuya propiedad es la del desplazamiento de la cadena de ADN junto con su propiedad habitual de polimerización. El nivel de sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP es superior en contraste con las pruebas de PCR. Adicionalmente, LAMP amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez. La amplificación por medio de LAMP también puede ser cuantitativa y depende del desplazamiento de la cadena por autociclado, realizado por la ADN polimerasa (24).

Otra ventaja de LAMP en comparación de la PCR y otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos es que no requiere termocicladores, ya que puede llevarse a cabo en dispositivos de calefacción simples tales como baño maría o bloque de calor de laboratorio (25).

El ensayo de LAMP involucra dos tipos de reacciones de amplificación de templados a partir de una estructura de asa formada en el extremo terminal 3' y la unión y elongación de nuevos primers de la región de asa. Se utilizan 4 primers, dos primers que flanquean la región de

interés denominados: F3, que es el primer externo en sentido, y B3, primer externo reverso; y los otros dos primers son: el primer FIP, interno en sentido y BIP, externo en reverso. Estos 4 primers reconocen 6 regiones distintas en un gen de interés (26).

El uso de una enzima termoestable hace de LAMP una técnica amigable que encaja en los parámetros de ser un método completo y eficaz. Las enzimas con capacidad recomendada son Bst polimerasa aislada de *Bacillus stearothermophilus* y Bsm polimerasa aislada de *Bacillus smithii* cuya actividad enzimática es de 66°C y 63°C respectivamente. Estas enzimas tienen actividad similar a la helicasa por lo que es capaz de abrir la cadena de ADN a una temperatura óptima entre 60 y 65°C, desnaturalizándose a temperaturas por encima de 70°C. Estas características hacen que sea útil en la amplificación isotérmica ya que no requieren el paso de 90°C requerido para desnaturalizar el ADN como el caso de la PCR convencional (24).

### **Toma de muestras**

En la necropsia, las muestras para cultivo se deben recolectar de los ganglios linfáticos anormales y de los órganos afectados como los pulmones, el hígado y el bazo. Estas muestras se deben recolectar en recipientes limpios y preferentemente esterilizados; las ambientales crecen con mayor rapidez que *M. bovis* y la contaminación con estos organismos puede arrojar falsos negativos. Las muestras se deben enviar al laboratorio rápidamente dado que el envío inmediato aumenta la posibilidad del aislamiento de *M. bovis*. Si el envío debe demorarse, las muestras se pueden refrigerar o congelar. Si no es posible refrigerarlas o congelarlas, se puede agregar 0,5% (peso/volumen) de ácido bórico por una semana o menos. También se deben recolectar muestras para histopatología (17).

### **2.2.5. El empleo de la prueba intradérmica usando el derivado proteínico purificado (PPD)**

El empleo de la prueba intradérmica usando el derivado proteínico purificado (PPD) como antígeno, ha sido una herramienta indispensable para detectar ganado bovino infectado con *M. bovis*. Sin embargo, su sensibilidad es insuficiente, así como su especificidad, debido a infecciones por otras micobacterias como *M. avium*, *M. paratuberculosis* o micobacterias atípicas (27).

Otro problema de la prueba intradérmica reside en que no detecta animales sin hipersensibilidad tardía (HT) hacia *M. bovis*, denominados anérgicos, ya sea con una

infección diseminada o con una infección reciente, debido a que en estos casos la inmunidad celular se encuentra deprimida o en proceso de desarrollo (28).

Los animales anérgicos son extremadamente susceptibles a infecciones por microorganismos intracelulares. En bovinos se han descrito factores asociados con la disminución de la respuesta inmune mediada por células, tales como la administración de corticoesteroides, infecciones con el virus de diarrea viral bovina, la influencia del estado de gestación y lactancia. Estos animales, al parecer, producen niveles bajos de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), tanto en células estimuladas con diferentes fracciones de antígenos de *M. bovis*, como con PPD bovino bajo condiciones in vitro (29).

### **2.2.6. Prueba de tuberculina.**

El método estándar para la detección de la tuberculosis bovina es la prueba de la tuberculina, que comprende la inyección intradérmica de tuberculina PPD bovina y la consiguiente detección de hinchazón (hipersensibilidad retardada) en el sitio de la inoculación 3 días después. Esto se puede llevar a cabo utilizando sólo tuberculina bovina o, en una prueba comparativa, con tuberculina aviar y bovina. La prueba de la tuberculina se realiza en el medio del cuello, pero también se puede realizar en el pliegue caudal de la cola. La piel del cuello es más sensible a la tuberculina que la de la cola. Para compensar esta diferencia, se pueden utilizar mayores dosis de tuberculina en la cola. No se recomienda utilizar esta prueba cuando la epidemiología sugiere que la población o el animal han estado en contacto con animales infectados, pues puede originar respuestas negativas falsas y un descenso en la sensibilidad de la prueba (30).

Si sólo se utiliza una prueba de tuberculina, la erradicación completa resulta difícil ya que puede haber respuestas falsas negativas en la fase inicial de la enfermedad y en animales con infección grave. La prueba intradérmica comparativa de la tuberculina se utiliza para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina bovina por exposición a otras micobacterias. Esta sensibilización se debe a la gran reactividad cruzada existente entre especies de micobacterias y géneros relacionados. La prueba consta de la inyección intradérmica de tuberculina bovina y de tuberculina aviar en sitios diferentes, por lo general, en el mismo lado del cuello, y la medida de la respuesta 3 días después (31).

### **2.2.7. Los exámenes histopatológicos**

Los exámenes histopatológicos y el cultivo bacteriológico son los métodos más confiables para la detección de micobacterias en animales en quienes se sospecha infección por *M. bovis* y otras micobacteriosis. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas se ve afectada por varios factores, que van desde la correcta toma de la muestra, el medio de transporte utilizado, el tiempo de procesamiento de la muestra, los métodos de desinfección de la muestra para el cultivo bacteriológico, la cantidad de micobacterias viables y el control de micobacterias por el sistema inmune del huésped, entre otros (32).

### **2.2.8. Diagnóstico directo**

Otras pruebas disponibles para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos, las cuales son de poca o ninguna aplicabilidad en bovinos. Estas se han desarrollado y estudian la respuesta de tipo celular, detectando la presencia de citocinas circulantes, incluyen: a) Coloración (Baciloscopia), actualmente siguen constituyendo la forma más rápida y económica para diagnosticar la tuberculosis bovina. No obstante, dado que su sensibilidad (40-70% en muestras respiratorias) y su especificidad no son absolutas, es necesario realizar siempre cultivos para un diagnóstico de certeza. Las dos más utilizadas son:

- La tinción de Ziehl-Neelsen. Utiliza fucsina y fenol junto con el calentamiento de las preparaciones. Las micobacterias se tiñen de rojo, colorante que perdura pese a la posterior decoloración con una mezcla de alcohol-clorhídrico, sobre un fondo azul o verde, según se utilice como colorante de contraste el azul de metileno o la verde malaquita. Exige la observación con el objetivo de inmersión (1.000 aumentos), por lo que, debido a que en muchas preparaciones la presencia de bacilos puede ser escasa, es necesario un mínimo de 10 minutos de observación antes de valorar el examen como negativo (33).

- Las tinciones con fluorocromos. Emplean como primer colorante la auramina-rodamina. Se tiñen en frío y no se decolora con la mezcla de alcohol-ácido clorhídrico. Al observarlos en un microscopio de fluorescencia, las micobacterias emiten una luz fluorescente. Esta luz emitida puede ser detectada rápidamente. Las preparaciones se observan con un objetivo de menor aumento, con lo que la superficie visualizada es mayor, lo cual hace que la tinción resulte más sensible y requiera menos tiempo de observación (1-2 minutos). Los inconvenientes de esta técnica son la dificultad del enfoque, que requiere un microscopio de fluorescencia, que algunas micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido puede que no se tiñan, que puede a la larga dañar la vista del observador y, sobre todo, que es necesario personal con suficiente experiencia para visualizarlas. La decisión de utilizar una u otra en

cada laboratorio está en función del número de bacilos copias que se realizan, la dotación de personal (su número y su experiencia) y del material disponible. En una jornada laboral un solo observador es prácticamente imposible que pueda ver más de 15-20 tinciones de Ziehl con garantías, mientras que podría ver 50-60 tinciones (33).

### **Prevalencia**

La prevalencia es una proporción que indica la frecuencia de un evento. En general, se define como la proporción de la población que padece la enfermedad en estudio en un momento dado, y se denomina únicamente como prevalencia (p) (34).

Como todas las proporciones, no tiene dimensiones y nunca puede tomar valores menores de 0 o mayores de 1. A menudo, se expresa como casos por 1 000 o por 100 habitantes. En la construcción de esta medida no siempre se conoce en forma precisa la población expuesta al riesgo y, por lo general, se utiliza sólo una aproximación de la población total del área estudiada. Si los datos se han recogido en un momento o punto temporal dado, p es llamada prevalencia puntual. La prevalencia puntual es la probabilidad de un individuo de una población de ser un caso en el momento t, y se calcula de la siguiente manera:

$$p = \frac{\text{numero total de casos existentes al momento } t}{\text{total de la poblacion en el momento}} (x 10n)$$

La prevalencia de una enfermedad aumenta como consecuencia de una mayor duración de la enfermedad, la prolongación de la vida de los pacientes sin que éstos se curen, el aumento de casos nuevos, la inmigración de casos (o de susceptibles), la emigración de sanos y la mejoría de las posibilidades diagnósticas. La prevalencia de una enfermedad, por su parte, disminuye cuando es menor la duración de la enfermedad, existe una elevada tasa de letalidad, disminuyen los casos nuevos, hay inmigración de personas sanas, emigración de casos y aumento de la tasa de curación. En resumen, la prevalencia de una enfermedad depende de la incidencia y de la duración de la enfermedad.

Dado que la prevalencia depende de tantos factores no relacionados directamente con la causa de la enfermedad, los estudios de prevalencia no proporcionan pruebas claras de

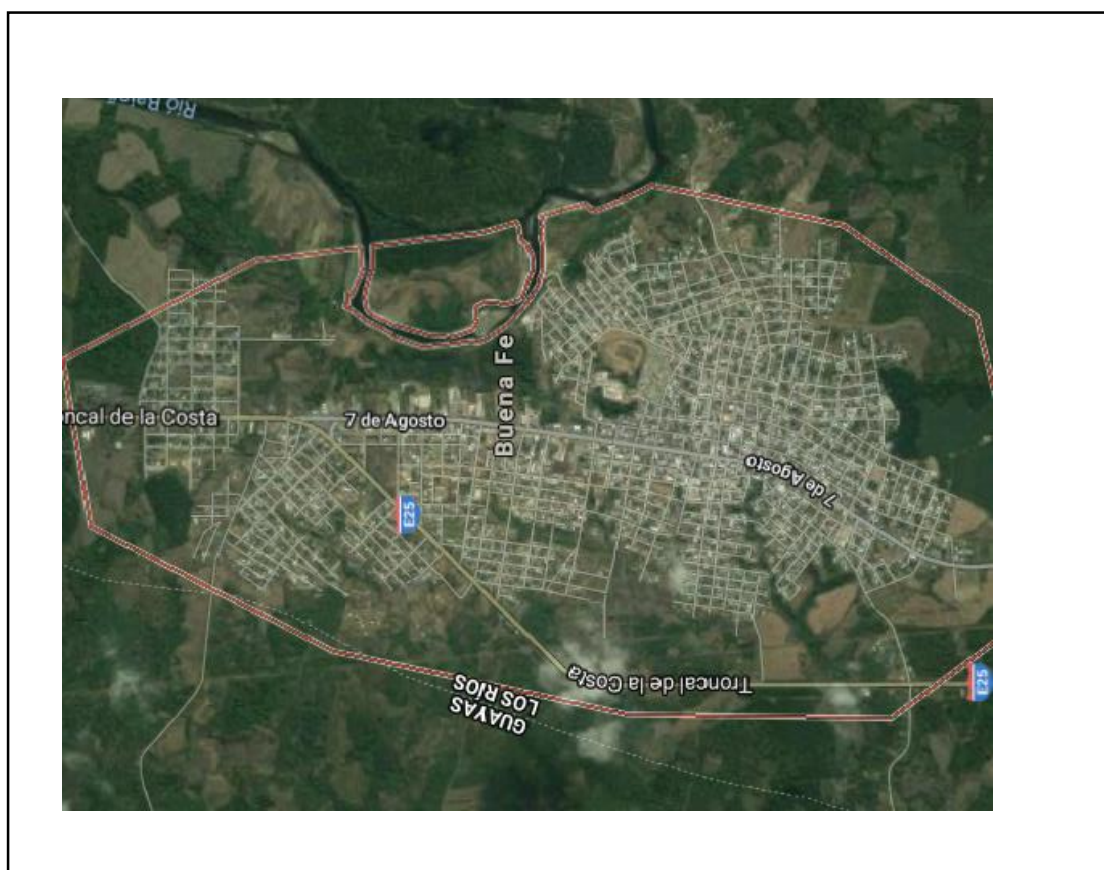
causalidad, aunque a veces puedan sugerirla. Sin embargo, son útiles para valorar la necesidad de asistencia sanitaria, planificar los servicios de salud o estimar las necesidades asistenciales (34)

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Localización.

#### 3.1.1. Trabajo de campo

Esta investigación se realizó en el Camal Municipal del cantón Buena Fé (0°53'35"S 79°29'27"O) donde se tomo la muestra de tejido pulmonar para la detección de la tuberculosis bovina. Se localiza al centro de la región litoral del Ecuador, en una extensa llanura, en la orilla derecha del río Quevedo a una altitud de 102 msnm y con un clima lluvioso tropical de 27°C en promedio. (**Ilustracion 2**).



*Ilustración 2. Mapa del cantón Buena Fé*

### **3.1.2. Análisis de laboratorio**

La extracción de ADN de los pulmones de los bovinos fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal Quevedo, campus Manuel Haz Álvarez, ubicado en la Av. Quito km. 1 1/2 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. La ubicación geográfica es de 01° 06` 30” de latitud sur y 79° 29` 30” de latitud oeste y a una altura de 120 metros sobre el nivel del mar.

La técnica de Lamp se realizó en el laboratorio de Rumiología en la facultad de ciencias pecuarias, que se encuentra Finca Experimental “La María” km 71/2 vía Quevedo.

### **3.2. Tipo de investigación**

El tipo de investigación que se va a realizar es de campo, se efectuará la extracción de tejido pulmonar en el camal municipal del cantón Buena Fe para la detección de *Mycobacterium bovis*.

### **3.3. Método de investigación**

Los métodos que se emplearon en esta investigación es el método de observación, y método analítico estos métodos nos permitirán desarrollar nuestras variables a estudiar y a la toma de muestras que se posteriormente serán analizadas para la detección de la tuberculosis en los animales que se faenan en el Cantón Buena Fe.

### **3.4. Fuentes de recolección de información.**

Se obtendrá información de fuentes primarias por medio de una encuesta sobre la procedencia de los animales. Y fuentes secundarias tales como: libros, revistas, artículos científicos, entre otros.

### **3.5. Diseño de la investigación.**

En esta investigación se evaluó la prevalencia de la tuberculosis bovina en animales faenados en el camal municipal del cantón buena fe, para esto se extrajo ADN del tejido pulmonar y ser evaluado utilizando la técnica de Lamp con los siguientes primers; Primer TB1R, Primer TB1F, Primer MB4, Primer MB5 para la detección de la tuberculosis bovina.

Adema de ser un estudio de diagnóstico, no se utiliza diseño experimental puesto que no hay tratamientos como factores que generen respuestas, únicamente se realizaron cálculos de medidas descriptivas tales como frecuencia y promedios.

### **3.6. Instrumentos de la investigación**

#### **3.6.1. Extracción por el método de TENS**

Para proceder a realizar el diagnóstico de tuberculosis en los bovinos faenados en el camal del cantón Buena Fe para la extracción del ADN de las muestras de tejido pulmonar se utilizó el protocolo de Tens.

Pasos previos a la extracción:

- A. En el caso de muestras de sangre colectadas en EDTA lavar por dos o tres ocasiones con 200 uL de solución salina (CINa 0,9%) y centrifugar por 30 s. Este paso ayudará a eliminar el exceso de proteínas.
- B. En el caso de muestras de tejido hay que macerar aproximadamente 100 mg.

Extracción:

1. Agregar 400  $\mu$ L de tampón de extracción TENS (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 ul de proteinasa K (20 mg/mL).
2. Incubar a 56 °C por 3 hora.
3. Agregar 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1). Homogenizar para formar una emulsión.
4. Centrifugar 10000 rpm 10 minutos.

5. Transferir la parte superior “acuosa” a un nuevo tubo.
6. Agregar 2 volúmenes de Etanol 95% helado. Homogenizar para ayudar a la precipitación del ADN.
7. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
8. Descartar Etanol 95% y resuspender con Etanol al 70%.
9. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
10. Descartar Etanol 70% y dejar secar.
11. Resuspender con 50 µl de TE.

### 3.6.2. Variables a evaluar

Las variables a evaluar son las siguientes:

- **Prevalencia epidemiológica** de la *M. bovis* en el camal Municipal del cantón Buena Fe.

Sexo del animal

Raza del animal

Procedencia del animal

Estas variables a evaluar nos permitieron determinar en qué estado se encuentran los animales y cuáles son sensibles al contagio de esta enfermedad, la procedencia del animal servirá como referencia de donde provienen animales infectados.

### 3.6.3. Tamaño de la muestra

Para la estimación se realizó un muestreo probabilístico que cada elemento de la población tenga la misma posibilidad de ser seleccionado en la muestra (35).

$$n = \frac{z^2 N p q}{e^2 (N - 1) + Z^2 p q}$$

En donde:

n= tamaño de la muestra

Z= nivel de confianza

N= universo

p= probabilidad a favor

q=probabilidad en contra

e=error de estimación

En el camal del cantón Buena Fe se faenan aproximadamente un total de 70 bovinos, esto se tomó como la población (universo), y se trabajó con un nivel de confianza del 90% dando un error estimado del 10%. Dando como resultado de la muestra “n” un total de 35 muestras por semana.

### **3.7. Tratamientos de los datos**

Para la clasificación, registros, tabulación y codificación de los datos de la presente investigación se utilizó la herramienta estadística Microsoft Excel.

### **3.8. Recursos humanos y materiales**

#### **3.8.1. Recursos humanos**

- Plas Choez Leonel Autor del proyecto de investigación
- Personal calificado del camal Municipal del cantón Buena Fe.
- Personal calificado del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

#### **3.8.2. Materiales**

##### **a. Materiales de campo**

- Caja térmica
- Jeringas
- alcohol
- Guantes
- Mandil
- Mascarilla
- Botas de caucho
- Pinzas

##### **b. Equipos de laboratorio**

- Balanza
- Baño maría

- Transiluminador uv
- Microcentrífuga
- Bordex
- Tensiómetro
- Caja electroforence
- Microondas
- Refrigeradora

**c. Materiales de laboratorio**

- Vaso precipitador
- Tubo Falco 15
- Tubo falco 50
- Microtubo 1,5ml
- Puntas transparentes 5 -20 microlitros
- Puntas amarillas
- Puntas azules
- Micropipetas

**d. Reactivos para protocolo de Tens**

- Tris
- HCl
- Lta
- Cloruro de sodio
- Sds
- Cloroformo alcohol isoamil
- Alcohol 95%
- Alcohol 70%
- Protinaza K

### 3.9. Procedimientos.

#### 3.9.1. Toma de muestras.

La toma de muestra de pulmón y ganglios de bovinos se la realizó en el camal municipal del cantón Buena Fe en horarios de 16:00h a 22:00h. Para la recolección de muestra se utilizó mandil, botas, tijeras quirúrgicas, guantes de nitrilo, hielera y pilas.

#### Procedimiento:

- Se procedió a tomar la muestra de pulmón utilizando las tijeras quirúrgicas (previo a la toma de muestra se desinfectaron las tijeras con alcohol al 90% por cada muestra tomada).
- Luego se guardó la muestra en frasco para muestra de orina respectivamente identificada (número de muestra, raza, sexo, lugar, etapa fisiológica, edad) sin alcohol.
- Una vez recolectadas las muestras se transportaron en una hielera el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo para ser almacenada en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 3.9.2. Elaboración de reactivos.

##### 3.9.2.1. Elaboración de TENS

Para la elaboración del protocolo de TENS (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS).

- Se procedió a transformar Tris-HCL 1M a 50m M para un volumen de 50ml

$$c_1=1\text{m} \quad c_2=50\text{m M} \quad v_1=x \quad v_2=50\text{ml}$$

$$v_1 * c_1 = v_2 * c_2$$

$$v_1 = \frac{50\text{ml} * 50\text{m M}}{1000\text{m M}}$$

$$V_1 = 2.5\text{ml o } 2500 \mu\text{l}$$

- Se procedió a transformar EDTA 0.5M a 50m M para un volumen de 50ml

$$c_1=0.5\text{m} \quad c_2=50\text{m M} \quad v_1=x \quad v_2=50\text{ml}$$

$$v_1 * c_1 = v_2 * c_2$$

$$v1 = \frac{50ml * 50m M}{500m M}$$

$$V1 = 5ml \text{ o } 5000 \mu l$$

- Se procedió a transformar NaCL 5M a 100m M para un volumen de 50ml

$$c1 = 5m \quad c2 = 100m M \quad v1 = x \quad v2 = 50ml$$

$$v1 * c1 = v2 * c2$$

$$v1 = \frac{50ml * 100m M}{500m M}$$

$$V1 = 1ml \text{ o } 1000 \mu l$$

- Se procedió a transformar SDS 10% a 1% para un volumen de 50ml

$$c1 = 10\% \quad c2 = 1\% \quad v1 = x \quad v2 = 50ml$$

$$v1 * c1 = v2 * c2$$

$$v1 = \frac{50ml * 1\%}{10\%}$$

$$V1 = 5ml \text{ o } 5000 \mu l$$

### 3.9.2.2. Elaboración de TE

Para la elaboración de TE (10m M Tris, 1m M EDTA)

- Se procedió a transformar Tris 1m a 10m M para un volumen de 50ml

$$c1 = 1M \quad c2 = 10m M \quad v1 = x \quad v2 = 50ml$$

$$v1 * c1 = v2 * c2$$

$$v1 = \frac{50ml * 10m M}{1000m M}$$

$$V1 = 0.5ml \text{ o } 500 \mu l$$

- Se procedió a transformar EDTA 0.5m a 1m M para un volumen de 50ml

$$c1 = 0.5M \quad c2 = 1m M \quad v1 = x \quad v2 = 50ml$$

$$v1 * c1 = v2 * c2$$

$$v1 = \frac{50ml * 1m M}{500m M}$$

V1=0.1ml o 100µl

### **3.9.2.3. Elaboración de TAE 1X**

Para la preparación de TAE 1X se procedió a diluir 20 ml de TAE 10X en 980ml de agua destilada.

### **3.9.3. Extracción de ADN.**

Para la extracción del ADN de las muestras de pulmón y ganglios se utilizó el protocolo de tens.

- Se procedió a macerar la muestra de pulmón y ganglios para esto se utilizó nitrógeno líquido para solidificar la muestra y proceder a la trituración utilizando un mortero.
- Una vez macerada la muestra se extrajo aproximadamente 100mg en un microtubo.
- Por cada muestra macerada se desinfectaba los materiales de trabajo con alcohol y las tijeras eran esterilizadas con un mechero.
- Luego se agregaba Agregar 400 µl de tampón de extracción TENS (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 ul de proteinasa K (20mg/ml). y 2 µl de arena
- Se homogenizo en un bordex
- Se procedió a incubar en el baño maría a 56c<sup>o</sup> por 3 horas
- Agregamos 1 volumen (400 µl) de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1). Y homogenizamos para formar una emulsión.
- Centrifugamos 10000 rpm 10 minutos.
- Transfirió la parte superior “acuosa” a un nuevo microtubo.
- Se agregó 2 volúmenes de Etanol 95% helado. Y se homogenizó para ayudar a la precipitación del ADN.
- Se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos.
- Descartamos el Etanol 95% y se resuspendió con Etanol al 70%.
- Centrifugamos a 10000 rpm por 5 minutos.
- Descartar Etanol 70% y dejar secar.
- Luego se colocó 50 µL de TE.

Una vez hecha la extracción del ADN se procedió a la elaboración del gel de agarosa para la verificación del ADN.

- Se preparo un gel de agarosa preparamos una mezcla utilizando 50ml de tae 1x y 0.6g de agarosa.
- Luego se procedió a incubar a 400c<sup>o</sup> por 10min hasta logra una especie de gel.
- En la cámara de flujo de agrego 3 µl de bromuro de etidio.
- Se ubico el gel en molde con una peineta de 13 celdas por 30min.
- Se realizo la migración del ADN en el ..... 90volt\*15min
- Se llevó a la cámara de electroforesis para la visualización del ADN por medio de luz ultravioleta.

#### **3.9.4. Técnica de LAMP**

Para la realzar la técnica de Lamp se utilizaron los siguientes reactivos:

- Betaina
- Tap Polimerasa
- Agua Ultra Pura
- Dntp (5'-trifosfatos de deoxinucleósidos)
- Bufer 10x
- Primer
  - TB1R
  - TB1F
  - MB4
  - MB5

##### **3.9.4.1. Preparación del mix (mezcla) para Lamp.**

Para la preparación del mix es importe considerar el número de muestra que se va a analizar e incluir el control negativo C (-) que sirve como testigo para confirmar que los reactivos no están contaminados.

Del número total de análisis, se aumentará un tubo de reacción en los cálculos de los reactivos que constituyen el mix.

$$N = \text{número de muestras} + C (-) + C (+) + 1$$

$$N = 35 + 1 + 1 + 1 = 38$$

- **Preparación:**

	<b>Para 1 tubo de reacción</b>	<b>Para N tubo de reacción</b>	<b>Concentración final</b>
Agua ultra pura	25.5 ul	38	969 ul
Primer TB1R(20pmol/ul)	2.0 ul	38	76 ul
Primer TB1F(20pmol/ul)	2.0 ul	38	76 ul
Primer MB4(10pmol/ul)	1.0 ul	38	38 ul
Primer MB5(10pmol/ul)	1.0 ul	38	38 ul
Reactivo R1(dNTPs 10Mm)	4.0 ul	38	152 ul
Reactivo R2(Buffer 10x Bst)	5.0 ul	38	190 ul
Reactivo R3(MgSO4 100 Mm)	3.0 ul	38	114 ul
Reactivo R4(Betaina 5M)	4.0 ul	38	152 ul
Bst DNA Pol (8000U/ml)	0.5 ul	38	19 ul
Volumen final	48 ul		1824ul

- Repartimos 48ul de LAMPmix en cada microtubo de 0.2ml
- Añadimos 2ul de ADN extraído a control y mezclar
- Colocamos los tubos en baño María o en un baño seco o un termociclador

- **Programación de la reacción:**

- Etapa 1: Amplificación 65°C, 60min.
- Etapa 2: Inactivación 80°C, 10min.
- Etapa 3: Conservación 4°C, ∞

- **Preparación del Gel para la electroforesis para el análisis de resultados:**

**Preparación del Gel:**

- Se preparó un gel con el 2% de agarosa
- Se dejó entibiar y se colocó el BET (Bromuro de Etidio) a una concentración final de 0.5ug/ml, de una solución madre de 10ug/ml.

**Depósito de las muestras:**

- Se tomó 10ul del producto de Lamp y se mezcló con 2ul de tampón de depósito.
- Se depositó la mezcla en cada pozo del Gel.
- Se anotó el orden de las muestras en el cuaderno de trabajo.

**Migración:**

- Se procedió a colocar la tapa y conectar los electrodos a la fuente de poder (70-100V, por 1 Hora).

**Lectura de resultados:**

- Se colocó el gel en el transiluminador, se colocó el protector para prender la cámara uv.
- Anotamos los resultados en el cuaderno de trabajo.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados y Discusión

### 4.1.1. Resultados de los análisis del laboratorio.

La utilización de la técnica de Lamp nos permitió evidenciar que 157 animales dieron positivos a tuberculosis de 280 que fueron muestreados en camal municipal del cantón Buena Fe, lo que corresponde a un 56.07% de la muestra que presentaron en su material genético el patógeno causante de la enfermedad como es la *Mycobacterium bovis*, este resultado es superior a la que muestra Echeverria G. (11), que mediante una investigación realizada en camal municipal del cantón Cayambe determino la prevalen de tuberculosis bovina en un 4.059% mediante la aplicación de PCR en 271 biopsias, y el 43.93% resultaron negativos como se muestra en la **tabla 1**;

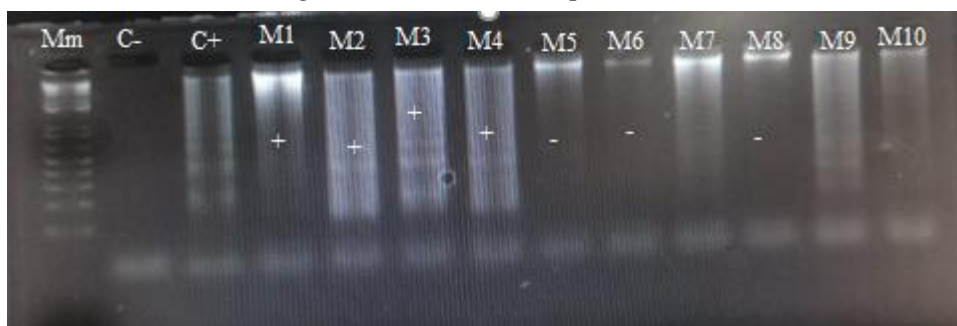
**Tabla 1** Resultados de los análisis del laboratorio

Semanas	Numero De Muestras	Positivos M. Bovis	%	Negativos M. Bovis	%	Total
Semana 1	35	22	62.85	13	37.15	100
Semana 2	35	18	51.42	17	48.57	100
Semana 3	35	20	57.42	15	42.86	100
Semana 4	35	15	42.85	20	57.15	100
Semana 5	35	24	68.57	11	31.42	100
Semana 6	35	21	60.00	14	40.00	100
Semana 7	35	19	54.28	16	45.72	100
Semana 8	35	18	51.42	17	48.57	100
<b>Total</b>	<b>280</b>	<b>157</b>	<b>56.07</b>	<b>123</b>	<b>43.93</b>	<b>100</b>

**Elaborado:** Plúas Choez Leonel Alfonso

Para la poder identificar los animales positivos con la técnica de Lamp se realizó un gel de agarosa como se muestra en la **ilustración 3**.

**Ilustración 3** Gel de agarosa con muestras positivas



Mm: marcador molecular, c-: control negativo, c+: control positivo, m1: número de muestra, +: muestra positiva, -: muestra negativa.

### **Sexo.**

De las muestras positivas, el 72.61% fueron hembras este resultado se asemeja a la muestra Echeverría G. (11) que fue mayor el número de hembras positivas (8/11) a *Mycobacterium bovis* en el camal del cantón Cayambe. Y el 27.39% fueron machos, como se muestra en la **Tabla 2**;

**Tabla 2** Sexo de los animales positivos a *mycobacterium bovis*

<b>Sexo</b>	<b>Positivos</b>	<b>Porcentajes</b>
Hembras	114	72.61
Machos	43	27.39
<b>Total</b>	<b>157</b>	<b>100</b>

**Elaborado:** Plúas Choez Leonel Alfonso

## Edad.

Los animales positivos se encontraban entre las edades de 5 y 6 años con un 80.89% (127/280) como se muestra en la **Tabla 4**, seguido de las edades de 3 y 4 años con 10.83% (17/280). En este trabajo se evidencio que de los 157 animales positivos el 80% correspondieron a animales en edades entre 5-6 años esto concuerda con la Universidad Estatal de Ciencia y Tecnología de Iowa (17), *Los síntomas de la tuberculosis generalmente tardan meses en desarrollarse en el ganado. Las infecciones también pueden permanecer latentes durante años y reactivarse durante períodos de estrés o en animales viejos.* Guamán M. (14), muestra que en la comunidad de Molobog provincia de Chimborazo que de 1 de cada 30 bovinos jóvenes son positivos a *Mycobacterium bovis*, a diferencia de los animales adultos que de cada 25 animales 1 es positivo a tuberculosis.

**Tabla 3** Animales positivos de acuerdo a las razas

Edad (años)	Positivos	Porcentajes
1-2	2	1,27
3-4	17	10,83
5-6	127	80,89
7-8	11	7,01
<b>Total</b>	<b>157</b>	<b>100</b>

**Elaborado:** Plúas Choez Leonel Alfonso

## Raza.

La raza que presentó mayor número de animales positivos fue la Brahman con 52.23% (82/157), y con un 26.11% (41/157) fueron de la raza Holstein, de los 157 animales positivos como se observa en la **tabla 4**.

**Tabla 4** Razas de animales positivos

Raza	Positivos	Porcentajes
Brahman	82	52,23
Holstein	41	26,11
Yersey	10	6,37
Girolando	9	5,73
No hay datos	15	9,55
<b>Total</b>	<b>157</b>	<b>100</b>

**Elaborado:** Plúas Choez Leonel Alfonso

## Procedencia.

En la **tabla 5** se puede observar que el 42.04% de los animales positivos provienen del cantón Santo Domingo, seguido de Patricia Pilar con el 16.56% de los animales positivos a tuberculosis.

**Tabla 5.** Resultados de los positivos de acuerdo a la procedencia

Procedencia	Positivos	Porcentajes
Santo domingo	66	42,04
Patricia pilar	26	16.56
Quevedo	24	15,29
Buena fe	17	10,83
Manabí	11	7,01
Balzar	7	4,46
Buenos aires	6	3,82
<b>Total</b>	<b>157</b>	<b>100</b>

**Elaborado:** Plúas Choez Leonel Alfonso

## Prevalencia

De los 280 animales muestreados que se obtuvieron durante 8 semanas en el camal municipal del Cantón Buena Fe, se determinó que el número de animales infectados por la bacteria *Mycobacterium bovis* agente causal de la tuberculosis es muy alta mostrando una prevalencia del 0.560% como se muestra en la **tabla 6**. Echeverría G.(11) muestra en una investigación realizada en el cantón Pelileo una prevalencia del 0,045 % .

**Tabla 6** Prevalencia de la enfermedad

Animales muestreados	Animales positivos	Prevalencia %
280	157	0,560

**Elaborado:** Plúas Choez Leonel Alfonso

### **Análisis económico.**

Para determinación del costo del diagnóstico de *Mycobacterium bovis* mediante la técnica de Lamp se cuantificó el costo de; materiales, depreciación de equipos, reactivos de Tens, reactivos de Lamp, gel de agarosa para Tens, gel de agarosa para Lamp, dando un costo por muestra de (3.90) tres dólares con noventa centavos, los detalles se muestran la siguiente tabla: **Tabla 11.**

**Tabla 7** Análisis económico

<b>Descripción</b>	<b>Costo por muestra</b>
Materiales	0,43
Depreciación de equipos	1,45
Reactivos de Tens	0,19
Reactivos de Lamp	1,70
Gel de agarosa para tens	0,05
Gel de agarosa para Lamp	0,08
<b>Total</b>	<b>3,90</b>

**Elaborado:** Leonel Alfonso Plusas Choez

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones.

Mediante la aplicación de la técnica de Lamp para la detección de *Mycobacterium bovis* en el camal municipal del Cantón Buena Fe se pudo evidenciar que de 280 animales que se muestrearon, 157 animales dieron positivos a *M. bovis*, patógeno causante de la tuberculosis. Esto evidencia un alto riesgo para la salud de las personas, si el animal presenta un grado avanzado de la enfermedad consumir esta carne aumentará la posibilidad de contraerla bacteria.

La técnica de Lamp nos permitió determinar durante el periodo de la investigación que duro dos meses, una prevalencia de 0.560%, de animales positivos a *M. bovis* en el camal municipal del cantón buena Fe. Los animales más viejos son más susceptibles al contagio de la enfermedad ya que de 280 animales examinados 138 fueron positivos con edades entre 5 y 8 años, esto se debería a una mala nutrición y un mal manejo sanitario por parte de los ganaderos por ende la posibilidad de desarrollarse la enfermedad es mayor.

El análisis económico reflejó que el costo por muestra para la detección de *Mycobacterium bovis* en el camal municipal del cantón buena fe es de tres dólares con noventa centavos de dólar.

## **5.2. Recomendaciones**

- Las muestras de pulmón no deben ser almacenadas con alcohol al 90% debido que baja considerablemente el porcentaje de extracción de ADN de la muestra. La muestra deberá ser almacenada solo en un congelador a -20°C.
- Se deberá rotular el frasco de la muestra con su respectiva identificación.
- En el protocolo de TENS se recomienda incubar a 56°C por 3 horas como mínimo. Si el número de horas de incubación aumenta obtendremos un mejor resultado en la extracción del ADN.
- Se recomienda la disponibilidad del laboratorio las 24 horas del día, ya que se utilizan protocolos que necesitan un determinado tiempo para ser realizados y en algunos casos se deberá repetir el protocolo para obtener un mejor resultado.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBILOGRAFIA**

## Bibliografía

1. Tous G. ¿Ordeñando micobacterias del ganado? Impacto. Resvista MVZ Córdoba. 2010; xv(2).
2. Amasino CF. ENFERMEDADES INFECCIOSAS. In ENFERMEDADES INFECCIOSAS. primera ed. Buenos Aires: Edulp; 2017.
3. Sánchez E,NM,AP,AM,TN,VR. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. Cs.Farm. y Bioq. 2014;(2): p. 127-140.
4. Mori Y,NT. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Infect Chemother. 2005; 15.
5. Notomi T,OH,MH,YT,WK,ANaHT. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [version electronica].. Nucleic Acids Research. 2000;(12).
6. ambientech. ambientech. [Online]. Available from: <https://ambientech.org/blog/enfermedad-infecciosa/>.
7. DABANCH P J. Zoonosis. 2003; xx.
8. Retamal PA&P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Avances en ciencias veterinarias. 2004.
9. Kang S-II MHJYKJLKLRSR. rapid and specific identification of brucella abortus using the loopmediated isothermal amplification(LAMP) assay. Comp Immunol Microbiol Infect dis. 2015; xx: p. 1-6.
10. Martí Cl. madrimasd. [Online].; 2011. Available from: [https://www.madrimasd.org/blogs/salud\\_publica/2010/06/20/131984](https://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2010/06/20/131984).
11. F. GAE. [Online].; 2011. Available from: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/4982>.
12. Coba SV. dspace.espech.edu.ec. [Online].; 2015. Available from: <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/5215>.
13. F. GAE. [Online].; 2011. Available from: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/4982>.
14. Toapanta MDLG. DSpace ESPOCH.. [Online].; 2012. Available from: <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/2126>.
15. CRIADO EL. [Online].; 1996. Available from: <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis//19911996/D/2/D2000501.pdf>.
16. Cousins DV. Mycobacterium bovis infection and control. Aances en ciencias veterinarias. 2001.

17. Universidad Estatal de Ciencia y Tecnología de Iowa. tuberculosis bovina. the center for food security & public health. 2009.
18. IgorKramnikaVictorBoyartchuk. Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait. *Current Opinion in Microbiology*. 2002 Febrero 1; v(1): p. 111-117.
19. Hutt FB. Genetic resistance to disease in domestic animals. Comstock Publishing Associates. 1958.
20. Organización Mundial de Sanidad Animal. [Online]. Available from: <http://www.oie.int/doc/ged/D14008.PDF>.
21. Brewer TF. Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin Vaccine: A Meta-Analysis of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*. 2000 Septiembre 1; xxxi(3): p. 64-67.
22. Tala-Heikkila EOTaMM. Pros and Cons of BCG Vaccination in Countries with Low Incidence of Tuberculosis. Cambridge University Press. 2015; 15(7): p. 497-499.
23. Luz María López Marín FDOAJVM. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica. *Revista Latinoamericana de MICROBIOLOGÍA*. 2006 Junio ; XLVIII (2): p. 173-178.
24. Garrido P. Técnica de amplificación isométrica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el diagnóstico sanitario. *Ecuador es Calidad*. 2016; III.
25. SÁNCHEZ EDWIN NMAPAMTNVR. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Rev.Cs.Farm. y Bioq*. 2014;; p. 127-140.
26. Lira Carmona R, De la Cruz Pérez J. Sistemas de amplificación isotérmica para la detección. *Mensaje Bioquímico*. 2018;; p. 92-102.
27. Francis J SR,WI,OD,LM,FA. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *The Veterinary Record*. 1978 Noviembre; cix(19): p. 420-425.
28. KantorL.BarreraF.ErricoA.Nader VRLND. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Veterinary Science*. 1991; l(3): p. 365-367.
29. Montaña FDbFMaAPaEVaFSGcLF. Secreción de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de sangre periférica bovina estimuladas con fracciones de proteína de Mycobacterium bovis obtenidas por enfoque isoelectrico. *Siencedirect*. 1999; LXV(3): p. 203-212.
30. HENDERSON B. Medicina Veterinaria. segunda ed.: interamericana s.a; 2003.
31. Garcia J. Tuberculosis y paratuberculosis. segunda ed. Guanajuato: Limusa; 2007.
32. Urbina JC. Evaluación del grado de concordancia entre los resultados del examen histopatológico y del cultivo bacteriológico en el diagnóstico de tuberculosis bovina en México. 2015; xxi(31).

33. GUTIERREZ FVO. [Online].; 2017. Available from: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7183/Ojeda\\_Gutierrez\\_Francisco\\_Vidal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7183/Ojeda_Gutierrez_Francisco_Vidal.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
34. Alejandra Moreno-Altamirano CD,MeC,SLMMC,CBMC. Principales medidas en epidemiología. Scielosp. 2000 julio-agosto; XLII(4).
35. Munch L. Metodo y tecnicas de la investigacion. 04th ed. Angeles E, editor. Mexico: Trillas; 2009.

## **CAPITULO VII**

### **ANEXOS**



*Ilustración 5. Corrales del camal del canton Buen Fe*



*Ilustración 4. Faenamiento de los bovinos*



*Ilustración 6. Área de sacrificio y despiece*



***Ilustración 7. Pulmón de bovino***



***Ilustración 8. Esterilización de materiales***



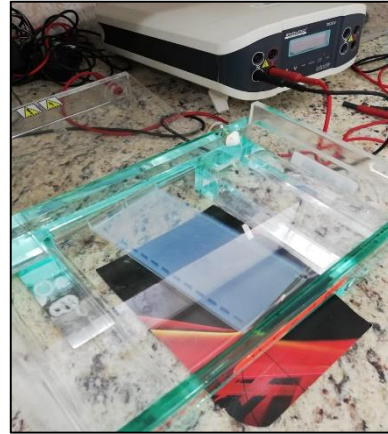
***Ilustración 10. Extracción de muestra del microtubo***



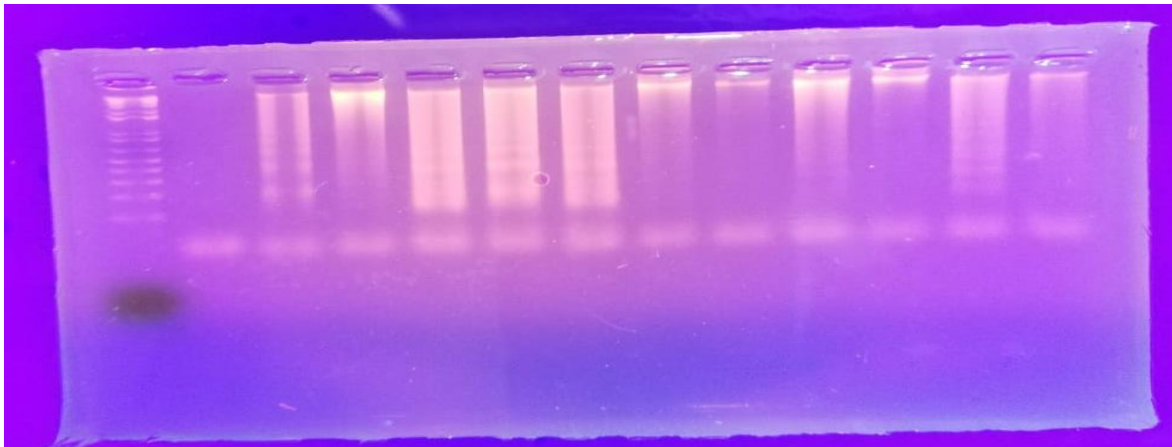
***Ilustración 9. Almacenamiento de las muestras de pulmón***



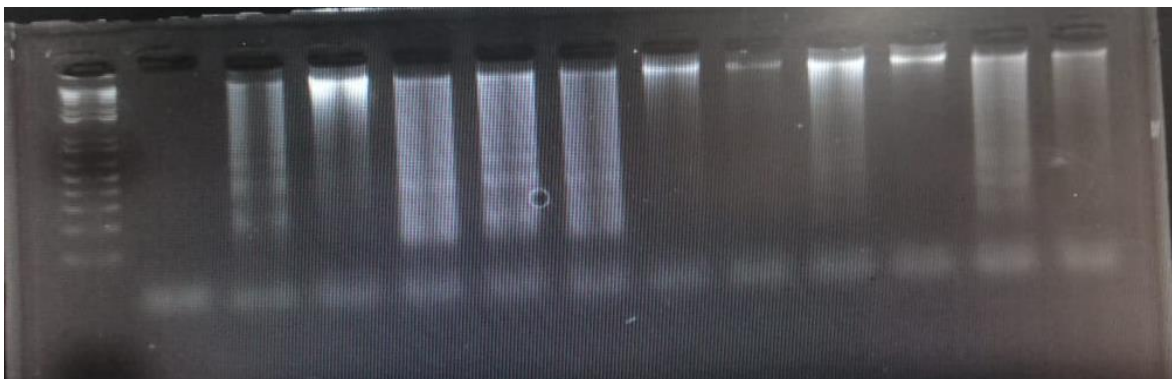
*Ilustración 11. Deposito de la muestra en gel de agarosa*



*Ilustración 10. Cámara de electroforesis con gel de agarosa*



*ilustración 13. Gel de agarosa en el transiluminador*



*Ilustración 12. Gel de agarosa en la cámara foto documentadora*



***Ilustración 15*** Recolección de muestras de pulmón



***Ilustración 14*** Extracción de la muestra



***Ilustración 17*** Bovino positivo con tuberculosis



***Ilustración 16*** Presencia de granulomas en toda la canal

*Tabla 8 Edades de los bovinos*

<b>Edad (años)</b>	<b>Subtotal</b>	<b>Porcentajes</b>
1-2	4	1,43
3-4	29	10,36
5-6	228	81,43
7-8	19	6,79
<b>Total</b>	<b>280</b>	<b>100%</b>

*Tabla 9 Procedencia de los bovinos*

<b>Procedencia</b>	<b>Subtotal</b>	<b>Porcentajes</b>
Santo Domingo	100	35,71
Balzar	19	6,79
Buena Fe	30	10,71
Buenos Aires	11	3,93
Patricia Pilar	3	1,07
Manabí	19	6,79
Quevedo	61	21,79
Rcto. Cuatro Mangas	37	13,21
<b>Total</b>	<b>280</b>	<b>100</b>

*Tabla 10 Sexo de los bovinos*

<b>Sexo</b>	<b>Subtotal</b>	<b>Porcentajes</b>
Hembras	198	70,71
Machos	82	29,29
<b>Total</b>	<b>280</b>	<b>100%</b>

*Tabla 11 Razas de los bovinos*

<b>Razas</b>	<b>Subtotal</b>	<b>Porcentajes</b>
Brahman	158	70,71
Holstein	68	3,21
Girolando	26	9,29
Yersey	10	3,57
No ha hay datos	18	6,43
<b>Total</b>	<b>280</b>	<b>100,00</b>

**Tabla 12** Costo de reactivos para la técnica Lamp

<b>Descripción</b>	<b>Presentación</b>	<b>Valor</b>	<b>valor ul</b>	<b>Cantidad (ul)</b>	<b>subTotal</b>
Protinasa k	10 ml	300	0,03	7,00	0,21
Agua ultra pura	1lt	65	0,000065	25,50	0,002
Primer TB1R(20pmol/ul)	1000ul	40	0,04	2,00	0,08
Primer TB1F(20pmol/ul)	1000ul	40	0,04	2,00	0,08
Primer MB4(10pmol/ul)	1000ul	40	0,04	1,00	0,04
Primer MB5(10pmol/ul)	1000ul	40	0,04	1,00	0,04
Reactivo R1(dNTPs 10Mm)	1000ul	10	0,01	4,00	0,04
Reactivo R2(Buffer 10x Bst)	1000ul	12	0,012	5,00	0,06
Reactivo R3(MgSO4 100 Mm)	1000ul	16	0,016	3,00	0,048
Reactivo R4(Betaina 5M)	1000ul	254	0,254	4,00	1,016
Bst DNA Pol (8000U/ml)	1000ul	180	0,18	0,50	0,09
<b>Total</b>					<b>1,706</b>

**Tabla 13** Costo de materiales

<b>Descripción</b>	<b>Valor/u</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Total</b>
Microtubos 1,5ml	0,032	2	0,064
Puntas amarillas	0,01	3	0,03
Puntas per	0,03	5	0,15
Frasco m/orina	0,14	1	0,14
Puntas azules	0,01	5	0,05
<b>Total</b>			<b>0,434</b>

**Tabla 14** Costo de reactivos para el protocolo de Tens.

Descripción	Precio	Presentación	Gramos		Costo	Presentación		Cantidad	Total
			Costo/Gr/MI	Empleados		Bufere 50ml	Valor		
Bufer tris chl	57,3	100	0,573	0,5	0,2865	50	0,00573	2,5	0,014325
Bufer edta	44	500	0,088	0,5	0,044	50	0,00088	5	0,0044
Nacl	240	3000	0,08	0,5	0,04	50	0,0008	1	0,0008
Sds	1	1000	0,001	2	0,002	50	0,00004	5	0,0002
Fenol 25 cloroformo									
24 isoamil 1	38,84	100	0,3884	0,4	0,15536				
Etanol al 70	20,66	1000	0,02066	0,4	0,008264				
Etanol al 90	20,8	1000	0,0208	0,4	0,00832				
<b>Total</b>									<b>0,19</b>

**Tabla 15** Costo del gel de agarosa al 1%

Descripción	Presentación	Valor	Valor/ul	Cantidad	Total
Tae 1x	1lt	0,52	0,00052	50	0,0002704
Agarosa	1kg	50	0,050	0,60	0,03
Bromuro etidio	10ml	87,5	0,00875	3	0,02625
<b>Total</b>					<b>0,0565204</b>

**Tabla 16** Costo del gel de agarosa al 2 %

Descripción	Presentación	Valor	Valor/ul	Cantidad	Total
Tae 1x	1lt	0,52	0,00052	50	0,0002704
Agarosa	1kg	50	0,050	1,20	0,06
Bromuro etidio	10ml	87,5	0,00875	3	0,02625
<b>Total</b>					<b>0,0865204</b>