



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**Anteproyecto de Investigación
previo a la obtención del título de
Ingeniero Zootecnista.**

Título del Proyecto de Investigación:

“Aplicación de la técnica de lamp en el estudio de (*Mycobacterium Bovis*) en el camal municipal del cantón El Empalme, provincia del Guayas 2018.”

Autor:

Claudio Leonardo Palacios Cobeña

Auspicio Académico:

Director

Dr. Orly Cevallos Falquez

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **CLAUDIO LEONARDO PALACIOS COBEÑA**, 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.

Claudio Leonardo Palacios Cobeña

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Dr. Orly Cevallos Falquez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado **CLAUDIO LEONARDO PALACIOS COBEÑA**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAMP EN EL ESTUDIO DE (*Mycobacterium Bovis*) EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN EL EMPALME, PROVINCIA DEL GUAYAS 2018.**”, previo a la obtención del título de Ingeniero Zootecnista, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN DE PLAGIO

CERTIFICACIÓN

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, el suscrito Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado “**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAMP EN EL ESTUDIO DE (*Mycobacterium Bovis*) EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN EL EMPALME, PROVINCIA DEL GUAYAS 2018.**” de autoría de la estudiante **CLAUDIO LEONARDO PALACIOS COBEÑA**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 5%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

	
Documento	Técnica de LAMP M.bovis 30052019Palacios.docx (D53169616)
Presentado	2019-05-30 02:23 (-05:00)
Presentado por	claudio.palacios2013@uteq.edu.ec
Recibido	fcevallos.uteq@analysis.orkund.com
Mensaje	Tesis Mostrar el mensaje completo
	5% de estas 21 páginas, se componen de texto presente en 1 fuentes.

Atentamente

Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



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

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAMP EN EL ESTUDIO (*Mycobacterium Bovis*) EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN EL EMPALME, PROVINCIA DEL GUAYAS 2018.”

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

Aprobado por:

Dra. Diana Vasco Mora

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Martin González Vélez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Adolfo Sánchez Laiño
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2019

AGRADECIMIENTO

El Autor de la presente investigación deja constancia de su agradecimiento:

A Dios por haberme dado valor, fuerza, perseverancia e instruirme por el camino correcto en la vida.

A mis padres, hermanos y familia que han colaborado positivamente en mi formación personal, intelectual y moral, ya que sin la participación de ellos no hubiera sido posible cristalizar mis aspiraciones en esta magna universidad, templo del saber donde pase momentos maravillosos con mis compañeros.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO, que me abrió sus puertas para pertenecer a esta gran familia de Zootecnistas, y en cuyas aulas sus catedráticos me brindaron sus conocimientos para crecer en mi vida profesional.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a DIOS todo poderoso quien me ha sabido guiar por el buen camino, darme valor y fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los momentos difíciles, enseñándome afrontar las adversidades y salir victorioso en cada una de ellas.

A mi familia para mis padres Mariano Palacios y Rafaela Cobeña por su apoyo incondicional, amor, paciencia, consejos y ayuda en todo momento.

A mis hermanos Mario, Nathaly que más que mis hermanos son mis verdaderos amigos y estuvieron pendientes de mí en todo momento de esta etapa de la vida día a día.

RESUMEN

El estudio de *Mycobacterium bovis* en microbiología a nivel mundial por su efecto social en salud y la economía, por su carácter zoonótica. La bacteria frecuentemente se transmite a mamíferos propagándose por contacto con animales domésticos o salvajes infectados. Lo frecuente es la vía aerogena, al toser o al respirar, vía digestiva. Se contagia al ingerir leche cruda, saliva u otras secreciones de comederos o bebederos contaminados. Las personas pueden infectar al beber o comer productos lácteos no pasteurizados. También carne cruda o mal cocida puede ser fuente de transmisión. A través del contacto directo con una herida, lo que podría ocurrir durante el manejo de los animales, matanza, transporte, ternera. Para la determinación de la enfermedad actualmente se realizan diferentes tipos de métodos y técnicas algunas en periodos de tiempos cortos, pero con una especificidad muy baja, otras con periodos de tiempos largos mayores a 48 horas, costos elevados y bajo porcentaje de especificidad. Con el propósito de Validar la eficiencia de la técnica de LAMP en detección de *Mycobacterium bovis*. Este trabajo se fundamenta con la extracción de nódulos pulmonares de animales con características desfavorables (bajo peso corporal, decaimiento, tos). Sometidos 46 animales por semanas muestreados durante 8 semanas. Aplicando el protocolo de TENS modificado se extrajo el ADN. Seguimiento de (LAMP) alta especificidad, eficacia y rapidez bajo condiciones isotérmicas, llevada a cabo a una temperatura constante Determinando la prevalencia de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis* 122 (33.15%) positivos y 246 (66.85%) negativos de que son faenados en el camal Municipal del cantón El Empalme. Realizado el proceso se obtuvo un costo por reacción de muestra con el uso de la técnica de LAMP para la detección de *Mycobacterium bovis* de \$ 1.81 manteniéndose por debajo del costo en comparación de otras técnicas.

Palabras claves: Aerogena, especificidad, prevalencia.

ABSTRACT

The study of *Mycobacterium bovis* in microbiology worldwide due to its social effect on health and economy, due to its zoonotic nature. Bacterium are often transmitted to mammals by spreading by contact with infected domestic or wild animals. The frequent thing is the airway, when coughing or breathing, via the digestive system. It is spread by ingesting raw milk, salivation or other contaminations of contaminated feeders or drinkers. People can infect when drinking or eating unpasteurized dairy products. Raw or undercooked meat can also be a source of transmission. Through direct contact with a wound, what could happen during the handling of animals, killing, transport, Butcher shop. For the determination of the disease, different types of methods and techniques are currently carried out, some in periods of short times, but with a very low specificity, others with long periods of time greater than 48 hours, high costs and low percentage of specificity. In order to validate the efficiency of the LAMP technique in the detection of *Mycobacterium bovis*. This work is based on the extraction of pulmonary nodules from animals with unfavorable characteristics (low body weight, decay, cough). Subjected 46 animals per week sampled for 8 weeks. DNA was extracted by applying the modified TENS protocol. Following (LAMP) high specificity, efficacy and speed under isothermal conditions, carried out at a constant temperature. Determining the prevalence of bovine infected with *Mycobacterium bovis* 122 (33.15%) positive and 246 (66.85%) negative that are slaughtered in the slaughter center Municipality of the city El Empalme. Once the process was completed, a cost per sample reaction was obtained with the use of the LAMP technique for the detection of *Mycobacterium bovis* of \$ 1.81, remaining below the cost in comparison with other techniques.

Keywords: Respite way, specificity, prevalence.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	iii
CERTIFICACIÓN DE PLAGIO.....	iv
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I	13
1.1. Problema de investigación.....	14
1.1.1. Planteamiento del problema.	14
1.1.2. Formulación del problema.....	14
1.1.3. Sistema del problema.	14
¿Cuál es la incidencia de bovinos faenados con (<i>Mycobacterium bovis</i>)?	14
1.2. Objetivos.....	14
1.2.1. Objetivo general.	14
1.2.2. Objetivos específicos	15
1.3. Justificación.....	15
CAPITULO II.	16
MARCO TEÓRICO.....	16
2.1. Marco conceptual.	17
2.1.1. <i>Mycobacterium</i>	17
2.1.3. Microbiológico.	17
2.1.4. Tuberculosis.	18
2.1.5. Técnica de LAMP.....	18
2.1.6. Incidencia.....	18
2.1.7. Prevalencia.....	18
2.1.8. Zoonosis.	19
2.2. Marco referencial.....	20
2.2.1. Generalidades de la <i>Mycobacterium</i>	20
2.2.2. Fisiología y estructura de las micobacterias.	22
2.2.3. Organización y secuencia del genoma <i>Mycobacterium bovis</i>	22

2.2.4.	Metabolismo en estado de latencia y estado de anaerobiosis.....	23
2.2.5.	Identificación de micobacterias con técnicas en biología molecular.	26
CAPÍTULO III.		33
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		33
3.1.1.	Toma de muestras.	34
3.2.1.	Experimental.....	34
3.3.	Métodos de investigación.....	35
3.4.	Fuentes de recopilación de información.	35
3.5.	Diseño de la investigación.....	36
3.7.	Tratamiento de datos.	40
3.8.	Recursos humanos y materiales.	40
3.8.1.	Humano.....	40
3.9.	Materiales.	40
3.9.1.	Materiales de campo.	40
3.9.2.	Equipo de laboratorio.	41
3.9.3.	Materiales de laboratorio.	41
3.9.4.	Reactivos para protocolo de TENS.....	41
3.10.	Variables a estudiar.....	42
3.10.1.	Razas.	42
3.10.2.	Sexo.....	42
3.10.3.	Peso del animal.	43
3.10.4.	Procedencia.....	43
CAPÍTULO IV		45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		45
4.1.	Resultados	46
4.1.2.	Razas bovinas.	47
4.1.3.	Sexo.	48
4.1.4.	Edad.....	49
4.1.5.	Peso del animal.....	50
4.1.6.	Procedencia.....	50
CAPÍTULO V.....		53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		53

5.1. Conclusiones	54
5.2. Recomendaciones.	55
CAPÍTULO VI.	56
BIBLIOGRAFÍA	56
6.1. BIBLIOGRAFÍA.....	57
CAPÍTULO VII.	63
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. <i>Propiedades de LAMP</i>	31
Tabla 2. <i>Condiciones geográficas del cantón El Empalme</i>	34
Tabla 3. <i>Primers específicos para la detección de M.bovis con la técnica LAMP</i>	37
Tabla 4. <i>Preparación de LAMPmix</i>	38
Tabla 5. <i>Costos por reacción de muestra para la detección de M. bovis</i>	52
Tabla 6. <i>Resultados obtenidos de LAMP para detección de M. bovis</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. <i>Amplificación por la técnica de LAMP en la detección de M. bovis.</i>	39
Figura 2. <i>Se ilustra el análisis de resultados positivos con la técnica de LAMP por semana.</i>	46
Figura 3. <i>Se ilustra el análisis de resultados positivos con la técnica de LAMP por semana.</i>	47
Figura 4. <i>Razas de bovinos que fueron faenado con resultados positivos a M. bovis.</i>	48
Figura 5. <i>Se ilustra la cantidad de animales bovinos por sexo.</i>	48
Figura 6. <i>Se representa resultados positivos a M. bovis referentes a las edades con rango de meses de animales faenadas.</i>	49
Figura 7. <i>Se ilustra resultados positivos a M. bovis referente a los rangos de pesos por animal bovinos faenadas.</i>	50
Figura 8. <i>Se ilustra datos resultados animales positivo a M. bovis respecto a su procedencia.</i>	51

CÓDIGO DUBLÍN

Título :	“APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAMP EN EL ESTUDIO DE (<i>Mycobacterium Bovis</i>) EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN EL EMPALME, PROVINCIA DEL GUAYAS 2018.”		
Autor :	Claudio Leonardo Palacios Cobeña		
Palabra clave:	Aerogena	Especificidad	Prevalencia
Fecha de publicación			
Editorial:			
Resumen:	Resumen. - El estudio de <i>Mycobacterium bovis</i> en microbiología a nivel mundial por su efecto social en salud y la economía, por su carácter zoonótica. La bacteria frecuentemente se transmite a mamíferos propagándose por contacto con animales domésticos o salvajes infectados. Lo frecuente es la vía aerogena, al toser o al respirar, vía digestiva. Se contagia al ingerir leche cruda, saliva u otras secreciones de comederos o bebederos contaminados. Las personas pueden infectar al beber o comer productos lácteos no pasteurizados. También carne cruda o mal cocida puede ser fuente de transmisión. A través del contacto directo con una herida, lo que podría ocurrir durante el manejo de los animales, matanza, transporte, terrena. Para la determinación de la enfermedad actualmente se realizan diferentes tipos de métodos y técnicas algunas en periodos de tiempos cortos, pero con una especificidad muy baja, otras con periodos de tiempos largos mayores a 48 horas, costos elevados y bajo porcentaje de especificidad. Con el propósito de Validar la eficiencia de la técnica de LAMP en detección de <i>Mycobacterium bovis</i>. Este trabajo se fundamenta con la extracción de nódulos pulmonares de animales con características desfavorables (bajo peso corporal, decaimiento, tos). Sometidos 46 animales por semanas muestreados durante 8 semanas. Aplicando el protocolo de TENS modificado se extrajo el ADN. Seguido de (LAMP) alta especificidad, eficacia y rapidez bajo condiciones isotérmicas, llevada a cabo a una temperatura constante Determinando la prevalencia		

	de bovinos infectados con <i>Mycobacterium bovis</i> 122 (33.15%) positivos y 246 (66.85%) negativos de que son faenados en el camal Municipal del cantón El Empalme. Realizado el proceso se obtuvo un costo por reacción de muestra con el uso de la técnica de LAMP para la detección de <i>Mycobacterium bovis</i> de \$ 1.81 manteniéndose por debajo del costo en comparación de otras técnicas. Abstract.- The study of <i>Mycobacterium bovis</i> in microbiology worldwide due to its social effect on health and economy, due to its zoonotic nature. Bacterium are often transmitted to mammals by spreading by contact with infected domestic or wild animals. The frequent thing is the airway, when coughing or breathing, via the digestive system. It is spread by ingesting raw milk, salivation or other contaminations of contaminated feeders or drinkers. People can infect when drinking or eating unpasteurized dairy products. Raw or undercooked meat can also be a source of transmission. Through direct contact with a wound, what could happen during the handling of animals, killing, transport, Butcher shop. For the determination of the disease, different types of methods and techniques are currently carried out, some in periods of short times, but with a very low specificity, others with long periods of time greater than 48 hours, high costs and low percentage of specificity. In order to validate the efficiency of the LAMP technique in the detection of <i>Mycobacterium bovis</i>. This work is based on the extraction of pulmonary nodules from animals with unfavorable characteristics (low body weight, decay, cough). Subjected 46 animals per week sampled for 8 weeks. DNA was extracted by applying the modified TENS protocol. Following (LAMP) high specificity, efficacy and speed under isothermal conditions, carried out at a constant temperature. Determining the prevalence of bovine infected with <i>Mycobacterium bovis</i> 122 (33.15%) positive and 246 (66.85%) negative
--	--

	that are slaughtered in the slaughter center Municipality of the city El Empalme. Once the process was completed, a cost per sample reaction was obtained with the use of the LAMP technique for the detection of <i>Mycobacterium bovis</i> of \$ 1.81, remaining below the cost in comparison with other techniques.
Descripción:	73 hojas: Dimensión, 29 cm x 21cm + CD-ROM
URL:	

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen datos donde se han identificado más de 130 especies de micobacterias, muchas de ellas están asociadas a enfermedad en el hombre (1). A pesar de la abundancia de especies; los grupos que causan la mayor parte de las infecciones en el ser humano son: *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* (1).

La Tuberculosis Bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa producida por una bacteria llamada *Mycobacterium bovis*, este microorganismo se caracteriza por transmitirse a personas al ser de carácter zoonótica, como también a distintas especies de animales domésticos y silvestres (2). Además, es considerado un microorganismo del grupo III de riesgo/peligro, con medidas precautelares, generando un problema de salud pública, también limitando la potencialidad del sector pecuario causando considerables pérdidas económicas, en cuanto a la producción de leche, carne, y todos sus derivados (3).

La T. bovina provoca afecciones en distintas partes del cuerpo, principalmente la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos en pulmones y ganglios linfáticos. Se puede presentar en forma crónica y aguda, afectando a animales de todas las edades, esto depende de diversos factores como son: estado nutricional, manejo, edad, entre otros (3).

La Tuberculosis bovina a nivel mundial es la novena causa de muerte. En 2016 la cifra estimada de muertes por T. bovina fue de 1,3 millones (frente a los 1,7 millones de 2000). Las financiaciones para la atención y la prevención de la TB se dan desde hace más de 10 años, pero sigue existiendo un déficit (US\$ 2 300 millones en 2017) (4).

El riesgo sanitario por zoonosis, especialmente por el consumo de leche o queso crudo, pero también por contacto directo con el animal en la finca o en el matadero. Según un informe estadístico del Ministerio de Salud Pública en el 2013 se contabilizaron 2 938 guayasenses con tuberculosis (5).

En Latinoamérica, en humanos, se registra una baja prevalencia causada por la infección con *M. bovis* (6). Las vacas infectados con *M. bovis*, disminuyen gradualmente su peso vivo, perdiendo un promedio de 15% del peso normal y las pérdidas en el momento del sacrificio en el matadero por decomiso parcial o total de los bovinos, afectan la economía de la finca (7).

Para el diagnóstico de tuberculosis bovina y paratuberculosis se utilizan pruebas intradérmicas: la prueba de tuberculina (PPD bovina y PPD aviar) (6). También, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología que ha facilitado la identificación de microorganismos de una manera precisa y confiable (8). Los avances en la biología molecular han permitido desarrollar varias técnicas de detección que usan diferentes variantes de PCR (9; 10). Como PCR en tiempo real, PCR cuantitativa, PCR de inmunocaptura, y otros (11; 12).

Todas estas técnicas y sus variantes requieren de un laboratorio complejo que disponga de equipos especializados. Diagnóstico son sensibilidad, especificidad, bajo costo, simplicidad, rapidez, adaptabilidad a la temperatura y fácil disponibilidad de equipos (11; 12). Los análisis de PCR basados en métodos de detección de ADN poseen cualidades de especificidad y sensibilidad pero se diferencian por su costo, rapidez, adaptabilidad a la temperatura y requieren de personal altamente calificado para efectuar el proceso (13).

Mientras, la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP por sus siglas en inglés, se destaca por ser una prueba de diagnóstico eficaz y fácil de realizar, a pesar de que el principio y mecanismo de acción es complejo. Esta técnica, 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 (12). Lo interesante es que no existe necesidad de equipos sofisticados y personal altamente especializado, a más de, el tiempo de diagnóstico es viable, pues, permite realizarlo en aproximadamente un día lo que permite tomar acciones oportunas para reducir la vulnerabilidad (12).

En consecuencia, este trabajo tuvo el objetivo de determinar la incidencia de *Mycobacterium bovis* en el camal Municipal del cantón El Empalme, provincia del Guayas, a través de la técnica de LAMP.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

En la actualidad el incremento del número de bovinos afectadas por tuberculosis bovina, esta se da mayormente a causa de un mal control de los posibles agentes causales como lo son los bovinos portadores *Mycobacterium bovis*; Al no existir un adecuado manejo de la alimentación, sanidad y el intercambio de animales de diferentes fincas, tendremos animales posiblemente infectados con *M. bovis* expresando un efecto negativo menor rendimiento dentro de la producción y mayor riesgo de contagio dentro del hato y personal de trabajo.

1.1.2. Formulación del problema.

A causa de un mal manejo en los centros de faenamientos donde se faenan y expenden animales portadores de *M. bovis* con los cuales no se cumpliría las normas sanitarias para la salud pública.

1.1.3. Sistema del problema.

¿Cuál es la incidencia de bovinos faenados con (*Mycobacterium bovis*)?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

- Determinar la incidencia de *Mycobacterium bovis* en el camal Municipal del cantón El Empalme, provincia del Guayas, a través de la técnica de LAMP.

1.2.2. Objetivos específicos

- Validar la eficiencia de la técnica de LAMP en detección de *Mycobacterium bovis*.
- Determinar la prevalencia de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis* que son faenados en el camal Municipal del cantón El Empalme.
- Establecer el costo por reacción de muestra con el uso de la técnica de LAMP para la detección de *Mycobacterium bovis*.

1.3. Justificación.

La sostenibilidad de la ganadería bovina en la región costa por efecto de la alimentación mayormente a pastoreo justificaría los ingresos, pero al existir dos periodos en el año (invierno con precipitación de lluvias y verano sin precipitaciones de lluvia) la producción de forrajes son distintas escaseando en verano temiendo un cambio drástico la mayoría de las ganaderías con animales de muy bajo peso, desnutridos quedando susceptibles al desarrollo de un sin número de enfermedades.

Dentro de las posibles enfermedades que pueden desarrollar la tuberculosis, que puede causar mortalidad en animales y de gran impacto en la salud humana al ser zoonótica. Con la obtención de muestras de tejido pulmonar a los bovinos que son faenados en el camal Municipal del cantón El Empalme, se aplicará la técnica de LAMP, para verificar la incidencia de bovinos positivos a *M. bovis*.

CAPITULO II.
MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual.

2.1.1. *Mycobacterium*.

Se puede entender como una de las enfermedades infecciosas más mortales y prevalentes, la tuberculosis es considerada hoy en día una enfermedad pulmonar que afecta a gran parte de la población mundial, creyéndose que actualmente un tercio de la misma cuenta con algún tipo de infección tuberculosa. Gran parte de ese tercio de población es considerada portadora crónica de la tuberculosis (14).

2.1.2. *Mycobacterium bovis*.

Mycobacterium bovis causa tuberculosis en el ganado, los humanos y otros primates, así como en otros animales como perros, gatos, cerdos, papagayos, entre otros (15). En humanos, el contacto entre ganado y humanos (en especial en la población rural, personal de frigoríficos y de la industria de la carne, veterinarios, laboratoristas, entre otros) (16). Puede producirse por inhalación o ingesta de productos contaminados, a través del consumo de productos lácteos sin pasteurizar, pero la transmisión de persona a persona también ha sido documentada (15).

2.1.3. Microbiológico.

Se describe a la microbiología como la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños, también conocidos como microbios. Sólo visibles a través del microscopio: Pueden ser eucariotas tales como hongos y protistas, procariotas como bacterias. Estos pueden estar constituidos por una sola célula, así como pequeños agregados celulares formados por células equivalentes (17).

2.1.4. Tuberculosis.

Descrita como una enfermedad infecciosa más mortales y prevalentes, la tuberculosis es considerada hoy en día una enfermedad pulmonar que afecta a gran parte de la población mundial, creyéndose que actualmente un tercio de la misma cuenta con algún tipo de infección tuberculosa. Gran parte de ese tercio de población es considerada portadora crónica de la tuberculosis (18).

2.1.5. Técnica de LAMP.

Descrita como la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle, es un método de amplificación de ácidos nucleicos simple, específico, rápido y rentable desarrollado exclusivamente por Eiken Chemical Co., Ltd. (19).

2.1.6. Incidencia.

El término incidencia es sin dudas uno de los más importantes en el campo de la epidemiología ya que tiene que ver con el aumento que una enfermedad o epidemia puede expresar a lo largo del tiempo, permitiendo así su análisis y posible solución (20). Va a contabilizar el número de nuevos casos de la enfermedad que estudiamos, que aparecen en un periodo de tiempo previamente determinado (21).

2.1.7. Prevalencia.

Se entiende dentro del ámbito de la medicina, que la palabra prevalencia nombra al índice de individuos que padecen una cierta enfermedad dentro del total de un grupo de personas en estudio. Se puede diferenciar entre la prevalencia de periodo (que revela la proporción de enfermos en un momento incierto) y la prevalencia puntual (refiere un momento específico) revela cuantos individuos de un total están enfermos (22).

2.1.8. Zoonosis.

Las zoonosis de acuerdo con el comité de expertos de la FAO/OMS se refieren a “las enfermedades e infecciones en que pueda existir relación animal vertebrados-hombre o viceversa, bien sea directamente o a través del medio ambiente, incluidos portadores, reservorios y vectores” (23).

2.1.9. Primers.

Tienen aproximadamente un promedio de 20 nucleótidos esto porque es la cantidad necesaria para que de manera probable se una a un sitio específico de la cadena de ADN. Los primers se necesitan porque la mayoría de ADN polimerasas, enzimas que catalizan la replicación del ADN, no pueden empezar a sintetizar una nueva cadena de ADN de la nada, sino que solo pueden añadir nucleótidos a una hebra preexistente (24).

2.1.9.1. Sensibilidad.

Medida de eficacia de algunos aparatos o máquinas, hace mención a la capacidad para detectar una magnitud o responder a una orden. Este es un dispositivo de gran sensibilidad, capaz de detectar las variaciones físicas o químicas (25).

2.1.9.2. Especificidad.

Calidad o cualidad de específico (propio de una especie); El conjunto de propiedad o característica de una persona o una cosa que permite distinguirla de otra: En botánica, la especialización de un parásito sobre determinada especie de planta hospedante (26).

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Generalidades de la *Mycobacterium*.

En los siglos XVII y XVIII la *Mycobacterium tuberculosis*, se convirtió en un problema de salud en Europa, asociado con la revolución industrial de aquellos tiempos. Por esas fechas, fue Benjamín Martín quien adjudica por primera vez, que la Tuberculosis podría ser una enfermedad causada por un microorganismo viviente, tal afirmación fue publicada en su libro: “A New Theory Of The Consumption” (27). Para finales del siglo XVII, en 1882, Robert Koch fue el primer científico que logro aislar y teñir al agente causal de la tuberculosis, este fue llamado “Bacilo de Koch”, pertenece al orden *Actinomicetae*, a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*, incluye más de 100 especies que pueden clasificarse en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico (27) (28).

En la actualidad existen datos donde se han identificado más de 130 especies de micobacterias, muchas de ellas están asociadas a enfermedad en el hombre (1). A pesar de la abundancia de especies; los grupos que causan la mayor parte de las infecciones en el ser humano son: *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* (1).

M. tuberculosis es el agente causal más frecuente de enfermedad micobacteriana en el ser humano, a menudo es el centro principal de las identificaciones definitivas; sin embargo varios parámetros que incluyen el análisis de extractos antigénicos, epítopes blanco de anticuerpos monoclonales y estudios de parentesco antigénico sugieren que *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae*; representan una única especie, y actualmente se tratan bajo el término general “complejo *M. tuberculosis*”. Actualmente se ha incluido *M. bovis*, al complejo *M. tuberculosis*, pero tiene características fenotípicas por las que se puede diferenciar de las cepas clásicas de *M. tuberculosis* que se incluyen las siguientes (1).

Se considera que el virus de la inmunodeficiencia humana ha complicado la situación de la tuberculosis dificultando aún más su control, así también de otras micobacterias que han tomado importancia como patógenos oportunistas causantes de micobacteriosis pulmonares y otros sitios del cuerpo (29).

Se caracterizan por ser bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) debido al alto contenido en lípidos que tienen en su pared celular. Este hecho impide que penetren los colorantes habituales de anilina, por lo que no se pueden ver en la tinción de Gram, y hace que para poder visualizarlas sean necesarios colorantes especiales (arilmetanos), pero que una vez teñidas no se decoloran con una mezcla de alcohol y ácido (30).

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0,2 a 0,4 x 2 a 10 micras (31). En algunos casos, estos bacilos forman filamentos ramificados; sin embargo, estos pueden romperse con facilidad. La pared celular es rica en lípidos, su superficie hidrofóbica confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y a las tinciones habituales de laboratorio. Cuando han sido teñidos, los bacilos tampoco se pueden decolorar con las soluciones ácidas, motivo por el que reciben el nombre de bacilos acidorresistentes. Debido a que la pared celular de las micobacterias es compleja y a que este grupo de microorganismos es exigente desde el punto de vista nutricional (29).

Se dice que en la mayoría de los cultivos son lentos según el tipo de cultivo. Medios sólidos con agar permiten una detección 10-12 días (32). Al utilizar un medio líquido junto con el medio sólido clásico de Löwenstein-Jensen (L-J). Posteriormente, se observó que el 18,6% de los aislamientos de *M. tuberculosis* se realizaron exclusivamente en el medio líquido y el tiempo medio de diagnóstico se acortó a 14,2 días, frente a 22,7 días que tardaban en aparecer las colonias en L-J (30), por el tiempo que se dividen 12 a 24 horas y se necesitan hasta 8 semanas antes de poder detectar el crecimiento en los cultivos de laboratorio. (29).

Las micobacterias son capaces de sobrevivir durante meses en el esputo manteniendo en un lugar fresco y oscuro, durante semanas en materiales como alfonbras, cadabares, abonos, papel, o ropa, o entre las partículas de polvo (33), sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidas de la luz solar, y son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Resisten la desecación y la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor ($>65^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos) las inactiva (30).

2.2.2. Fisiología y estructura de las micobacterias.

La estructura básica de la pared celular es característica de las bacterias grampositivas: una membrana citoplasmática interna cubierta por una gruesa capa de peptidoglucanos y carente de membrana externa, sin embargo, es más compleja (1).

En la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM). El lipoarabinomanano presenta una relación funcional con los liposacáridos “O” antigénicos presentes en otras bacterias. La capa de peptidoglucano forma el esqueleto básico al que se unen los arabinogalactanos, que son polisacáridos ramificados formados por D- arabinosa y D- galactosa. Los componentes lipídicos representan el 60% del peso de la pared celular. A lo largo de la pared celular se intercalan proteínas transportadoras y porinas, las cuales constituyen el 15% del peso de la misma. Las proteínas constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección (1).

2.2.3. Organización y secuencia del genoma *Mycobacterium bovis*.

Con técnicas inmunológicas y de biología molecular se ha determinado la enorme similitud existente entre diversas micobacterias causantes de tuberculosis; algunas de ellas, las de mayor similitud, se han agrupado en lo que se conoce como “complejo *M. tuberculosis*”, que incluye a: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinipedii*, *M. caneti*, *M. bovis* y *M. caprae*. *M. bovis* posee un genoma de 4 345 492 pares de bases, con 4 003 genes que codifican para 3 952 proteínas y 50 RNAs estructurales, incluye un profago y 42 secuencias de inserción (IS) (34).

El genoma de *M. bovis* tiene más del 99,95 % de identidad con *M. tuberculosis*, pero su tamaño se ha reducido debido a delecciones, eventos considerados únicos y unidireccionales en las bacterias: la recombinación genética en micobacterias es un evento raro. Así como tampoco hay evidencias de translocación, duplicación e inversiones, posiblemente debido a su lento crecimiento. La ausencia de mecanismos de intercambio genético, como la conjugación o la transformación se le considera como el origen de la similitud entre las especies del complejo *M. tuberculosis*. Algunas teorías suponen que evolucionaron como patógenos no hace mucho tiempo, con la aparición de los primeros homínidos en África oriental (35), (36).

La mayoría de los cambios del genoma del complejo *M. tuberculosis* se han asociado a elementos móviles como las IS, constituidas por fragmentos pequeños de DNA capaces de auto-insertarse dentro del genoma de la micobacteria y conferir polimorfismo entre las cepas. No obstante, en cepas de *M. bovis* este polimorfismo se asocia a delecciones de IS, pues comúnmente, poseen una sola copia (37), (34), (38).

Existen al menos cinco tipos de secuencias repetidas asociadas a la diversidad genética de cepas del complejo *M. tuberculosis*, entre ellas las secuencias en tándem ricas en GC (PGRS) y las secuencias repetidas en serie de número variable (VNTR). Estos últimos agrupan variantes, como son las secuencias polimórficas repetidas principales en serie, (MPTR), las secuencias repetidas exactas en serie (ETR) y las unidades repetidas dispersas de Mycobacterium (MIRU) (34).

2.2.4. Metabolismo en estado de latencia y estado de anaerobiosis.

Se expresa a la *M. tuberculosis* en un aerobio facultativo, del que se conocen diversas rutas metabólicas de anaerobiosis, disponibles para que, al estar en fase de latencia, pueda habitar en un microambiente con escasa o nula concentración de oxígeno. Cuando se somete in vitro a bajas concentraciones de oxígeno, según el modelo de estudio de Wayne y Hayes, la *M. tuberculosis* presentaba una adaptación a estas condiciones de hipoxia, en dos fases que han sido denominadas, persistencia no replicativa 1 y 2 (NRP1 Y NRP2) (1).

La primera comienza cuando la concentración de oxígeno en el medio y en el ambiente es de 1% y 72% respectivamente y se caracteriza por la detección súbita de ADN, pero no de ARN. Las bacterias en esta fase se hacen resistentes a isoniácida, rifampicina y ciprofloxacina. En el estadio NRP2, la concentración de oxígeno en el medio y en el aire es de 0,06% y 15% respectivamente, se caracteriza por la disminución inicial en la concentración global de ATP y se detiene el aumento del volumen celular (1).

El *M. tuberculosis* adapta su metabolismo al ambiente anaeróbico activando las vías de respiración del nitrato, así como la vía del glioxilato a través de la estimulación de las enzimas isocitrato liasa y glioxilato deshidrogenasa. Esta vía, permite al *M. tuberculosis* sintetizar carbohidratos a partir de ácidos grasos (1).

2.2.5. *Mycobacterium bovis* en el hombre.

M. bovis causa tuberculosis en el ganado, los humanos y otros primates, así como en otros animales como perros, gatos, cerdos, papagayos, entre otros (15). En humanos, el contacto entre ganado y humanos (en especial en la población rural, personal de frigoríficos y de la industria de la carne, veterinarios, laboratoristas, entre otros) (16).

Puede producirse por inhalación o ingesta de productos contaminados, a través del consumo de productos lácteos sin pasteurizar, pero la transmisión de persona a persona también ha sido documentada. Cuando la transmisión es por inhalación, se produce la infección primaria en el pulmón, dando lugar a un cuadro pseudogripal al igual que en los producidos por *M. tuberculosis*, con mayor posibilidad de reactivación en el tracto respiratorio y, eventualmente, diseminación a órganos distantes. A diferencia de la transmisión por ingestión, en la que se produce diseminación hematógena y posteriormente linfadenopatía predominantemente cervical, lesiones intestinales o cutáneas en la infección primaria (15).

Entre cinco y ocho semanas después de la ingesta de *M. bovis*, se presenta fiebre, odinofagia y linfadenopatía cervical. La reactivación tendrá lugar predominantemente extrapulmonar, regularmente en órganos abdominales, siendo la forma clásica la ileítis terminal, o bien, en cualquier órgano distante por diseminación hematógena, siendo más frecuente a nivel ganglionar, genitourinario y osteoarticular. Sin embargo, la enfermedad producida por *M. bovis* en humanos es virtualmente indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*, tanto clínica como histológicamente (39), (40).

Actualmente, la tuberculosis está presente en todas las regiones del mundo y sigue siendo una de las enfermedades transmisibles más mortales. Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculan que en 2 014 contrajeron la enfermedad 9,6 millones de personas, de los cuales casi el 60% eran hombres y 12% tenían la infección por el VIH. Se reportaron 1,5 millones defunciones por esta causa, de las cuales 4 millones se encontraban asociadas al VIH. La proporción de nuevos casos de TB multirresistente (TB-MR) fue del 3,5% en 2 013, y solo un 58% de los 4,9 millones de casos de TB pulmonar notificados en el mundo se confirmaron bacteriológicamente mediante pruebas recomendadas por la OMS (15).

La correlación directa entre la infección por *M. bovis* en el ganado vacuno y la enfermedad en humanos ha sido bien documentada en los países desarrollados, mientras que en los países en desarrollo existe menor información al respecto. Durante la primera mitad del siglo XX la tuberculosis bovina fue considerada un problema de salud pública veterinaria en muchas partes del mundo, situación que mejoró gracias a programas de erradicación. De acuerdo con información de la base de datos sobre la salud animal de la Organización Mundial de la Salud Animal, 128 de 155 países informaron la presencia de la infección por *M. bovis* y/o la enfermedad clínica en su población bovina durante el período entre 2 005 y 2 008 (41).

En 1 998 la OMS informó que el 3,1% de los casos de tuberculosis en humanos a nivel mundial, eran atribuibles a *M. bovis* y que del 0,4 al 10% de las muestras de esputo positivas en pacientes de países africanos podrían ser debidas a *M. bovis* (40). En Estados Unidos, se estima que el 1-2% de todos los de TB en humanos son ocasionados por *M. bovis*, pero en ciertas regiones la prevalencia es más alta, tal es el caso de California (42).

Un estudio retrospectivo realizado en esta región, del 2 003 al 2 011, mostró un incremento de los casos de *M. bovis* del 3,4 % de todos los casos de TB en 2 003 a 5,4 % en 2 011. El origen hispano, la afección extrapulmonar, la diabetes y las condiciones de inmunosupresión, excluyendo el VIH, fueron factores independientes asociados a la infección y hacen énfasis en el incremento de la enfermedad. Es importante hacer notar la relación que tienen con México por las personas que han emigrado a esa región y el consumo de productos lácteos provenientes de nuestro país (43).

Se ha calculado que hasta 7 000 nuevos casos de tuberculosis bovina se presentan en América Latina cada año; sin embargo, la mayoría de los países de esta región solo reportan casos esporádicos o baja ocurrencia y muchos no reportan ningún caso (44). En lo que respecta a México, la prevalencia reportada en la literatura es variada, pero se coincide que los casos debidos a *M. bovis* en humanos son mucho mayores a lo reportado por organismos oficiales. Recientemente se reportaron por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” los resultados obtenidos a través de muestras recopiladas en el periodo del año 2 000 al 2 014 y la susceptibilidad a fármacos de primera línea (45).

De los 1 625 casos de TB reportados, en el 26,2 % se aisló *M. bovis* y la prevalencia de este se incrementó de 7,8% en el año 2 000 a 28,4% en el 2 014, el principal sitio de afección fue a nivel pulmonar, seguido de ganglios linfáticos y a nivel abdominal. La resistencia primaria a estreptomycin fue mayor en el grupo de *M. bovis* respecto al de *M. tuberculosis* 10,9 % frente a 3,4 % (45).

2.2.5. Identificación de micobacterias con técnicas en biología molecular.

La prevalencia real de *M. bovis* en humanos es sub-estimada o ignorada en la mayoría de los países en desarrollo, como es el caso de México y América Latina, como ya se ha comentado. De manera puntual, el diagnóstico de certeza de TB se logra mediante el aislamiento del bacilo y la identificación de especies mediante pruebas fenotípicas y moleculares (46).

Uno de los factores que impiden estimar la prevalencia de *M. bovis* es debido que estos países, no cuentan con redes de laboratorios de salud pública con instalaciones apropiadas para la realización de diagnósticos con precisión, incluyendo cultivos, tipificación de micobacterias y pruebas de sensibilidad a los medicamentos (46).

La aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a partir de medio líquido o sólido permite establecer diagnósticos más rápidos y fiables. Las técnicas basadas en PCR son indispensables para la diferenciación exacta de especies de micobacterias, aunque estas técnicas requieren personal bien entrenado, laboratorios sofisticados y actualmente en nuestro país no se encuentran al alcance de todos los pacientes. Recientemente se han realizado ensayos para la detección de *M. bovis* a través de PCR, tanto en humanos como en el ganado, a partir de muestras pulmonares y extrapulmonares, demostrando una sensibilidad y especificidad de hasta 100% (47).

Un estudio realizado en Querétaro, en muestras de pacientes sintomáticos a través de PCR y cultivo, reportó que el 13,8% de los casos de TB eran debidos a *M. bovis* (48). En Hidalgo se realizó un estudio enfocado a granjeros, a los que se les realizó la prueba de la tuberculina (tuberculin skin test, TST) y ensayo de liberación de interferón gamma (Interferon-gamma release assay, IGRA) mostrando una prevalencia global de tuberculosis latente del 76,2% por TST y el 58,5% por IGRA (15).

En este mismo estudio se realizaron necropsias al ganado que murió en el periodo de estudio encontrándose lesiones sugestivas de TB en el 34,4 % de las necropsias y se confirmó la presencia de *M. bovis* por cultivo en 9,8 % de todo el ganado muerto en este periodo (15). En otro estudio, también realizado en Hidalgo, Pereira Suárez reportó que en 6,3% de muestras de queso fresco se detectó *M. bovis* a través de PCR (49).

Se utilizan diversas pruebas de biología molecular y reacciones bioquímicas para distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*, a diferencia de este último, las pruebas de producción de niacina y de reducción de nitratos son negativos en *M. bovis*, pero el resto de características bioquímicas son indistinguibles: produce catalasa termosensible (positiva a temperatura ambiente e inactivada a

68 °C) y la tolerancia a la sal es negativa. *M. bovis* es incapaz de metabolizar el glicerol debido a una alteración natural en genes implicados en el metabolismo del piruvato, por esta razón, necesita piruvato como fuente de carbono para su crecimiento. El crecimiento en medio Löwenstein-Jensen y Ogawa es pobre ya que contienen glicerol.

Cabe mencionar que estos son los medios más utilizados en América Latina. El medio líquido automatizado BACTEC (Becton Dickinson) no contiene glicerol, por lo que favorece el crecimiento de *M. bovis*. A diferencia de *M. tuberculosis*, el crecimiento de *M. bovis* es inhibido por la TCH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico) a una concentración de 5 µg/mL. *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida y una actividad pirazinamidásica defectiva. Actualmente, se utiliza la genotipificación utilizando técnicas comercializadas que se basan en la amplificación de genes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con lo que se tienen diagnósticos más precisos (50) (51).

2.2.6. Algunos estudios realizados.

Algunos estudios realizados en la última década sobre la presencia de TB por *M. bovis* en humanos ha sido documentada en LAC en 4 países: Brasil, Argentina, Ecuador y Venezuela. Además, se ha comprobado el vínculo entre casos de TB diagnosticados en EE.UU. y productos lácteos producidos en México con leche cruda (52).

Por otra parte, en Uruguay, Colombia y en R. Dominicana, a pesar de haberse realizado investigaciones sistemáticas en sus laboratorios de referencia con los medios de cultivo apropiados, no se aisló *M. bovis* de muestras humanas (53).

En la Argentina es donde los porcentajes de casos debidos a *M. bovis* en relación al total de TB, han sido los más altos. Esto podría deberse en parte a una búsqueda continuada, en especial en los laboratorios de referencia en Buenos Aires y Santa Fe, y también a la históricamente alta infección relativa en el ganado. Se puede decir que una característica de *M. bovis* es la predominancia de casos pulmonares, diagnosticados en trabajadores de la industria frigorífica (52).

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias E. Coni (INE), en Santa Fe, mantiene un registro de los casos de TBB desde 1 977. Entre 1 988 y 2 006 se confirmaron por cultivo 2 485 casos pulmonares de TB, el porcentaje de los debidos a *M. bovis* fue 2,7% entre 1 988 y 1 993, 1,7% entre 1 994 y 1 999, y 1,3% entre 2 000 y 2 006. Aproximadamente el 70% de los casos de TBB tenían relación de contacto directo con bovinos, y en su mayor parte eran trabajadores de frigoríficos y mataderos. Estos porcentajes decrecientes de la TBB podrían estar relacionados con el progreso del PCE (SENASA) y el mejoramiento de las condiciones sanitarias en la producción de alimentos (52).

- La higiene en mataderos-frigoríficos, plantas procesadoras de carne e industria láctea.
- El hervido de la leche, y la pasteurización con garantía de calidad.
- La protección de los trabajadores en riesgo (teniendo en cuenta la transmisión por vía respiratoria).
- El reforzamiento de las actividades de control de la TB, en sanidad animal y en salud pública.
- La información al público en situación de riesgo y las medidas preventivas.
- El saneamiento de los focos de la enfermedad incluyendo su investigación epidemiológica (52).

2.2.7. Acerca del método LAMP.

Esta técnica utilizada para descifrar ciertas enfermedades "LAMP", que significa amplificación isotérmica mediada por bucle, es un método de amplificación en ácidos nucleicos simple, rápido, específico y rentable desarrollado exclusivamente por Eiken Chemical Co., Ltd (19).

Su principal característica el uso de 4 iniciadores diseñados específicamente para reconocer 6 regiones distintas en el gen diana y el proceso de reacción avanza a una temperatura constante utilizando la reacción de desplazamiento de cadena (19).

La amplificación y detección del gen se puede completar en una sola etapa, incubando la mezcla de muestras, cebadores, ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y sustratos

a temperatura constante (aproximadamente 65 ° C). Proporciona una alta eficiencia de amplificación, con ADN que se amplifica 109-1010 veces en 15-60 minutos. Debido a su alta especificidad, la presencia de un producto amplificado puede indicar la presencia del gen diana (19).

Características.

- No hay necesidad de un paso para desnaturalizar bicatenas en una forma de cadena simple.
- Toda la reacción de amplificación tiene lugar continuamente en condiciones isotérmicas.
- La eficiencia de amplificación es extremadamente alta.
- Al diseñar 4 cebadores para reconocer 6 regiones distintas, el método LAMP puede amplificar específicamente el gen objetivo.
- El costo total puede reducirse, ya que la dosis LAMP no requiere reactivos especiales o equipos sofisticados.
- Los productos amplificados tienen una estructura que consiste en repeticiones invertidas alternativamente de la secuencia objetivo en el mismo capítulo.
- La amplificación se puede hacer con plantillas de ARN siguiendo el mismo procedimiento que con las plantillas de ADN, simplemente mediante la adición de transcriptasa inversa (19).

2.2.7.1. Propiedades de LAMP.

Dentro de las propiedades de la Amplificación Isotérmica Mediada por loop (LAMP) (Tabla 1) de ácido nucleico amplifica el DNA blanco con alta especificidad, eficacia y rapidez bajo condiciones isotérmicas, que se lleva a cabo a una temperatura constante (entre 60 °C - 65 °C), utiliza una Bst polimerasa con actividad desplazante de cadena (54).

Se puede describir que la principal 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 (54).

En la tabla 1, se ilustra las propiedades de la técnica Amplificación Isotérmica Mediada por loop LAMP.

Tabla 1. *Propiedades de LAMP.*

Simplicidad	Amplificación isotérmica en un solo paso Detección visual de productos amplificados
Rapidez	Resultados de las pruebas finales entre 15 a 60 minutos
Especificidad	Uso de 4 cebadores que reconocen 6 regiones distintas del DNA blanco Amplificación -Resultados positivos de la prueba
Rentabilidad	No requiere ningún reactivo especial y equipo sofisticado
Productos amplificados	Cantidad extremadamente grande (10 ⁹ -10 ¹⁰ veces dentro de 15 a 60 minutos) Diversos tamaños de las estructuras de repeticiones invertidas de forma alterna de la secuencia diana en el misma cadena
Amplificación de RNA	Amplificación isotérmica de RNA en un solo paso con sólo añadir la transcriptasa inversa

(Fuente de la información anterior: Eiken Chemical Co., Ltd. LAMP folleto)

2.2.7.2. Trabajos relacionados.

En el transcurso de los años y la necesidad de la investigación se han ido implementando nuevas técnicas, protocolos como es la utilización de nested-PCR permitió identificar una prevalencia aparente (PA) de TBB en 4,325%, determinándose que 25 bovinos faenados presentaron material genético de un agente patógeno perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, por la afinidad en este hospedero y por ser el único causante en ganado vacuno, se puede presumir que se trata de *M. bovi*. De las muestras positivas, 44%(11/25) pertenecieron al camal del cantón Cayambe y 56% (14/25) a Pelileo, (55), así como para el diagnóstico por PCR anidada se procesaron 237 muestras, solo el 16,9% amplificó una banda específica para *M. bovis*. En un segundo muestreo a los mismos bovinos 12/37 (32,5%) fueron positivos (56).

La histopatología se realizó en 210/586 (35,9%) tejidos, encontrándose lesiones de los cuatro tipos de granulomas. El (linfonodo) LN mediastínico fue el más frecuente (81,2%). Se realizó cultivo en 531/586 (90,6%) muestras de órganos sugestivos de TBb, en al menos una muestra por necropsia hubo cultivo positivo para *M. bovis*. Se presentaron 22 patrones de espoligotipos, 15 agrupados y 7 únicos (56).

Al igual que resultaron positivas al cultivo bacteriológico del *M. bovis*, resultaron igualmente positivas a la PCR aplicada al ADN extraído de las *mycobacterias*, amplificando con primers específicos del Complejo *M. tuberculosis*, IS6110 que incluye al *M. bovis*. Todas las muestras negativas al cultivo bacteriológico, provenientes de tejidos involucrados en la infección con *M. bovis*, con o sin lesiones tuberculosas, resultaron negativas a la prueba de PCR anteriormente señalada. En total, hubo 51 animales positivos y 85 animales negativos (57).

En la Universidad de las América, donde el mayor porcentaje de animales positivos se presentan en el grupo de animales mayores a 5-7 años (40,60%) y de 3-5 años presentó una positividad de 36,66%, luego los mayores de 7 años con el 15,15% y finalmente los menores a 3 años con el 7,57%, lo que confirma que esta enfermedad está presente en todas las edades (58). Podría estar vinculada a la tasa de incidencia 1,70% la infección en el Cantón Mejía podría atribuirse a la procedencia geográfica de los animales vinculados a una zona con explotaciones lecheras que tienen sistemas de manejo intensivo (59). Se ha demostrado que el lugar de procedencia de los animales es un factor determinante en la presentación de *M. bovis* en dos zonas de la sierra norte del Ecuador (60). En el 2006 y 2010 se observó que los peso a la canal promedio en kg. por categoría positivos a T. bonina en novillos 272,89 kg. vaquillas 227,79kg. vacas 255,08kg. otras categorías 341,00kg. (61). El costo del test por persona fue de \$ 33,67, del cual pertenece a costos de laboratorio y kits comerciales del test (62).

CAPÍTULO III.
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

3.1.1. Toma de muestras.

El presente trabajo se realizó tomando muestras biológicas de nódulos pulmonares en el camal Municipal del cantón El Empalme para la detección de *M. bovis*. La ubicación geográfica es de 10° 03' 00" de latitud sur y 79° 37' 00" de latitud oeste y a una altura de 71 metros sobre el nivel del mar y sus condiciones geográficas se exponen en la Tabla 2.

En la tabla 2, se ilustra las Condiciones geográficas del cantón El Empalme donde se realizó la investigación.

Tabla 2. *Condiciones geográficas del cantón El Empalme.*

Datos meteorológicos	Valores medios y otros
Temperatura, °C	25.47
Humedad relativa media, (%)	85.84
Heliofanía	776
Precipitación, mm/ anual	1570

Fuente: Datos según la Estación Meteorológicas del INAMHI (63).

3.2. Tipo de investigación.

Investigación de campo. - El objetivo se centró en determinar la eficiencia con que actúa la técnica a estudiar, Se realizó una investigación Experimental; puesto que se identificó un método eficiente, fácil, y económico para la detección de *M.bovis*.

3.2.1. Experimental.

Se designó experimental a esta investigación debido a que se ejecutó ensayos que ayudaron a establecer la eficiencia para la detección de *M. bovis* con la técnica de LAMP.

3.3. Métodos de investigación.

Los métodos que se emplearon en esta investigación fueron el método de observación, y método analítico. Estos métodos permitieron desarrollar las variables estudiadas y la toma de muestras que posteriormente fueron analizadas para la detección de la tuberculosis en los animales que se faenaron en el Camal Municipal del cantón El Empalme.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

Para la realización de la investigación se tomaron 368 muestras de nódulos pulmonares de bovinos faenados en las instalaciones del Camal Municipal del cantón El Empalme en un periodo de 8 semanas con un total de 46 muestra por semana , tomando en consideración características corporales de un posible animal enfermo por alguna enfermedad (bajo peso corporal, decaimiento, tos), a cada animal se le realizó una toma de datos, razas (brahmán 139 muestras, Holstein 62 muestras, Gyr 23 muestras, Gyrolando 21 muestras, criollo 50 muestras, Nelore 27 muestras, Pardo Suizo 46 muestras).

Sexo (Hembras 234 muestras, Machos 134 muestras), procedencia (El Rosario 5 muestras, Feria Santo Domingo 185 muestras, Isla El Palmar 33 muestras, San Francisco del Congo 17 muestras, La Guayaquil 26 muestras, Barraganete 19 muestras, El Limón 11 muestras, Parroquia La Guayas 20 muestras, La Caraca 9 muestras, INIAP Pichilingue 5 muestras, Las Tecas 7 muestras, La Carmela 12 muestras, cantón Pichincha 19 muestras), edad (06-24 meses 0, 25-48 meses 106, 49-72 meses 202, 72-96 meses 58), peso a la canal (100kg.-200kg. 32, 200kg. -300kg. 289, 300kg. -400kg. 47 muestras).

Cada muestra fue colocada en un envase para toma de orina esterilizado y rotulado con la información perteneciente a cada animal, se trasladaron las muestras en una caja térmica para conservar las muestras y evitar la proliferación de otras bacterias y conservadas en congelación (-20 -40°C), hasta el momento de realizar la extracción de ADN por el protocolo de extracción TENS modificado.

3.5. Diseño de la investigación.

El presente trabajo se empleó una estadística descriptiva, análisis de frecuencia para la redacción de resultados.

3.6. Instrumentos de investigación.

3.6.1 Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de nódulos pulmonares bovinos por el método de TENS modificado.

Pasos previos a la extracción:

- a. En el caso de muestras de tejido se macera aproximadamente 100 mg.

Extracción:

1. Agregar 400 µL de tampón de extracción TENS (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 µL de proteinasa K (20mg/ml).
2. Incubar a 56 °C por 3 horas.
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 a temperatura ambiente durante 15 minutos.
11. Resuspender con 50 µL de TE.
12. Agregar Rnasa 0.5 µL. Homogenizar y se llevó a Incubar a 37 °C por 30 minutos.

3.6.2. Verificación del ADN extraído luego de aplicar el protocolo.

Se preparó en gel de agarosa al 1% disuelto en 50 mL de solución TAE 1X, se le añadió bromuro de etidio 0.5 ug/mL, seguido se depositó en la cámara de electroforesis. Luego se preparó una mezcla 5 µL de ADN, 2 µL de azul de bromofenol y se depositó la solución en cada hoyo. Las muestras se corrieron 75 V por 30 minutos. Después de la migración el gel es colocado en la bandeja del transiluminador para observar las bandas de ADN y ser fotodocumentadas.

3.6.3. Descripción de iniciadores sintéticos.

Se seleccionaron dos juegos de iniciadores que fueron evaluados para LAMP como se muestra en la (Tabla 3).

Tabla 3. *Primers específicos para la detección de M.bovis con la técnica LAMP.*

Iniciadores	Secuencia
TB1R	5' – TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT- 3'
TB1F	5' – GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA- 3'
MB3	5' – GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGG C- 3'
MB4	5' – CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C- 3'
MB1	5' – GAG AAT TCG GTC GGC GAG CTG ATC C-
MB2	5'- GCA AGC TTG ACC CGC GCG TAC ACC – 3'
MB3	5' – GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGG C- 3'
MB4	5' – CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C- 3'

Fuente: Datos según primer.

3.6.4. Preparación del mix (mezcla) para la LAMP.

Es importante considerar en la preparación del mix el número de muestras que se van a realizar, e incluir el control negativo C (-) que sirve como testigo para confirmar que los reactivos no están contaminados.

De este número total de analisis a realizar, se aumento un tubo de reaccion en los calculos de los reactivos que constituyen el mix.

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

En la tabla 4, se detalla la preparación de LAMPmix.

Tabla 4. *Preparación de LAMPmix.*

Reactivos	Para un tubo de reacción
Agua ultra pura	4.5 µL
Primer –FIP (20 pmol/ µL	2.0 µL
Primer –BIP (20 pmol/ µL	2.0 µL
Primer –F3 (10 pmol/ µL	1.0 µL
Primer –FIP (10 pmol/ µL	1.0 µL
Reactivo R1 (dNTPs 10 Mm)	3.5 µL
Reactivo R2 (Buffer 10 X Bst)	2.5 µL
Reactivo R3 (Mg So4 100 Mm)	
Reactivo R4 (Betaína 5 M)	1.5 µL
Bst DNA Pol (8000 U/mL)	4.0 µL
	1.0 µL
Volumen Final	23.0 µL

- Repartir 23µL de LAMPmix en cada micrutubo de 0,2ml.
- Añadir 2µL de ADN extraído o control y mezclar.
- Cubrir con 20µL de aceite mineral si es necesario (opcional).
- Colocar los tubos en baño de María o en un baño seco o un termociclador.

3.6.4.1. Programación de la reacción.

- Etapa 1: Amplificación 65°C, 60min.
- Etapa 2: Inactivación 80°C, 10 min.
- Etapa 3: Conservación -40°C, ∞.

3.6.4.2. Análisis de resultados en el gel de electroforesis.

a. Preparación del gel.

- Preparar un gel al 2% de agarosa.
- Dejar entibiar y coleccionar el Bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL de gel. La solución madre se encuentra a 10 mg/mL.

b. Depósito de las muestras.

- Tomar 10 µL del producto de la LAMP y mezclar con 2 µL de tampón de depósito.
- Depositar un producto por cada pozo.
- Anotar el orden de las muestras en el cuaderno de trabajo.

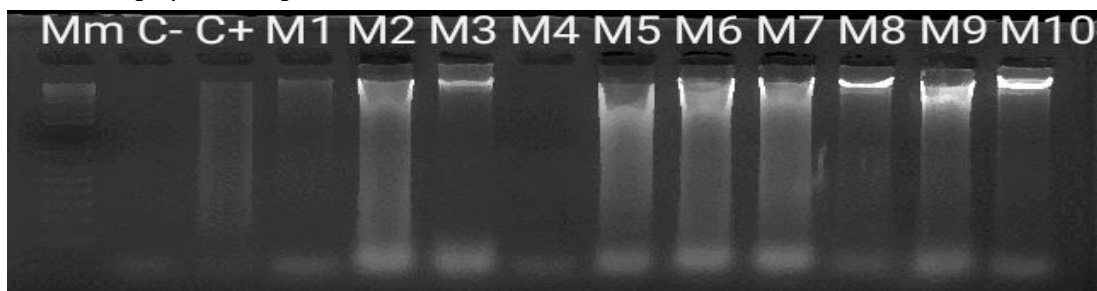
c. Migración.

- Colocar la tapa y conectar los electrodos a la fuente de poder (70-100V, por 45 min. A 1 hora, según el tamaño del gel).

d. Lectura de los resultados.

- Colocar el gel sobre el transiluminador, colocar el protector y prender la lámpara UV.
- Leer y reportar los resultados en el cuaderno de trabajo y tomar una foto para tener un respaldo.

Figura 1. Amplificación por la técnica de LAMP en la detección de *M. bovis*.



Mm: marcador molecular, **C-:** control negativo, **C+:** control positivo, **m1:** número de muestra.

3.7. Tratamiento de datos.

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

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Humano.

El presente recurso que se utilizó para la investigación se detalla a continuación:

Dr. Orly Cevallos Falquez director del proyecto de investigación.

Claudio Palacios Cobeña Autor del proyecto de investigación.

Personal calificado del camal Municipal del Cantón El Empalme.

Personal calificado del laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

3.9. Materiales.

3.9.1. Materiales de campo.

- Caja térmica
- Jeringas
- Alcohol
- Guantes
- Mandil
- Mascarillas
- Botas de caucho
- Pinzas
- Tijeras quirúrgicas

3.9.2. Equipo de laboratorio.

- Balanza
- Baño María
- Transiluminador UV
- Microcentrifuga
- Vortéx
- Refrigeradora
- Caja de electroforesis

3.9.3. Materiales de laboratorio.

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

3.9.4. Reactivos para protocolo de TENS.

- Tris
- Hcl
- Edta
- Lta
- Cloruro de sodio
- Sds
- Cloroformo alcohol isoamil
- Etanol 95%
- Etanol 70%

- Protinasa k
- Rnasa

3.9.5. Reactivos para para la preparación de LAMPmix.

- Agua ultra pura
- Primer –FIP (20 pmol/ μ L
- Primer –BIP (20 pmol/ μ L
- Primer –F3 (10 pmol/ μ L
- Primer –FIP (10 pmol/ μ L
- Reactivo R1 (dNTPs 10 Mm)
- Reactivo R2 (Buffer 10 X Bst)
- Reactivo R3 (Mg So4 100 Mm)
- Reactivo R4 (Betaína 5 M)
- Bst DNA Pol (8000 U/mL)

3.10. Variables a estudiar.

3.10.1. Razas.

Dentro del país existe una gran cantidad de razas y cruzamientos de estas teniendo una diversidad de animales, resultado de estos cruces algunos de las cuales se comportan con mayores resistencias a ciertas enfermedades y adaptación a zonas específicas de producción. Al existir un intercambio comercial con animales de distintas razas las cuales son faenadas y distribuidas sus canales en el Cantón El Empalme y otros sectores.

3.10.2. Sexo.

Existe una descompensación principalmente en las vacas productoras de leche de gran rendimiento, las cuales suelen mantener bajas sus defensas siendo más afectadas por ciertas enfermedades que los bovinos machos. Pero si un animal es portador de la bacteria puede transmitirla al inhalar la bacteria exhalada al aire, al alimentar terneros lactantes, en bebederos y saleros y otros animales.

3.10.3. Peso del animal.

Se considerará que un animal con mal estado corporal se encuentra así por un motivo que puede variar desde el estrés, mala alimentación, etapa productiva o una enfermedad. Luego del proceso de faenamiento del animal tomando en consideración, pesos a la canal de los animales que se le realizó la respectiva muestra y análisis.

3.10.4. Procedencia.

Debido a la extensión de producción y comercialización que existe en el medio los animales faenados antes de ser faenados recorren varias fincas y ferias de comercialización. Con el fin de determinar la procedencia del animal se toma en cuenta la respectiva verificación de las guías (o permiso) de transportación de bovinos con el origen del animal. Con el propósito de intervenir con un programa de erradicación de *M. bovis* a nivel de finca principalmente.

3.10.5. Recolección de las muestras.

Se procedió a guardar la muestra de nódulo pulmonar dentro de un envase esterilizado normalmente utilizado para la toma de muestra de orina, anotando todas las descripciones necesarias. Semana, raza, procedencia, sexo, peso. Luego se almacena a -40°C.

3.10.6. Extracción de ADN.

Con la utilización del nitrógeno líquido se procedió a macerar aproximadamente 100mg. De nódulo pulmonar y colocarlo en un tubo eppendorf luego de esto se aplicó los materiales y reactivos antes descritos en el protocolo de TENS modificado.

3.10.7. Amplificación isotérmica.

Con la selección de los iniciadores a utilizar para Amplificación Isotérmica y realizar un mix donde llevara los reactivos descritos en la tabla 4.

3.10.8. Técnica LAMP.

Por cada muestra se utilizó 23 μ L, en tubo eppendorf de 0,2ml. Y se le añadió 2 μ L del ADN extraído.

3.10.9. Gel de agarosa.

Se preparó un gel al 2% de agarosa y se vertió en una solución de TAE 1x se mezcló se dejó entibiar y se le agrego bromuro de etidio.

3.10.10. Energía.

Para calcular el consumo de cada equipo, multiplique la potencia del equipo (vatios W) por el número de horas usado en el mes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

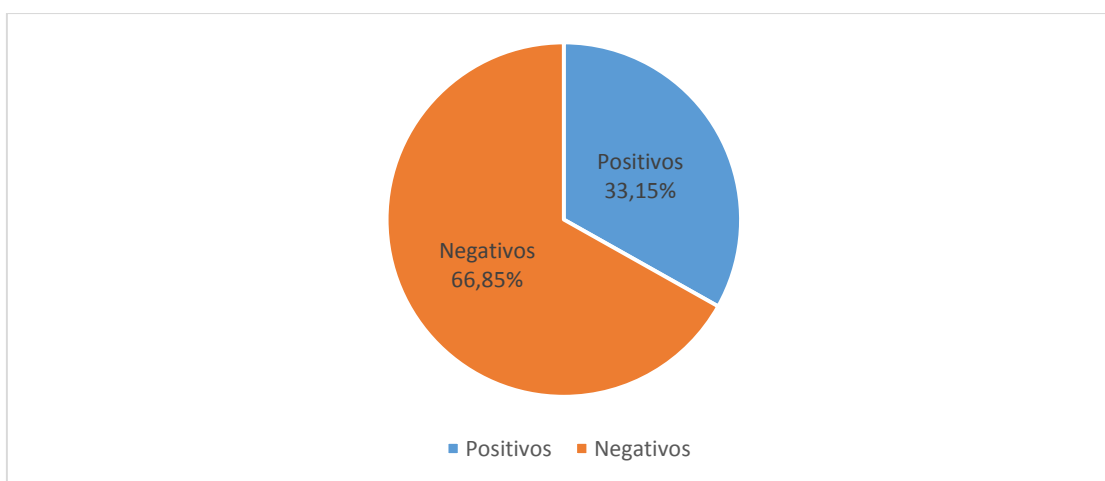
4.1.1. Resultados obtenidos con la técnica de LAMP.

En la Figura 2, se ilustra el análisis de resultados obtenidos con la preparación de LAMPmix y aplicado a las muestras de ADN extraída de animales bovinos que fueron faenadas en el transcurso de la investigación.

Los resultados de la Figura 2 indican el total de muestras de 368 nódulos pulmonares 122(33,15%) positivos y 246 (66,85%) animales negativos, Lo que sugiere que la técnica molecular de LAMP es eficaz para la detección de *M. bovis* pudiendo ser utilizada también para la detección de otras enfermedades.

En muestras evaluadas con Nested-PCR presentaron 44 % (11/25) positivas, pertenecieron al camal del cantón Cayambe y 56% (14/25) a Pelileo, (55). Similar al diagnóstico PCR anidada presento 16,9 % de 237 muestras, amplificó una banda específica para *M. bovis*. (56). La PCR aplicada al ADN extraído de las *mycobacterias*, amplificando con primers específicos del Complejo *M. tuberculosis*. En total 37 % (51 /85) animales positivos (57).

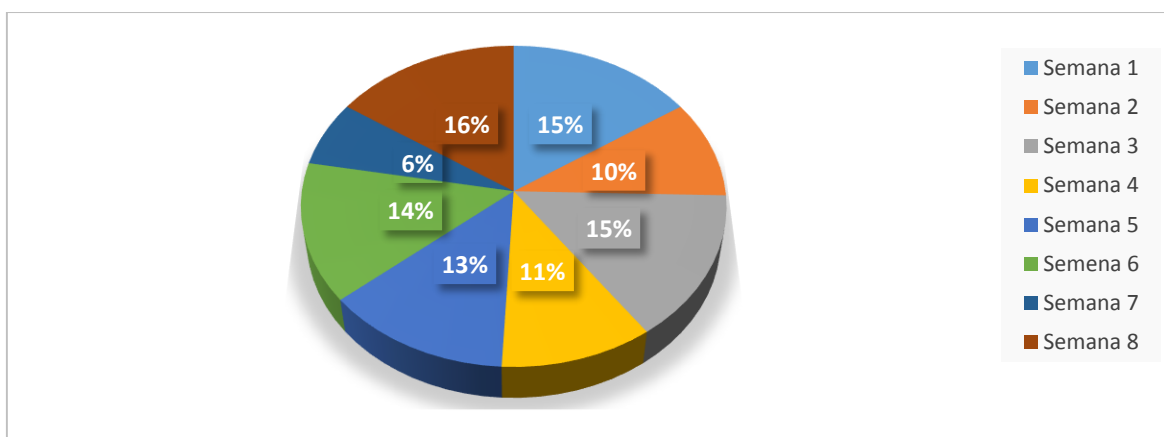
Figura 2. Resultados positivos con la técnica de LAMP por semana.



Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

Los resultados de la Figura 3 indican el total de muestras de 46 nódulos pulmonares por semana analizado, se reflejó en la semana 1 (15%), semana 2 (10%), semana 3 (15%), semana 4 (11%), semana 5 (13%), semana 6 (14%), semana 7 (6%), semana 8 (16%). Resultaron positivo con el análisis de LAMP.

Figura 3. Resultados positivos con la técnica de LAMP por semana.



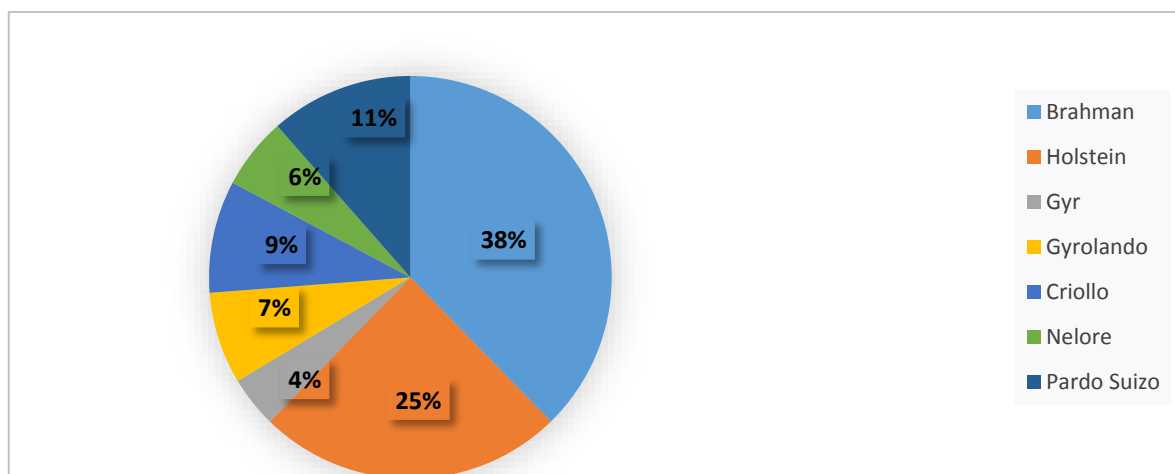
Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

4.1.2. Razas bovinas.

En la Figura 4, se ilustra la diversidad de razas bovinas que fueron faenadas en el transcurso de la investigación.

Al realizar la determinación de las razas bovinas con datos positivos a *M. bovis*, se estableció que la raza que más influye en esta investigación es la Brahman con un 38%, seguido de la Holstein con 25%, Pardo Suizo 11%, criollo 9%, Gyrolando 7%, Nelore 6%, Gyr 4%.

Figura 4. Razas de bovinos con resultados positivos a *M. bovis*.



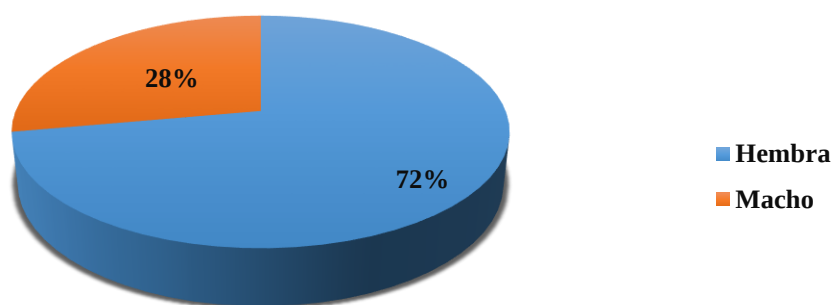
Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

4.1.3. Sexo.

En la Figura 5, se ilustra la cantidad de animales bovinos positivos a *M. bovis* por sexo que fueron faenadas en el transcurso de la investigación.

Se puede observar que la cantidad de animales hembras bovinos positivos a *M. bovis*, que se faenaron en el transcurso de la investigación 72%, a diferencia de los bovinos machos positivos a *M. bovis*, con un 28%, con una diferencia del 44% de prevalencia mayor en las hembras.

Figura 5. Cantidad de animales bovinos por sexo.



Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

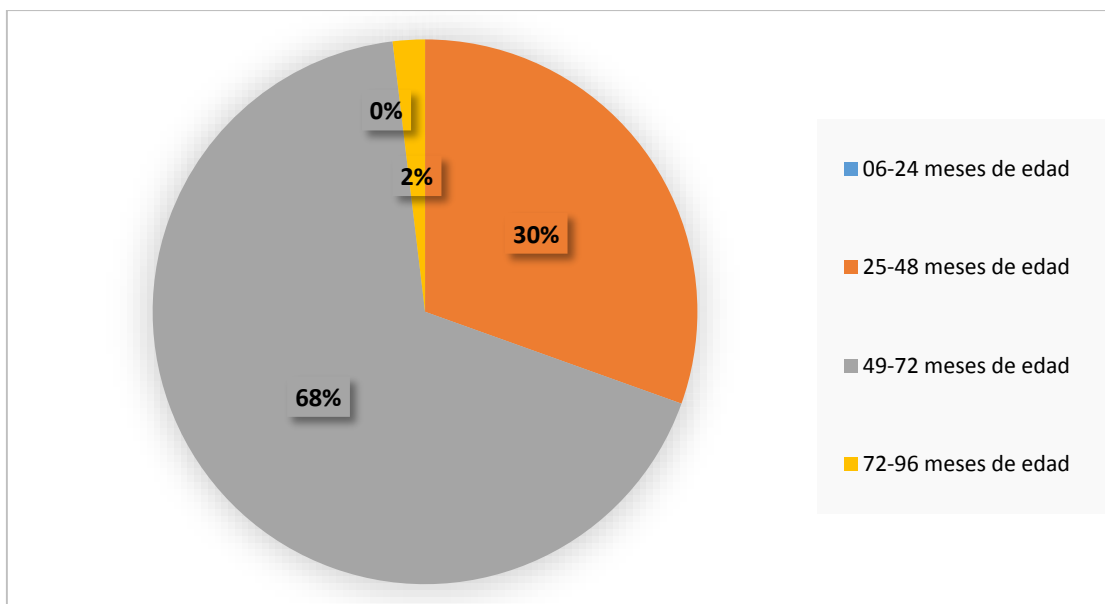
4.1.4. Edad.

En la Figura 6, se ilustra variabilidad en las edades de animales bovinos que fueron faenadas en el transcurso de la investigación positivos a *M. bovis*.

Se representa los resultados positivos a *M. bovis*, referentes a rangos en edades de animales muestreados por meses 06-24 meses se obtuvo 0%, 25-48 meses de edad 30%, 49-72 meses de edad 68%, 72-96 meses de edad 2%, la mayoría de los animales faenados son animales descartados en las fincas que han cumplido su etapa productiva, problemas en la producción, escasas de alimento y necesidades económicas.

En la Universidad de las América, el porcentaje de animales positivos se presentan en el grupo de animales mayores a 5-7 años (40,60%) y de 3-5 años presentó una positividad de 36,66%, luego los mayores de 7 años con el 15,15% y finalmente los menores a 3 años con el 7,57%, lo que confirma que esta enfermedad está presente en todas las edades (58).

Figura 6. Resultados positivos a *M. bovis* referentes a las edades con rango de meses.



Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

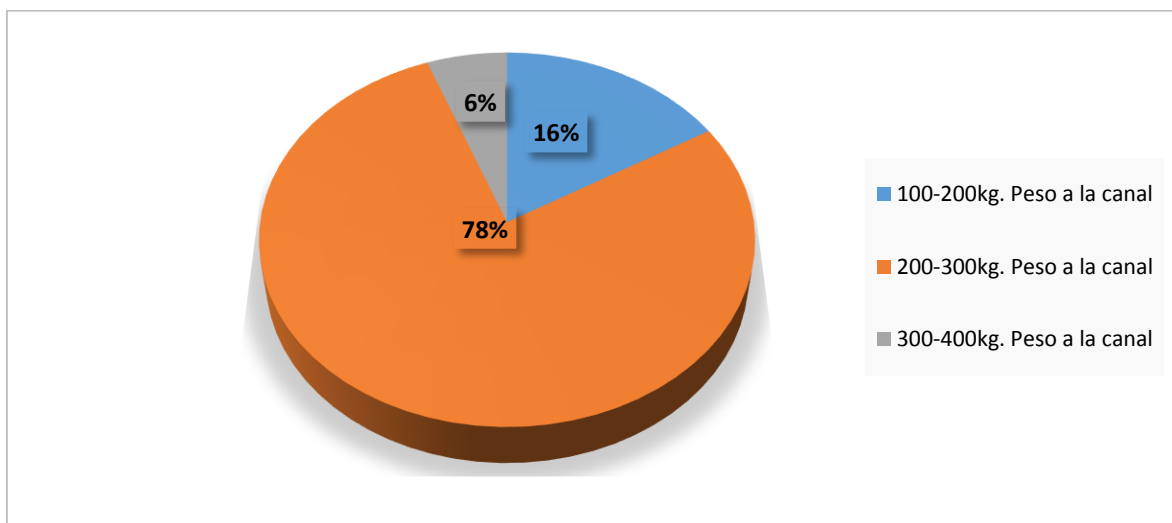
4.1.5. Peso del animal.

En la Figura 7, se ilustra rangos de pesos por animal bovinos faenadas positivos a *M. bovis* en el transcurso de la investigación.

Se observa que según los datos tomados del rendimiento a la canal de los animales sometidos a la investigación reflejados en rangos de 100-200kg. 16%, 200-300kg. 78%, 300-400kg. 6%.

En el 2006 y 2010 se observó que los peso a la canal promedio en kg. por categoría positivos a T. bonina en novillos 272,89 kg. vaquillas 227,79kg. vacas 255,08kg. otras categorías 341,00kg. (61).

Figura 7. Resultados positivos a *M. bovis* referente a los rangos de pesos de bovinos.



Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

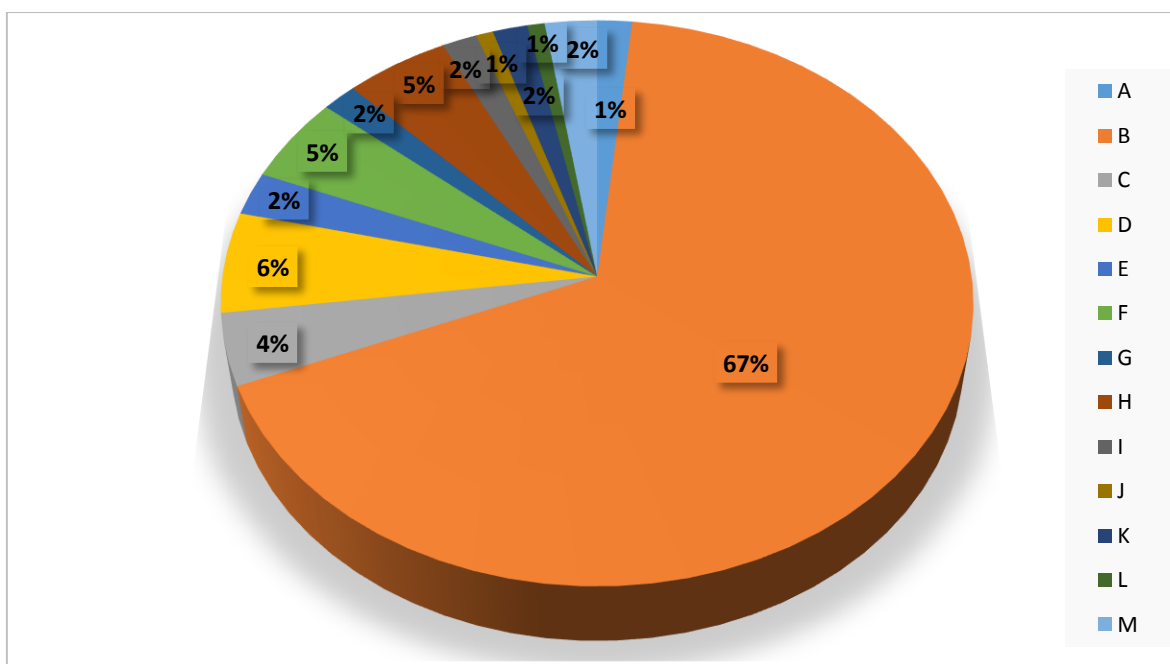
4.1.6. Procedencia.

En la Figura 8, se ilustra datos de las procedencias de animales bovinos que fueron faenadas en el transcurso de la investigación las cuales se tomaron de las guías de movilización.

Al realizar la evaluación de los datos de la procedencia en animales sometido a la investigación en el camal Municipal del Cantón El Empalme obtenidos de las guías de movilización refleja la Parroquia El Rosario 1%, Feria de comercialización de ganado Santo Domingo de los Tsachilas 67%, recinto Isla El Palmar 4%, recinto San Francisco del Congo 6%, recinto La Guayaquil 2%, recinto Barraganete 5%, recinto El Limón 2%, Parroquia La Guayas 5%, recinto La Caraca 2%, INIAP Pichilingue 1%, recinto Las Tecas 2%, recinto La Carmela 1%, Cantón Pichincha 2%. Siendo así los animales de la Feria de comercialización de ganado Santo Domingo de los Tsachilas los más faenados.

Podría estar vinculada a la tasa de incidencia 1.70% la infección en el Cantón Mejía podría atribuirse a la procedencia geográfica de los animales vinculados a una zona con explotaciones lecheras que tienen sistemas de manejo intensivo (59). Se ha demostrado que el lugar de procedencia de los animales es un factor determinante en la presentación de *M. bovis* en dos zonas de la sierra norte del Ecuador (60).

Figura 8. Resultados de animales positivo a *M. bovis* respecto a su procedencia.



Elaborado: Claudio Palacios Cobeña.

En la tabla 5, se ilustra el análisis de resultados del valor económico obtenido en el proceso de realización de recolección de muestra, extracción de ADN, y aplicación de la técnica de LAMP con un costo por muestra de \$ 1.81.

El costo del test QuantiFERON-TB por persona fue de \$ 33,67, del cual pertenece a costos de laboratorio y kits comerciales del test (62).

Tabla 5. *Costos por reacción de muestra para la detección de M. bovis.*

Detalle	Costo unitario	Costo total de 360 muestras
Recolección de las muestras	0.05	18
Extracción de ADN	0.10	36
Amplificación isotérmica	0.26	93.60
Técnica LAMP	0.80	288
Gel de agarosa	0.40	144
Energía	0.20	72
Total	1.81	651.60

Elaborado: *Claudio Palacios Cobeña.*

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- De acuerdo a los resultados se puede determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de LAMP para el diagnóstico de *M. bovis* el cual aportaría al análisis de canales bovinas antes de su comercialización.
- La prevalencia de *M. bovis* en los animales faenados en el camal Municipal del cantón El Empalme en el transcurso de la investigación presentaron 122 (33.15%) animales positivos y 246 (66.85%) animales negativos.
- Se pudo determinar el costo de reacción por muestras de \$1.81.

5.2. Recomendaciones.

- Utilizar esta técnica molecular para el diagnóstico *M. bovis* el cual aportaría al análisis de canales bovinas antes de su comercialización.
- Emplear esta técnica por ser una herramienta útil y altamente efectiva para el diagnóstico de *M. bovis* en una canal bovina.
- Utilizar esta técnica como una buena alternativa ya que es económica, rápida y segura, por lo que puede ser utilizada para detectar un gran número de enfermedades.
- Se debería considerar para un próximo trabajo de investigación relacionado tomar el peso y dimensiones de los ganglios tomados como muestras.

CAPÍTULO VI.
BIBLIOGRAFÍA

6.1. BIBLIOGRAFÍA

1. **López, Alex Yasmir y Ramos, Romario Edgardo.** UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR. [En línea] Junio de 2017. <http://ri.ues.edu.sv/16292/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20sensibilidad%20y%20la%20especificidad%20del%20Gene%20Xpert%20MTBRIF%20en%20la%20detecci%C3%B3n%20del%20mycobacterium%20tuberculosis%20en%20muestras%20pulmonares%20del%20Laboratorio%20Nacional%20de%20>
2. **Reyes , P.** [En línea] 14 de Agosto de 2012. http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_15_I_semestre_2012/libros/monografi.
3. **OIE.** [En línea] 08 de Abril de 2008. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.03_Tuberculosis_bovina.pdf.
4. **Organización Mundial de la Salud.** *Informe Mundial sobre la Tuberculosis 2017.* 2017.
5. **El Universo.** La tuberculosis sensible afecta a 2.938 personas de Guayas. *La tuberculosis sensible afecta a 2.938 personas de Guayas.* 2014.
6. *¿Ordeñando micobacterias del ganado? Impacto económico y en salud de Tuberculosis bovina y Paratuberculosis en Colombia.* **de Waard, Jacobus.** 2, Colombia : Rev.MVZ Córdoba, 2010, Vol. 15, págs. 2037-2040. 0122-0268/1909-0544.
7. *Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland.* **Boland, F., y otros.** 2-3, EEUU : Prev Vet Med, 2010, Vol. 93, págs. 153-161. 0167-5877.
8. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* **Mullis, KB. y Faloona, FA.** s.l. : Mullis, KB.; Faloona, FA. (1987) "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", 155, pp. 335-350, 1987, Vol. 155, págs. 335-350.
9. *Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus Sclerotinia.* **Abd-Elmagid, A., y otros.** 3, EEUU : J Microbiol Methods, 2013, Vol. 92, págs. 293-300 .
10. *Highly Sensitive End-Point PCR and SYBR Green qPCR Detection of Phymatotrichopsis omnivora, Causal Fungus of Cotton Root Rot.* **Arif, M., y otros.** 9, s.l. : APS, 2014, APS, Vol. 98, págs. 1205-1212 . 2153-0297.
11. *Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad.* **Fernández, P. y Pértegas, S.** s.l. : Fistera, 2010, Vol. 10, págs. 120-124.
12. *Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el diagnóstico sanitario.* **Garrido, P.** Ecuador : Ecuador es calidad: Revista Científica Ecuatoriana, 2016, Vol. 3. 1390-9223/1390-9223.

13. *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. **Bolivar, AM., Rojas, A. y Garcia-Lugo, P.** 1, Mérida- Venezuela : Avances en Biomedicina, 2014, Vol. 3, págs. 25-33. 2244-7881.
14. **Bembibre, Cecilia**. Definición ABC. *Definición ABC*. [En línea] 29 de 06 de 2010. <https://www.definicionabc.com/salud/tuberculosis.php>.
15. *Tuberculosis caused by Mycobacterium bovis, a re-emerging infection?* **Pérez Barragán, Edgar y Manjarrez Tellez , Bulmano .** 5, México : s.n., 2017, Vol. 55.
16. *La Tuberculosis Bovina en América Latina. Situación Actual y Recomendaciones*. **IKantor, Isabel .** s.l. : Mayo, 2016, Vol. 20 .
17. **EDUCALINGO.** EDUCALINGO. *EDUCALINGO.* [En línea] <https://educalingo.com/es/dic-es/microbiologico>.
18. **Bembibre, Cecilia .** Definición ABC. *Definición ABC*. [En línea] Cecilia Bembibre, 29 de 06 de 2010. <https://www.definicionabc.com/salud/tuberculosis.php>.
19. **Eiken Chemical Co., Ltd.** Eiken GENOME SITE. *Eiken GENOME SITE*. [En línea] 2005. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>.
20. **Bembibre. , Cecilia .** Definición ABC. *Definición ABC*. [En línea] 22 de 02 de 2010. <https://www.definicionabc.com/ciencia/incidencia.php>.
21. **Ibáñez, Consuelo**. Salud Pública y algo más. *Salud Pública y algo más*. [En línea] 29 de Febrero de 2012. www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2012/02/29/133136.
22. **Pérez, Julián y Merino, María**. Definición de. *Definición de*. [En línea] 2015. <https://definicion.de/prevalencia/>.
23. **Estepa Becerra, José Alexander**. Panorama de las zoonosis en Bogotá, abordajes para su monitoreo, prevención y control. [En línea] 2013. <http://bdigital.unal.edu.co/43190/1/79804087.2013.pdf>.
24. **Galván Gaytán, Estephany Maricela .** [En línea] 4 de Agosto de 2015.
25. **Pérez Porto, Julián y Merino , María.** [En línea] 2014. <https://definicion.de/sensibilidad/>.
26. **BioDic.** BioDic. *BioDic.* [En línea] <https://www.biodic.net/palabra/especificidad/#.XNlhm6S23IU>.
27. **Mendoza Wong, Eliel .** Universidad Autonoma de Chihuahua. [En línea] http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/pdf/01_Historia.pdf.
28. *Mycobacterium tuberculosis: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa*. **Ramirez Rivera , Nilda Alejandra, y otros.** 2, Xalapa : s.n., 2002, Vol. 2.

29. **Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.** Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. *Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades*. [En línea] 18 de Octubre de 2018. <https://www.cdc.gov/parasites/es/animals.html>.
30. *Microbiología de la tuberculosis.* **Dorronsoro, I. y Torroba, L.** San Navarra : s.n., 2007 , Vol. 30.
31. **Mendoza Wong, Eliel.** [En línea] http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/pdf/02_biologia.pdf.
32. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* **Fernández de Vega, Fernando Alcaide, y otros.** 2005.
33. **Instituto Nacional De Seguridad E Higiene En El Trabajo.** DATABIO. DATABIO. [En línea] <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Mycobacterium%20tuberculosis.pdf>.
34. *Genotyping methods for Mycobacterium bovis. Review.* **Acosta Salinas , Rosalinda, Estrada Chávez, Ciro y Milián Suazo, Feliciano .** 4, Mérida : s.n., 2009, Vol. 47.
35. *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis.* **Gutierrez, MC, y otros.** Paris : s.n., 2005.
36. *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex.* **Brosch , R, y otros.** Paris : s.n., 2002.
37. *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis.* **Garnier , T, y otros.** Paris : s.n., 2003.
38. *Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains.* **Hermans , PW1, y otros.** Bilthoven : s.n.
39. *Tuberculosis in humans and animals: an overview.* **Lobue, PA, Enarson, DA y Thoen, CO.** Atlanta, Georgia : s.n., 2010.
40. *Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries.* **Cosivi, O, y otros.** Ginebra, Suiza : s.n., 1998.
41. *Mycobacterium bovis at the animal-human interface: a problem, or not?* **Michel , AL, Müller , B y Van Helden , PD.** Sudáfrica : s.n., 2010.
42. *Human tuberculosis due to Mycobacterium bovis in the United States, 1995-2005.* **Hlavsa , MC, y otros.** Atlanta, Georgia : s.n., 2008.
43. *Epidemiology of Human Mycobacterium bovis Disease, California, USA, 2003–2011.* **Gallivan, Mark, Shah, Neha y Flood, Jennifer.** 2015.

44. *Human Mycobacterium bovis infection in ten Latin American countries.* **de Kantor , IN, y otros.** Buenos Aires : s.n., 2008.
45. *Trends of Mycobacterium bovis Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance.* **Bobadilla-del Valle , M, y otros.** MÉXICO : s.n., 2015.
46. *Human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis in the United States, Latin America and the Caribbean.* **De Kantor , IN, LoBue , PA y Thoen , CO.** Buenos Aires : s.n., 2010.
47. *Molecular identification of Mycobacterium bovis and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients.* **Portillo-Gómez , L y Sosa-Iglesias , EG.** Guadalajara, Jalisco : s.n., 2011.
48. *Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by Mycobacterium bovis.* **Torres-Gonzalez , P, y otros.** México : s.n., 2013.
49. *Tuberculosis due to Mycobacterium bovis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus.* **Park , D, y otros.** San Diego, California : s.n., 2010.
50. *The pyruvate requirement of some members of the Mycobacterium tuberculosis complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth.* **Keating , LA, y otros.** Reino Unido : s.n., 2005.
51. **Organización Panamericana de la Salud .** Organización Panamericana de la Salud . [En línea] 2008. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/18616>.
52. *LA TUBERCULOSIS BOVINA EN AMÉRICA LATINA. .* **De Kantor, I. N., y otros.** Buenos Aires : s.n., 2008.
53. *Human Mycobacterium bovis infection in ten Latin American countries.* **de Kantor , IN, y otros.** Buenos Aires : s.n., 2008.
54. *Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico.* **Sánchez, Edwin, y otros.** 2014, Vol. 2.
55. **Echeverría , Gustavo A.** DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA (TBB) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE NESTED-PCR EN BOVINOS FAENADOS EN LOS CAMALES MUNICIPALES DE LOS CANTONES CAYAMBE (PICHINCHA) Y PELILEO (TUNGURAHUA). [En línea] Diciembre de 2011.
56. **Ramos Orbelín , Soberanis.** Factores ocupacionales asociados a infección y tuberculosis por Mycobacterium bovis en trabajadores de establos del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo. [En línea] Mayo de 2013.
57. *VALORACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA TUBERCULOSIS BOVINA EN UN REBAÑO BOVINO UBICADO EN ZONA DE ALTA INCIDENCIA DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA.* **Rivera P., Sergio , Jiménez, José Francisco y Deward , Jacobus .** 6, Venezuela : s.n., 2009, Vol. XIX.

58. *Diagnóstico de tuberculosis bovina, mediante la prueba intradérmica cervical comparada en cinco hatos lecheros en la ciudad de Otavalo, provincia de Imbabura.* **Herrera Cifuentes, Estuardo Wladimir.** Otavalo : Quito: Universidad de las Américas, 2011, 2011.
59. *Comparative intradermal tuberculin test in dairy cattle in the north of Ecuador and risk factors associated with bovine tuberculosis. .* **Proaño-Pérez, F., y otros.** 2009.
60. *Prevalence of bovine tuberculosis in slaughtered cattle identified by nested-PCR in abattoirs from two dairy areas of Ecuador.* **Echeverría, G., y otros.** 2014.
61. *BOLETÍN VETERINARIO OFICIAL, BVO N°14, ISEMESTRE 2012* Prevalencia y pérdidas económicas provocadas por tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en una planta faenadora de la Región de Los Lagos, 2006 -2010/16 Prevalencia y pérdidas económicas provocadas por. **Flores Sandoval, Héctor Osvaldo.** 10.
62. *Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-blood interferon-gamma assay. .* **Dewan , PK, y otros.** 2006.
63. *Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología [En línea] 2016.* **INAMHI.** El Empalme : s.n., 2016.
64. **Maria Paz de Andrade.** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 15 de 02 de 2016. <https://www.definicionabc.com/salud/epidemiologia.php>.
65. **Bembibre., Cecilia.** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 12 de 07 de 2009. <https://www.definicionabc.com/salud/prevalencia.php>.
66. **Ucha, Florencia .** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 20 de 03 de 2009. <https://www.definicionabc.com/salud/infeccion.php>.
67. —. Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 19 de 03 de 2009. <https://www.definicionabc.com/salud/patogeno.php>.
68. **Paz , Maria .** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 01 de 02 de 2018. <https://www.definicionabc.com/salud/macrofago.php>.
69. **Bembibre, Cecilia .** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 18 de 12 de 2010. <https://www.definicionabc.com/salud/fagocitar.php>.
70. **Nava, Amapola .** CONACYT. *CONACYT.* [En línea] <http://www.conacytprensa.mx/index.php/vocabulario/17207-signos-clinicos>.
71. **Navarro, Javier .** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 08 de 03 de 2010. <https://www.definicionabc.com/salud/morbilidad.php>.
72. **Bembibre, Cecilia .** Definición ABC. *Definición ABC.* [En línea] 06 de 07 de 2009. www.definicionabc.com/social/mortalidad.php.

73. **Javier, Navarro y Navarro, Javier.** Definición ABC. *Definición ABC*. [En línea] 13 de 09 de 2016. <https://www.definicionabc.com/ciencia/post-mortem.php>.
74. **Torre, Pedro .** Buenos Aires : s.n.
75. **Pérez , Julián y Gardey, Ana.** Definción de. *Definción de*. [En línea] 2012. <https://definicion.de/epidemiologia/>).
76. —. Definición de. *Definición de*. [En línea] 2013. <https://definicion.de/infeccion/>).
77. **CONCEPTODEFINICION.** [En línea] 25 de Octubre de 2017. [Conceptodefinicion.de/infeccion/](https://conceptodefinicion.de/infeccion/).
78. **ElComercio.** Un millón de niños tienen tuberculosis en el mundo .
79. **El Universo.** La tuberculosis sensible afecta a 2.938 personas de Guayas. *La tuberculosis sensible afecta a 2.938 personas de Guayas*. 2014.
80. **Rouillon , A, Perdrizet , S y Parrot , R.** [En línea]
81. **INEC.** INEC. *INEC*. [En línea] 2010. [app.sni.gob.ec/sin-link/sin/portal SIN 2014/FICHAS F/0908_EL EMPALME GUAYAS.pdf](http://app.sni.gob.ec/sin-link/sin/portal/SIN2014/FICHAS/F/0908_EL_EMPALME_GUAYAS.pdf) .
82. **López , Calleja , y otros.** [En línea] 2014.
83. **EcuRed.** EcuRed. *EcuRed*. [En línea] 12 de julio de 2018. <https://www.ecured.cu/Raza>.
84. **Pérez, Julián y Gardey, Ana.** [En línea] 2012. <https://definicion.de/edad/>.
85. [En línea] 2017.
86. **Cordova, Patricia .** [En línea] 2018.
87. **Pérez , Julián y Merino., María .** [En línea] 2013. <https://definicion.de/zoonosis/>.
88. **Google Maps.** Google Maps. *Google Maps*. [En línea] Agosto de 2018. [https://www.google.com/maps/place/Gobierno+Aut%C3%B3nomo+Descentralizado+Velasco+Ibarra+\(El+Empalme\)/@-1.0457251,-79.6366818,1008m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x902b5b4c688ebb0d:0x55496a93aea5f439!8m2!3d-1.0443376!4d-79.63457](https://www.google.com/maps/place/Gobierno+Aut%C3%B3nomo+Descentralizado+Velasco+Ibarra+(El+Empalme)/@-1.0457251,-79.6366818,1008m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x902b5b4c688ebb0d:0x55496a93aea5f439!8m2!3d-1.0443376!4d-79.63457).
89. **Canal Didier, Ana María .** TUBERCULOSIS BOVINA: VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN MATADEROS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE (ARGENTINA) Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN LESIONES GRANULOMATOSAS DE ANIMALES INFECTADOS. [En línea] 2013.
90. **Breve historia de la Tuberculosis . Cartes Parra, Juan Carlos.** Costa Rica : s.n., 2013.
91. **Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. Cosivi, O, y otros.** Ginebra, Suiza : s.n., 1998.

CAPÍTULO VII.
ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de nódulos pulmonares bovinos por el método de TENS modificado.

Pasos previos a la extracción:

- b. En el caso de muestras de tejido se macera aproximadamente 100 mg.

Extracción:

- 1) Agregar 400 μ L de tampón de extracción TENS (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 μ L de proteinasa K (20mg/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 a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 11) Resuspender con 50 μ L de TE.
- 12) Agregar Rnasa 0.5 μ L. Homogenizar y se llevó a Incubar a 37 °C por 30 minutos.
- 13) Además, se incluyó siempre un control negativo de la extracción de ADN empleando agua destilada estéril.

Anexo 2. Protocolo de amplificación de la técnica de LAMP.

Preparación del mix (mezcla) para la LAMP.

Es importante considerar en la preparación del mix el número de muestras que se van a realizar, e incluir el control negativo C (-) que sirve como testigo para confirmar que los reactivos no están contaminados.

De este número total de análisis a realizar, se aumentará un tubo de reacción en los cálculos de los reactivos que constituyen el mix.

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

Tabla 3. Preparación de LAMPmix.

Reactivos	Para un tubo de reacción
Agua ultra pura	4.5 µL
Primer –FIP (20 pmol/ µL	2.0 µL
Primer –BIP (20 pmol/ µL	2.0 µL
Primer –F3 (10 pmol/ µL	1.0 µL
Primer –FIP (10 pmol/ µL	1.0 µL
Reactivo R1 (dNTPs 10 Mm)	3.5 µL
Reactivo R2 (Buffer 10 X Bst)	2.5 µL
Reactivo R3 (Mg So4 100 Mm)	
Reactivo R4 (Betaina 5 M)	1.5 µL
Bst DNA Pol (8000 U/mL)	4.0 µL
	1.0 µL
Volumen Final	23.0 µL

- Repartir 23µL de LAMPmix en cada micrutubo de 0,2ml.
- Añadir 2µL de ADN extraído o control y mezclar.
- Cubrir con 20µL de aceite mineral si es necesario (opcional).
- Colocar los tubos en baño de María o en un baño seco o un termociclador.

3.8.2.1. Programación de la reacción.

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

Anexo 3. Resultados.

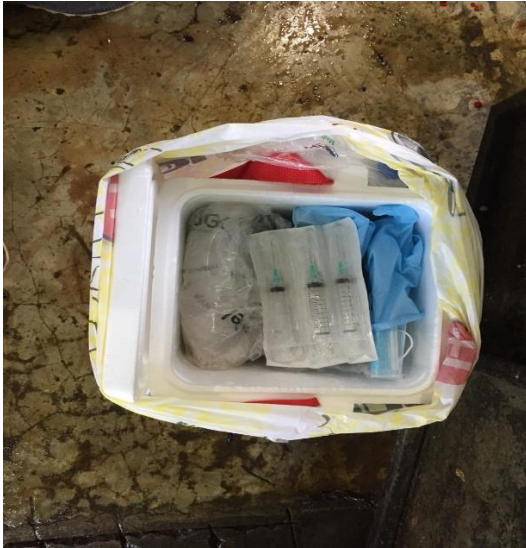
Tabla 6. Resultados obtenidos de LAMP para detección de *M. bovis*.

Semanas	Número de muestras	Positivos	Porcentajes de animales Positivos	Negativos	Porcentaje de animales Negativos	Total
1	46	19	41.30 %	27	58.70 %	100%
2	46	12	26.09%	34	73.91%	100%
3	46	18	39.13%	28	60.87%	100%
4	46	13	28.26%	33	71.74%	100%
5	46	16	34.78%	30	65.22%	100%
6	46	17	36.96%	29	63.04%	100%
7	46	8	17.39%	38	82.61%	100%
8	46	19	41.30%	27	58.70%	100%
Total	368	122	33.15%	246	66.85%	100%

Elaborado: Claudio Palacios Cobeña

Los resultados del cuadro 11 indican que, del total de muestras de nódulos pulmonares analizado, presento un 33.15% animales positivos con la técnica de LAMP, mientras tanto el presento un 66.85%, animales negativos del total de las muestras lo que sugiere que la técnica molecular de LAMP es eficaz para realizar ensayos para la detección de *M. bovis*.

Anexo 4. Fotografías de la Investigación



**FOTO 1: CAJA TÉRMICA Y
MATERIALES PARA LA TOMA DE
MUESTRAS**



FOTO 2: ÓRGANOS PULMONAR



**FOTO 3: TOMA DE MUESTRAS DE
NÓDULOS PULMONAR**



**FOTO 4: CANALES DE BOVINOS
FAENADOS CAMAL DE EL EMPALME**



FOTO 5: BAÑO MARÍA 56°C



FOTO 6: EXTRACCIÓN DE ADN CON PROTOCOLO DE TENS MODIFICADO



FOTO 7: MATERIALES Y REACTIVOS PARA PREPARACIÓN DE LAMP MIX



FOTO 8: PREPARACIÓN DE LAMP MIX



FOTO 9: MEZCLA DE LAMP Y SOLUCION BLUE JUICE



FOTO 10: DEPOSITAR LA MEZCLA DE LAMP EN EL GEL DE AGAROSE