



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera Zootecnista.

Título del Proyecto de Investigación:

**“Análisis basado en lamp (Amplificación isotérmica mediada por Loop) PARA LA
detección de *Mycobacterium bovis* en el camal municipal del cantón Valencia”.**

Autora:

Rosa Gabriela Bermeo Quiroz

Directora:

Dra. Diana Lucía Vasco Mora

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Rosa Gabriela Bermeo Quiroz**, declaro que la investigación aquí descrita 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 (UTEQ), puede hacer uso de los derechos correspondientes en este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Rosa Gabriela Bermeo Quiroz

CC. # 0941056590

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La suscrita, **Dra. Diana Lucía Vasco Mora**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la egresada **Rosa Gabriela Bermeo Quiroz**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “**ANÁLISIS BASADO EN LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop) PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium bovis* EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN VALENCIA**”, previo a la obtención del título de Ingeniera Zootecnista, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Dra. Diana Lucía Vasco Mora
DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, la suscrita Dra. Diana Lucía Vasco Mora, en calidad de directora del Proyecto de Investigación titulado “**ANÁLISIS BASADO EN LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop) PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium bovis* EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN VALENCIA**” de autoría de la estudiante **ROSA GABRIELA BERMEO QUIROZ**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 4%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Urkund Analysis Result

Analysed Document:	TESIS - ROSITA 27-05-2019 URKUND.docx (D52995927)
Submitted:	5/28/2019 3:17:00 AM
Submitted By:	rosa.bermeo2013@uteq.edu.ec
Significance:	4 %

Atentamente

Dra. Diana Lucía Vasco Mora

DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

Título:

**“ANÁLISIS BASADO EN LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop)
PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium bovis* EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL
CANTÓN VALENCIA”**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de
Ingeniera Zootecnista.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Emma Torres Navarrete

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

M.Sc. Adolfo Sánchez Laiño

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Italo Espinoza Guerra

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2019

RESUMEN EJECUTIVO

La tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica bacteriana, cuyo agente etiológico es el *Mycobacterium bovis*, afectando principalmente al ganado bovino, aunque también se la ha encontrado en algunos animales domésticos, salvajes e incluso en el hombre. El objetivo de la presente investigación fue determinar la prevalencia de *M. bovis* mediante la evaluación de tejido pulmonar obtenido en el camal municipal del cantón Valencia a través de la técnica de LAMP, se muestrearon un total de 200 animales en un periodo de ocho semanas consecutivas, al finalizar la toma de muestras se obtuvo evidencias que, de los 200 animales muestreados, un total de 123 resultaron positivo a tuberculosis, representando el 61,5% del total. Por otro lado, el 52,5 % de las muestras tomadas de los animales faenados en el camal municipal del cantón Valencia corresponde a la raza Holstein, seguido por el 31.5% de la raza Brahman y el 11 y 5% corresponde a la raza Brown swiss y Nelore respectivamente. Un 68,5 de las muestras se tomaron en hembras y el 31,5% correspondió a machos. En su gran mayoría los animales muestreados, fueron animales adultos, representando el 47% animales de 6 a 8 años aproximadamente, el 26,5% de animales de 3 a 4 años al igual que animales de 4 a 5 años. De los animales que fueron muestreados, la mayoría fueron procedentes del cantón La Maná, con un 39,5%, seguido por el 25% procedente de Valencia, el 9,5 de La Unión al igual que Pujilí, así mismo se tomó muestra de animales provenientes de Quevedo, El Vergel y Pucayacu representado por un 7; 5; 4,5% respectivamente, en lo referente al peso, no se logró obtener datos dado a las condiciones físicas del camal municipal del cantón Valencia, la desconfianza de los productores y la rapidez del proceso del faenamiento, se determinó una prevalencia del 0,615 por ciento.

Palabras claves: Bovinos, tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, zoonosis, prevalencia.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a bacterial zoonotic disease, whose etiological agent is *Mycobacterium bovis*, affecting mainly cattle, although it has also been found in some domestic animals, wild animals and even in humans. The objective of the present investigation was to determine the prevalence of *M. bovis* through the evaluation of lung tissue obtained in the municipal slaughterhouse of the Valencia canton through the LAMP technique, a total of 200 animals were sampled in a period of eight consecutive weeks. , at the end of the sampling, evidence was obtained that, of the 200 animals sampled, a total of 123 were positive for tuberculosis, representing 61.5% of the total. On the other hand, 52.5% of the samples taken from the animals slaughtered in the municipal slaughterhouse of the Valencia canton correspond to the Holstein race, followed by 31.5% of the Brahman race and 11 and 5% correspond to the Brown breed swiss and Nelore respectively. 68.5 of the samples were taken in females and 31.5% corresponded to males. The vast majority of the animals sampled were adult animals, representing 47% of animals aged 6 to 8 years, 26.5% of animals aged 3 to 4 years, and animals of 4 to 5 years. Of the animals that were sampled, the majority came from the canton of La Maná, with 39.5%, followed by 25% from Valencia, 9.5 from La Unión, as well as Pujilí, as well as samples from animals from Quevedo, El Vergel and Pucayacu represented by a 7; 5; 4.5% respectively, in relation to the weight, it was not possible to obtain data given the physical conditions of the municipal slaughterhouse of the Valencia canton, the distrust of the producers and the speed of the slaughter process, a prevalence of 0.615% was determined.

Key words: Cattle, bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, zoonosis, prevalence.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
PORTADA	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
RESUMEN EJECUTIVO.....	vi
ABSTRACT	vii
CÓDIGO DUBLÍN.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	2
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1. Problema de la investigación.....	3
1.1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.1.2. Formulación del problema	3
1.1.3. Sistematización del problema.....	3
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
1.3. Justificación	5
CAPÍTULO II.....	6
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	6
2.1. Marco conceptual.....	7
2.1.1. Tuberculosis.....	7
2.1.2. Mycobacterium.....	7
2.1.3. Prevalencia.....	7
2.2. Marco referencial.....	9
2.2.1. Tuberculosis Bovina.....	9
2.2.2. Presentación clínica.....	11
2.2.2.1. Bovinos	11
2.2.2.2. Porcinos.....	12
2.2.2.3. Humanos	12
2.2.2.4. Mascotas.....	12
2.2.3. Distribución geográfica.....	13
2.2.4. Transmisión	13

2.2.4.1.	¿Cómo se infectan las personas con <i>M. bovis</i> ?	15
2.2.4.2.	¿Cómo puedo saber si he sido infectado con <i>M. bovis</i> ?	15
2.2.5.	Síntomas	16
2.2.6.	Patogenia	17
2.2.7.	Diagnóstico	17
2.2.8.	Lesiones	18
2.2.8.1.	Macroscópicas:	18
2.2.8.2.	Microscópicas	18
2.2.9.	Tratamiento	18
2.2.10.	Prevención	19
2.2.12.	Técnica LAMP	20
2.2.13.	Propiedades de LAMP	22
2.2.14.	Cebadores	22
2.2.15.	Amplificación	23
2.2.16.	Amplificación de RNA	24
2.2.17.	Bst polimerasa	24
CAPÍTULO III		25
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		25
3.1.	Localización	26
3.2.	Tipo de investigación	26
3.3.	Métodos de investigación	26
3.4.	Fuentes de recopilación de información	26
3.5.	Instrumentos de la investigación	27
3.5.1.	Variables estudiadas	27
3.5.2.	Descripción del proceso	27
3.5.2.1.	Tamaño de la muestra	27
3.5.2.2.	Toma de muestras	28
3.5.2.3.	Preparación de la muestra	28
3.5.2.4.	Extracción de ADN	29
3.5.2.4.1.	Protocolo de TENS	29
3.5.2.4.2.	Verificación de presencia de ADN	30
3.5.2.5.	Técnica de LAMP	31
3.5.2.6.	Prevalencia	34
3.6.	Tratamiento de los datos	34
3.7.	Recursos humanos y materiales	34
3.7.1.	Humanos	34
3.7.2.	Materiales	35

3.7.2.1. Materiales de campo	35
3.7.2.3. Materiales de laboratorio	35
3.7.2.4. Reactivos	36
CAPÍTULO IV	37
RESULTADOS Y DISCUSION.....	37
4.1. Análisis estadístico	38
4.2. Prevalencia de la enfermedad	40
4.3. Análisis económico	40
CAPITULO V.....	41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
CAPITULO VI.....	44
BIBILOGRAFIA.....	44
CAPÍTULO VII.....	47
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Resultados de análisis de laboratorio.	38
Tabla 2. Razas de animales portadores de tuberculosis.	38
Tabla 3. Sexo de animales portadores de tuberculosis.	39
Tabla 4 Edades de animales portadores de tuberculosis.	39
Tabla 5 <i>Procedencia de animales portadores de tuberculosis.</i>	39
Tabla 6 Prevalencia de la enfermedad.....	40
Tabla 7 Análisis económico por muestra	40
Tabla 8. Razas de animales muestreados.	53
Tabla 9. Sexo de animales muestreados.	54
Tabla 10. <i>Edades de animales muestreados.</i>	54
Tabla 11. <i>Edades de animales muestreados.</i>	54
Tabla 12 Costos de reactivos de gel de agarosa al 1%.	54
Tabla 13 Costos de reactivos de gel de agarosa al 2%.	55
Tabla 14 Costos de reactivos para técnica de LAMP.....	55
Tabla 15 Costos de materiales.....	55
Tabla 16 Costos de reactivos para extracción de ADN.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido	Página
Ilustración 1. Rutas de salida de una infección.....	8
Ilustración 2. Ciclo de transmisión de <i>Mycobacterium bovis</i> entre bovinos y humanos.....	15
Ilustración 3. Gel de agarosa de las muestras de la 1 a la 13 de la semana 1.	31
Ilustración 4. Preparación del LAMPmix.....	32
Ilustración 5. Aplicación de LAMP.....	32
Ilustración 6. Gel de agarosa observado a través de la foto documentador.....	33

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido	Pagina
Anexo 1. Preparación y elaboración de materiales de trabajo de laboratorio.	48
Anexo 2. Preparación de reactivos.	48
Anexo 3. Proceso de faenamamiento.	49
Anexo 4. Toma de muestra.	50
Anexo 5. Transporte y almacenamiento de muestras.	50
Anexo 6. Preparación de la muestra.	51
Anexo 7. Preparación de la reacción LAMPmix.	52
Anexo 8. Aplicación de la técnica de LAMP.	53

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“ANÁLISIS BASADO EN LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop) PARA LA DETECCIÓN DE <i>Mycobacterium bovis</i> EN EL CAMAL MUNICIPAL DEL CANTÓN VALENCIA”				
Autor:	Bermeo Quiroz Rosa Gabriela				
Palabras clave:	Bovinos	Tuberculosis bovina	Mycobacterium bovis	Zoonosis	Prevalencia
Fecha de publicación:					
Editorial:					
Resumen:	<p>La tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica bacteriana, cuyo agente etiológico es el <i>Mycobacterium bovis</i>, afectando principalmente al ganado bovino, aunque también se la ha encontrado en algunos animales domésticos, salvajes e incluso en el hombre. El objetivo de la presente investigación fue determinar la prevalencia de <i>M. bovis</i> mediante la evaluación de tejido pulmonar obtenido en el camal municipal del cantón Valencia a través de la técnica de LAMP, se muestrearon un total de 200 animales en un periodo de ocho semanas consecutivas, al finalizar la toma de muestras se obtuvo evidencias que, de los 200 animales muestreados, un total de 123 resultaron positivo a tuberculosis, representando el 61,5% del total. Por otro lado, el 52,5 % de las muestras tomadas de los animales faenados en el camal municipal del cantón Valencia corresponde a la raza Holstein, seguido por el 31.5% de la raza Brahman y el 11 y 5% corresponde a la raza Brown swiss y Nelore respectivamente. Un 68,5 de las muestras se tomaron en hembras y el 31,5% correspondió a machos. En su gran mayoría los animales muestreados, fueron animales adultos, representando el 47% animales de 6 a 8 años aproximadamente, el 26,5% de animales de 3 a 4 años al igual que animales de 4 a 5 años. De los animales que fueron muestreados, la mayoría fueron procedentes del cantón La Maná, con un 39,5%, seguido por el 25% procedente de Valencia, el 9,5 de La Unión al igual que Pujilí, así mismo se tomó muestra de animales provenientes de Quevedo, El Vergel y Pucayacu representado</p>				

	<p>por un 7; 5; 4,5% respectivamente, en lo referente al peso, no se logró obtener datos dado a las condiciones físicas del camal municipal del cantón Valencia, la desconfianza de los productores y la rapidez del proceso del faenamiento, se determinó una prevalencia del 0,615 por ciento.</p> <p>Abstract: Bovine tuberculosis is a bacterial zoonotic disease, whose etiological agent is <i>Mycobacterium bovis</i>, affecting mainly cattle, although it has also been found in some domestic animals, wild animals and even in humans. The objective of the present investigation was to determine the prevalence of <i>M. bovis</i> through the evaluation of lung tissue obtained in the municipal slaughterhouse of the Valencia canton through the LAMP technique, a total of 200 animals were sampled in a period of eight consecutive weeks. , at the end of the sampling, evidence was obtained that, of the 200 animals sampled, a total of 123 were positive for tuberculosis, representing 61.5% of the total. On the other hand, 52.5% of the samples taken from the animals slaughtered in the municipal slaughterhouse of the Valencia canton correspond to the Holstein race, followed by 31.5% of the Brahman race and 11 and 5% correspond to the Brown breed swiss and Nelore respectively. 68.5 of the samples were taken in females and 31.5% corresponded to males. The vast majority of the animals sampled were adult animals, representing 47% of animals aged 6 to 8 years, 26.5% of animals aged 3 to 4 years, and animals of 4 to 5 years. Of the animals that were sampled, the majority came from the canton of La Maná, with 39.5%, followed by 25% from Valencia, 9.5 from La Unión, as well as Pujilí, as well as samples from animals from Quevedo, El Vergel and Pucayacu represented by a 7; 5; 4.5% respectively, in relation to the weight, it was not possible to obtain data given the physical conditions of the municipal slaughterhouse of the Valencia canton, the distrust of the producers and the speed of the slaughter process, a prevalence of 0.615% was determined.</p>
Descripción:	70 hojas; dimensiones, 29x21 cm + CD-ROM
URI:	

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica de los animales provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), un bacilo perteneciente al género *Mycobacterium*, que guarda una estrecha relación con las bacterias causantes de la tuberculosis humana y aviar. Aunque se considera que el verdadero hospedador del *M. bovis* es el ganado vacuno, también se ha descrito la enfermedad en muchos otros animales domésticos y no domésticos (1).

Mycobacterium bovis causa tuberculosis en el ganado, los humanos y otros primates, así como en otros animales como perros, gatos, cerdos, papagayos, entre otros. En humanos, la infección primaria puede producirse por inhalación o ingesta de productos contaminados, con mayor frecuencia 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 (2).

Aunque *M. bovis* no es el principal causante de la tuberculosis en el hombre (es *M. tuberculosis*), las personas pueden contraer la tuberculosis bovina al beber leche cruda de vacas enfermas o al inhalar gotículas infectivas. Se calcula que en ciertos países hasta un 10% de los casos de tuberculosis humana son debidos a la tuberculosis bovina (3).

La tuberculosis tiene importantes repercusiones económicas, debido a las pérdidas en la producción de leche, los decomisos de animales en mataderos, la prohibición del movimiento de los animales y por las campañas de control y erradicación (1).

El control de la tuberculosis bovina en las explotaciones es muy importante ya que se trata de una enfermedad que puede llegar a causar la muerte del animal y producir pérdidas económicas importantes tanto a ganaderos como a industria alimentaria (4).

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, crónica, zoonótica, de alto grado de propagación, de gran importancia, que, a más de afectar la explotación bovina, provocando baja producción de leche, pérdidas de peso e incluso decomiso de animales en el matadero, afecta considerablemente a los seres humanos, ya que debido a la falta de un control sanitario se puede llegar a comercializar una gran cantidad de productos y subproductos de bovinos no aptos para el consumo, entre ellos infectados de *Mycobacterium bovis*; en el 2016, 10,4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,7 millones murieron por esta.

1.1.2. Formulación del problema

Cuál es la prevalencia epidemiológica de *Mycobacterium Bovis* en animales faenados en el camal municipal del cantón Valencia

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cuál es la prevalencia de la *M. bovis* a nivel del camal municipal del cantón Valencia?

¿Cómo afecta la *M bovis* a los portadores?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Diagnosticar *Mycobacterium bovis* en el camal municipal del cantón Valencia a través de un análisis basado en LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop).

1.2.2. Objetivos específicos

- Establecer la prevalencia epidemiológica de *M. bovis* mediante la evaluación del tejido pulmonar obtenido de bovinos en el camal municipal del cantón Valencia a través de la técnica LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop).
- Realizar un análisis económico de la detección de *Mycobacterium bovis* a través de la técnica de LAMP (Amplificación isotérmica mediada por Loop).

1.3. Justificación

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa zoonótica, que se transmite por medio del consumo de productos y subproductos infectados de *Mycobacterium Bovis*, la cual es el agente causal de dicha enfermedad, también se puede adquirir por medio de la vía aerógena, es crónica y de un alto grado de contaminación. En la producción pecuaria provoca pérdidas económicas ya que causa baja producción de leche y una considerable baja de peso en los animales; en humanos también provoca pérdida de peso y en ambos casos incluso puede provocar la muerte del portador, dado al caso que no existe un control sanitario tanto en las ganaderías, como en los centros de faenamiento, los productos y subproductos de estos animales infectados no aptos para el consumo, son comercializadas, afectando considerablemente a las personas, el presente estudio permitirá contar con una base de datos actualizada, con él se podrá conocer la prevalencia epidemiología y así, esta permitirá preparar un programa de control y erradicación de la enfermedad para disminuir la mortalidad.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Tuberculosis

Es una enfermedad infecciosa, bacteriana y transmisible, es causada por bacterias del grupo *Mycobacterium*, las cuales atacan principalmente los pulmones. Aunque también pueden afectar a otros órganos como riñones, útero, huesos, piel, intestino o meninges, la enfermedad de tuberculosis puede ser mortal (5).

2.1.2. Mycobacterium

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5µm de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, son de crecimiento rápido y otros lento, en su estructura posee alrededor del 20 al 60% de lípidos, el género comprende 50 especies, entre ellas patógenos primarios, oportunistas y saprofitas. (6).

2.1.3. Prevalencia

El término prevalencia significa el mejor estimador de la probabilidad de que un animal tenga el evento de interés. Es una medida epidemiológica que se utiliza para cuantificar la presencia de una característica en una población animal en un punto del tiempo, es decir, de una manera estática y sin importar si son casos nuevos o viejos (7).

La prevalencia es una proporción que indica la frecuencia de un evento. En general, se define como la proporción de la población que padece la enfermedad en estudio en un momento dado, y se denomina únicamente como prevalencia (*p*). Como todas las proporciones, no tiene dimensiones y nunca puede tomar valores menores de 0 o mayores de 1. A menudo, se expresa como casos por 1 000 o por 100 habitantes (8).

2.1.4. Transmisión

Es un mecanismo esencial para que el agente infeccioso pueda transportarse de la puerta de salida de la fuente de infección a la puerta de entrada del hospedero. Dicha transmisión puede establecerse mediante contacto directo (proximidad e intimidad con diferentes fuentes de infección) o indirecto (vector, vehículo, o bien sustancias u objetos que pueden ser diseminadas por el aire) como se señala en el siguiente diagrama (7).

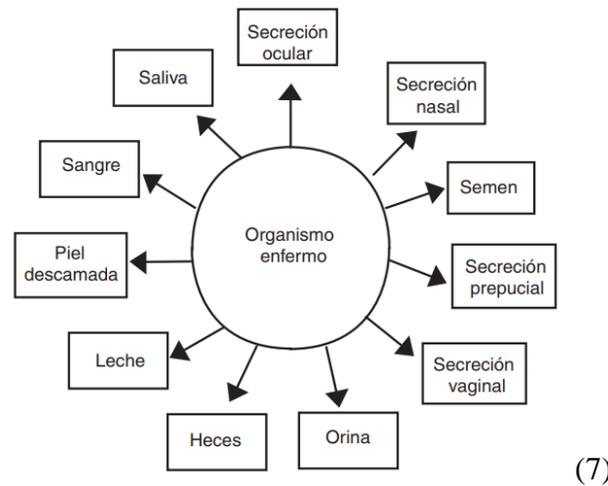


Ilustración 1. *Rutas de salida de una infección.*

2.2. Marco referencial

2.2.1. Tuberculosis Bovina

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica, de animales y del hombre, causada por *Mycobacterium bovis*. En muchos países la tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa importante en el ganado vacuno, en otros animales domésticos y en algunas poblaciones de animales salvajes. La transmisión al hombre representa un problema de salud pública. Se considera que la ruta más frecuente de infección del ganado es la exposición a aerosoles de *M. bovis*, aunque también se produce la infección por ingestión de material contaminado (9).

La tuberculosis bovina es causada por una bacteria GRAM-positiva, el *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad infecto-contagiosa; a más de afectar a bovinos, tiene un amplio rango de hospederos entre ellos, caprinos, ovinos, rumiantes silvestres, cerdos, perros, gatos, primates y el hombre. En general, la bacteria infecta por la vía aerógena, afectando principalmente los pulmones. Sin embargo, la infección progresa por las vías hematógica o linfática diseminándose a otras partes del cuerpo y afectando así otros órganos. En terneros afecta principalmente por la vía digestiva, ya que al amamantarlos con leche que contiene la bacteria adquieren la bacteria. Difícilmente se puede diagnosticar clínicamente esta enfermedad debido falta de signos visibles, observándose sólo fiebre, pérdida progresiva de peso y cuando el pulmón está afectado una tos húmeda, culminando con la muerte (10).

Se caracteriza normalmente por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos. Aunque se suele definir como una enfermedad crónica debilitante, la tuberculosis bovina puede presentar en ocasiones un curso agudo, rápido y progresivo. Cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos (sobre todo de la cabeza y tórax), pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo (9).

En las necropsias, un granuloma tuberculoso suele presentar un aspecto amarillento y consistencia caseosa, caseo-calcárea o calcificada. Ocasionalmente pueden ser purulentos. Existen algunos granulomas no tuberculosos en los que el contenido purulento verdoso está reemplazado por tejido granuloso, que pueden tener similitud con los granulomas tuberculosos. Normalmente, el centro caseoso es seco, firme, y está cubierto con una cápsula fibrosa conjuntiva de grosor variable. Los tejidos fijados de un tubérculo no se extraen intactos con facilidad, como ocurre con algunos granulomas no tuberculosos. El tamaño de las lesiones varía, desde tan pequeñas que pueden pasar desapercibidas a simple vista, hasta ocupar gran parte de un órgano. El corte seriado de órganos y tejidos resulta vital para detectar las lesiones contenidas en un tejido (9).

Mycobacterium bovis forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* junto con *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* y *M. africanum*. Los miembros de este grupo son mico- bacterias altamente relacionadas, que exhiben gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, los patrones de resistencia y la susceptibilidad a inhibidores. La secuencia genómica de *M. bovis* tiene cerca del 99 % de coincidencia con la de *M. tuberculosis*, por lo que son necesarias pruebas específicas para lograr su tipificación (10).

La *M. bovis* se encuentra con más frecuencia en el ganado vacuno y en otros animales como los búfalos, alces y venados. En las personas, la *M. bovis* causa la enfermedad de tuberculosis que puede afectar los pulmones, los ganglios linfáticos y otras partes del cuerpo. Sin embargo, tal como ocurre con la *M. tuberculosis*, no todas las personas infectadas con *M. bovis* se enferman (11).

Análisis de tuberculosis

En un trabajo realizado en la parte baja de la provincia de El Oro se determinó que, del total de 269 bovinos muestreados, sometidos a la prueba tuberculina PPD bovis, se obtuvieron

resultados 100% negativos a tuberculosis bovina, sin reacción alguna a la inyección intradérmica de tuberculina ni presencia de signos clínicos (12).

Posibles factores de riesgo

Sexo

Cushicóndor en un estudio sobre prevalencia de tuberculosis bovina mediante inspección post-mortem y cultivo microbiológico realizado en el cantón Mejía encontró que al analizar los factores de edad, biotipo, sexo y procedencia de los animales en relación a la positividad de LV compatibles con la tuberculosis y de *M. Bovis*, no se encontró ninguna asociación significativa (13).

El sexo no influyó en la presencia de LV y de *M. bovis*, aunque las hembras fueron las más afectadas (14).

Edad

En un trabajo realizado por Quinatoa y Chicaiza de análisis de factores de riesgo y determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina utilizando técnicas bayesianas en las provincias de Cotopaxi, Carchi e Imbabura mostro, que la edad aumenta el riesgo de la enfermedad, en animales adultos (OR = 4.95) debido a que tiene mayor tiempo de exposición al *Mycobacterium* en el medio ambiente (14).

2.2.2. Presentación clínica.

2.2.2.1. Bovinos

En los bovinos adultos la tuberculosis es habitualmente de inicio pulmonar, transmitida entre ellos por las microgotas producidas al toser. Es mucho más frecuente en vacas lecheras debido a que tienen un período de explotación más largo que las de carne y la frecuencia de la tuberculosis aumenta con la edad, se reúnen dos veces por día en espacios reducidos para

el ordeño, lo cual facilita la transmisión aerógena y soportan el esfuerzo de la producción láctea. En los terneros se puede presentar inicio digestivo intestinal si se infectan a partir de la leche (15).

2.2.2.2. Porcinos

En los porcinos el inicio de la tuberculosis es habitualmente digestivo, ya sea que ingieran vísceras con lesiones tuberculosas bovinas, aves con tuberculosis aviar o se infecten por micobacterias que se encuentren en el suelo por eliminación fecal de aves o expectoraciones humanas. También se infectan por el consumo de leche o suero de leche de residuos de quesería conteniendo el *Mycobacterium bovis* (15) .

2.2.2.3. Humanos

El hombre recibe habitualmente por vía aerógena el *Mycobacterium tuberculosis* transmitido por otras personas infectadas, pero puede recibir el *Mycobacterium bovis* por vía aerógena desde los bovinos si trabaja en una ganadería de leche y por vía digestiva si toma leche cruda o ingiere productos con lesiones tuberculosas (15).

2.2.2.4. Mascotas

El perro y el gato pueden infectarse por vía digestiva por ingestión de productos cárnicos contaminados (pulmón o «bofe» de vaca que se daba a los gatos antes de popularizarse el alimento balanceado) o por vía aerógena por convivencia con un humano tuberculoso. En las aves la tuberculosis por el *Mycobacterium avium* es digestiva (15).

Un caso especial es la infección con el *M. tuberculosis* de los papagayos mascotas a partir de los humanos y viceversa. En las cabras la presentación es similar a la tuberculosis bovina, pero en las ovejas es una enfermedad de presentación muy poco frecuente (15).

Siempre la tuberculosis estará facilitada por la mala alimentación, el agotamiento, la sobreexplotación, la tensión o estrés y las malas condiciones de alojamiento. Se han estudiado también factores predisponentes genéticos (15).

2.2.3. Distribución geográfica

Si bien la tuberculosis bovina alguna vez estuvo presente en el mundo entero, los programas de control prácticamente eliminaron esta enfermedad de los animales domésticos, en muchos países. Los países que actualmente se clasifican como libres de tuberculosis son Australia, Islandia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Austria, Suiza, Luxemburgo, Letonia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, República Checa, Canadá, Singapur, Jamaica, Barbados e Israel. Se están implementando programas de erradicación en otros países europeos, Japón, Nueva Zelanda, EE. UU, México y algunos países de América Central y del Sur. Aunque la tuberculosis bovina se erradicó de la mayoría de los estados de EE. UU; se continúan detectando algunos rodeos infectados y es por eso que algunos estados periódicamente pierden la categoría de “libres de la enfermedad”. Particularmente, un foco de infección en ciervos de cola blanca complicó la tarea de erradicación en Michigan. Canadá se considera libre de tuberculosis bovina desde 2006 (16).

2.2.4. Transmisión

De 80% a 90% de los casos la transmisión ocurre por vía aerógena; con la tos o espiración de un animal infectado se expelen gran cantidad de microgotitas que contienen la bacteria, las cuales, al ser inhaladas por otro bovino llegan al sistema respiratorio dando comienzo a una nueva infección. Esto se ve favorecido por el contacto directo diario de los bovinos en el pastoreo, los comederos, los corrales y las salas de ordeño. Otra vía de ingreso es la digestiva, por el consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal y orina que contengan el agente causal (17).

La vía digestiva es muy importante en terneros que se alimentan con leche cruda proveniente de vacas enfermas, debido a que de 1% a 2% de las vacas infectadas eliminan el microorganismo en la leche. Otras vías no comunes pero probables son: la cutánea, la congénita y la genital (17).

Cuando una persona inhala las bacterias de la tuberculosis, estas pueden alojarse en los pulmones y comenzar a multiplicarse. Desde allí, las bacterias pueden desplazarse por la sangre a otras partes del cuerpo, como los riñones, la columna vertebral y el cerebro.

Las personas con enfermedad de tuberculosis tienen más probabilidades de transmitírsela a las personas con las que pasan tiempo todos los días. Esto incluye a familiares, amigos y compañeros de trabajo o de escuela (18).

El modo de transmisión de *M. bovis* al hombre puede ser por el consumo de leche cruda infectada o sub-productos lácteos fabricados con esta leche infectada sin pasteurizar (causando tuberculosis intestinal), por aerosoles (causando tuberculosis pulmonar) o por inoculación traumática durante la manipulación de carnes proveniente de animales infectados en el matadero (causando lesiones en piel). Se estima que en Latino América el 2% de los casos de tuberculosis pulmonar y el 8% de los casos de tuberculosis extra pulmonar son causados por la infección con *M. bovis*. Sin embargo, dependiendo del nivel de exposición, el nivel de incidencia puede variar. En Argentina, en la provincia de Santa Fe, donde existe una prevalencia relativamente alta de tuberculosis en el ganado (5%), *M. bovis* fue el responsable entre el 2% y el 6,2% de los casos de tuberculosis humana durante el período de 1984 - 1989 y el 64% de esos pacientes fueron personal de mataderos o trabajadores de las áreas rurales.

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias E. Coni, en Santa Fé, mantiene un registro de los casos de tuberculosis desde 1977. Entre 1988 y 2006 se confirmaron por cultivo 2.485 casos pulmonares de tuberculosis, el porcentaje de los debidos a *M. bovis* fue 2.7% entre 1988 y 1993, 1.7% entre 1994 y 1999, y 1.3% entre 2000 y 2006. Aproximadamente el 70% de los casos de Tuberculosis bovina tenían relación de contacto directo con bovinos, y en su mayor parte eran trabajadores de frigoríficos y mataderos. Estos porcentajes decrecientes de la tuberculosis podrían estar relacionados con el progreso del Programa de Control y Erradicación en Argentina llevado por el SENASA y el mejoramiento de las condiciones sanitarias en la producción de alimentos (19).

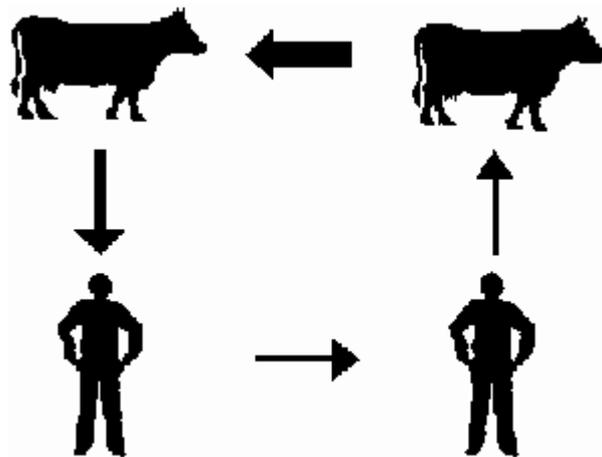


Ilustración 2. Ciclo de transmisión de *Mycobacterium bovis* entre bovinos y humanos.

2.2.4.1. ¿Cómo se infectan las personas con *M. bovis*?

Generalmente, las personas se infectan con *M. bovis* al comer o beber productos lácteos contaminados no pasteurizados. El proceso de pasteurización — que destruye los organismos en la leche que causan enfermedades, al calentarla y enfriarla rápidamente — elimina la *M. bovis* de los productos lácteos. La infección también se puede producir a través del contacto directo con una herida, lo que podría ocurrir durante la matanza o cacería, o al inhalar la bacteria exhalada al aire por animales infectados con *M. bovis*. Se considera que la transmisión directa de los animales a los seres humanos a través del aire es rara, pero la *M. bovis* se puede propagar directamente de persona a persona cuando la gente que tiene la enfermedad en sus pulmones tose o estornuda (11).

2.2.4.2. ¿Cómo puedo saber si he sido infectado con *M. bovis*?

La mayoría de las personas tienen un riesgo muy bajo de infectarse con *M. bovis*. Entre las que tienen un riesgo más alto se encuentran aquellas que trabajan con ganado vacuno, búfalos o ciervos (p. ej., venados o alces), o productos de estos animales, como pieles o cueros, leche o carne. Ejemplos de ocupaciones o pasatiempos que pueden poner en mayor riesgo a las personas son la ganadería, la producción láctea, trabajar en un matadero o como carnicero y la cacería. Las personas que beben leche cruda (no pasteurizada) o que consumen productos lácteos hechos con leche cruda también están en mayor riesgo. Las personas que puedan estar en mayor riesgo de infección por *M. bovis* deben hablar con sus proveedores de atención médica acerca de si deberían hacerse pruebas de detección de la infección de

tuberculosis de manera habitual. Estas pruebas de detección incluyen la prueba cutánea de la tuberculina (TST, por sus siglas en inglés) y el ensayo de liberación de interferón gamma (análisis de sangre) (11).

2.2.5. Síntomas

No todas las infecciones por *M. bovis* evolucionan a la enfermedad de tuberculosis, por lo que puede que no se presente ningún síntoma. En las personas, los síntomas de la enfermedad de tuberculosis causada por *M. bovis* son similares a los de la tuberculosis provocada por *M. tuberculosis*; pueden incluir fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso. También se pueden presentar otros síntomas dependiendo de la parte del cuerpo afectada por la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad en los pulmones se puede asociar con una tos y la enfermedad gastrointestinal puede causar dolor abdominal y diarrea. Si no recibe tratamiento, la persona puede morir a causa de la enfermedad (11).

Los síntomas de la enfermedad de tuberculosis dependen del área del cuerpo donde se estén multiplicando las bacterias de la tuberculosis. Por lo general, las bacterias de la tuberculosis se multiplican en los pulmones (tuberculosis pulmonar). La enfermedad de tuberculosis en los pulmones puede causar síntomas como los siguientes:

- Tos intensa que dura 3 semanas o más.
- Dolor en el pecho.
- Tos con sangre o esputo (flema que sale desde el fondo de los pulmones).

Otros síntomas de la enfermedad de tuberculosis son:

- Debilidad o fatiga.
- Pérdida de peso.
- Falta de apetito.
- Escalofríos.
- Fiebre.

- Sudores nocturnos.

Los síntomas de la enfermedad de tuberculosis en otras partes del cuerpo dependen del área afectada.

Las personas que tienen infección de tuberculosis latente no se sienten mal, no presentan síntomas ni pueden transmitirles la tuberculosis a los demás (18).

2.2.6. Patogenia

Factores de manejo, edad y nutrición son determinantes en la vía de infección, así como en el periodo de incubación, proceso de la enfermedad y diseminación. A partir de su entrada al organismo, los bacilos se localizan en el complejo primario de los ganglios linfáticos regionales, luego se diseminan por vía linfática a la cadena ganglionar. Posteriormente la diseminación se da por vía hematogena a órganos parenquimatosos y, por último, el microorganismo es eliminado en exudados y secreciones de órganos infectados. La eliminación del *M. bovis* por parte de los animales infectados es intermitente y no está en relación con el grado de infección presente. Se ha comprobado que los animales infectados recientemente eliminan al microorganismo en las etapas tempranas de la enfermedad cuando a veces no son detectadas por pruebas diagnósticas (17).

2.2.7. Diagnóstico

El diagnóstico de la tuberculosis en hatos primo-infectados se hace por la caracterización macro y microscópica de las lesiones en animales muertos en la finca o remitidos al matadero, seguido del aislamiento y tipificación en el laboratorio. En las áreas endémicas el diagnóstico se hace antes de que muera el animal por dermorreacción, además debe hacerse vigilancia en los mataderos y hacer evaluación macro y microscópica de las lesiones compatibles con tuberculosis (17).

2.2.8. Lesiones

2.2.8.1. Macroscópicas:

Las lesiones pueden variar, dependiendo de la localización anatómica y de la forma de diseminación.

- a) Generalmente el hallazgo pulmonar son áreas de gran tamaño con apariencia caseificada y zonas de mineralización.
- b) En las superficies serosas, incluyendo las cápsulas de los órganos, se observan nódulos firmes de superficie lisa, varían de 2 a 10 cm de diámetro. También pueden presentarse zonas caseificadas en las áreas profundas (tuberculosis perlada).
- c) Nódulos firmes de aspecto granulomatoso con áreas de calcificación y caseificación en ganglios linfáticos y órganos parenquimatosos como el hígado y el riñón.
- d) Exudado de apariencia purulenta en meninges.
- e) Focos muy pequeños, menores de 1 cm de diámetro, en cualquier órgano (tuberculosis miliar) (17).

2.2.8.2. Microscópicas

En cualquiera de las formas en que se presenta la tuberculosis, ésta se caracteriza por la formación de granulomas. Se pueden detectar bacilos ácido-alcohol resistentes libres en el citoplasma de los macrófagos, histiocitos y células gigantes de la lesión granulomatosa (17).

2.2.9. Tratamiento

La *M. bovis* se trata de manera similar a la *M. tuberculosis*. De hecho, es posible que los proveedores de atención médica no sepan que una persona tiene *M. bovis* en vez de *M. tuberculosis*. En general, la *M. bovis* es resistente a la pirazinamida, uno de los antibióticos que se usan comúnmente para tratar la enfermedad de tuberculosis. Sin embargo, por lo general, la resistencia a la pirazinamida solamente no causa problemas con el tratamiento

porque la enfermedad de tuberculosis se trata con una combinación de varios antibióticos. La infección latente sin enfermedad no se trata con pirazinamida (11).

2.2.10. Prevención

La fuente más comúnmente reportada de la infección por *M. bovis* en las personas es el consumo de productos lácteos no pasteurizados. Los productos lácteos sin pasteurizar, como la leche y el queso, no se deberían consumir. Aunque la infección por *M. bovis* en el ganado vacuno dentro de los Estados Unidos es considerablemente menor a la que había en el pasado, el consumo de productos lácteos no pasteurizados todavía conlleva riesgos para la salud. Para asegurarse de que los productos lácteos sean pasteurizados, se debe revisar las etiquetas y las listas de ingredientes, y cerciorarse de que en ellas aparezca la palabra “pasteurizado”. Se debe tener cuidado cuando se compre productos lácteos de producción casera, tales como quesos o productos que se venden sin etiquetas con el listado completo de ingredientes.

Las personas que están en riesgo de que una herida entre en contacto con fluidos corporales o tejidos de un búfalo o ciervo salvajes (p. ej., un venado o un alce), como los cazadores, deben buscar atención médica de inmediato e informar a sus proveedores de cuidados de la salud acerca de la exposición a un animal salvaje que podría tener la *M. bovis*. Las personas que pasan largos periodos en contacto cercano con ganado o con otros animales que podrían tener la *M. bovis*, como los trabajadores de una granja productora de leche, deben buscar atención médica de inmediato si presentan cualquier afección con síntomas de la enfermedad de tuberculosis como los descritos anteriormente, y asegurarse de que sus proveedores de cuidados de la salud sepan que trabajan en contacto cercano con animales (11).

2.2.11. Epidemiología

La epidemiología tiene entre uno de sus objetivos primordiales el estudio de la distribución y los determinantes de las diferentes enfermedades. La cuantificación y la medida de la enfermedad o de otras variables de interés son elementos fundamentales para formular y testar hipótesis, así como para permitir comparar las frecuencias de enfermedad entre

diferentes poblaciones o entre personas con o sin una exposición o característica dentro de una población determinada (20).

La prevalencia obtenida en los hatos ganaderos de la parroquia Santa Martha de Cuba conformada por 7 socios y 23 proveedores con un total de 368 animales muestreados es de $p = 0,54 \%$, comparada con un estudio realizado por Quinotoa B & Chicaiza M, que determina una prevalencia en Carchi de 0,37%, los resultados no estiman mayor significancia entre los dos porcentajes, aunque el segundo dato puede ser menor ya que se realizó con el método cervical simple de mayor sensibilidad, pero menor especificidad (21).

2.2.12. Técnica LAMP

La técnica LAMP, al igual que la PCR, tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN (secuencia diana), lo que permite la detección altamente sensible de patógenos. La reacción LAMP es isotérmica, es decir, toma lugar a una sola temperatura, lo que constituye una importante ventaja por sobre la PCR convencional. LAMP utiliza una enzima polimerasa de ADN cuya propiedad es la del desplazamiento de la cadena de ADN junto con su propiedad habitual de polimerización. El nivel de sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP es superior en contraste con las pruebas de PCR. Adicionalmente, LAMP amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez. La amplificación por medio de LAMP también puede ser cuantitativa y depende del desplazamiento de la cadena por autociclado, realizado por la ADN polimerasa (22).

Este método se basa en la síntesis de ADN de desplazamiento de hebra de autociclo que se realiza mediante una ADN polimerasa con alta actividad de desplazamiento de hebra y un conjunto de dos cebadores internos y externos diseñados especialmente. En los pasos iniciales de la reacción LAMP, se usan los cuatro cebadores, pero más tarde, durante la reacción de ciclo, solo se usan los cebadores internos para la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena. Los cebadores internos se denominan cebador interno hacia adelante (FIP) y cebador interno hacia atrás (BIP), respectivamente, y cada uno contiene dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido y antisentido del ADN objetivo, una para cebar en la primera etapa y otro para autocebado en etapas posteriores.

Para facilitar la explicación, las secuencias (normalmente de 23 a 24 nt) dentro de ambos extremos de la región objetivo para la amplificación en un ADN se designan como F2c y B2,1). Dos secuencias internas (típicamente 23-24 nt) 40 nt de los extremos de F2c y B2 se designan como F1c y B1, y dos secuencias (17–21 nt) fuera de los extremos de F2c y B2 se designan como F3c y B3. Dada esta estructura, las secuencias de FIP y BIP se diseñaron de la siguiente manera. FIP contiene F1c, un espaciador TTTT y la secuencia (F2) complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia (B1c) complementaria de B1, un espaciador TTTT y B2. Los dos cebadores externos consisten en B3 y la secuencia (F3) complementaria a F3c, respectivamente. Una muestra de ADN que contiene la secuencia objetivo y los cuatro cebadores se desnatura por calor y se enfría rápidamente en hielo. La reacción LAMP se inicia luego mediante la adición del fragmento grande de ADN polimerasa Bst y se lleva a cabo a 65 ° C durante 1 h (23).

El uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias distintas) en los pasos iniciales de LAMP y dos cebadores (reconocimiento de cuatro secuencias distintas) durante los pasos subsiguientes asegura una alta especificidad para la amplificación del objetivo. Además, en LAMP, cuatro cebadores (seis secuencias de reconocimiento distintas) se usan simultáneamente para iniciar la síntesis de ADN a partir del ADN original no amplificado para generar un ADN de tallo-bucle para el posterior ciclo de LAMP, durante el cual el objetivo es reconocido por cuatro secuencias. Por lo tanto, se espera que la selectividad del objetivo sea mayor que la obtenida en PCR y SDA (23).

La efectividad de LAMP se basa en el diseño de primers o cebadores que deben ser muy específicos. A diferencia de la PCR, LAMP requiere de entre 4 y 6 primers, los primers externos F3 y B3, que hibridan con las regiones externas de la secuencia diana, mientras que los internos FIP y BIP poseen secuencias en ambos sentidos que permiten la formación de un bucle. Los primers se diseñan de manera que puedan reconocer 8 regiones diana que permiten dar especificidad al método. El uso de una enzima termoestable hace de LAMP una técnica amigable que encaja en los parámetros de ser un método completo y eficaz. Las enzimas con capacidad recomendada son Bst polimerasa aislada de *Bacillus stearothermophilus* y Bsm polimerasa aislada de *Bacillus smithii* cuya actividad enzimática es de 66°C y 63°C respectivamente. Estas enzimas tienen actividad similar a la helicasa por

lo que es capaz de abrir la cadena de ADN a una temperatura óptima entre 60 y 65°C, desnaturalizándose a temperaturas por encima de 70°C. Estas características hacen que sea útil en la amplificación isotérmica ya que no requieren el paso de 90°C requerido para desnaturalizar el ADN como el caso de la PCR convencional (22).

2.2.13. Propiedades de LAMP

Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) 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. 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 (24).

2.2.14. Cebadores

Para llevar a cabo la reacción de LAMP se necesitan un número de 4 hasta 6 cebadores; 2 cebadores externos F3 y B3, 2 cebadores internos FIP (F1C, F2) y BIP (B1C, B2) que tienen secuencias tanto sentido y antisentido de tal manera que ayuda en la formación de un bucle, 2 cebadores bucle F(FLP) y B(BLP) diseñados para acelerar la reacción de amplificación mediante la Unión adicional a sitios que no son accesibles por los cebadores internos. Reconociendo un total de 8 secuencias distintas del DNA blanco todos estos cebadores son los que le dan la especificidad al método.

Los cebadores internos se denominan Forward Inner Primer (FIP) y Bac-kward Inner Primer (BIP), respectivamente, y cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores. Las secuencias (23-24 nucleótidos típicamente) dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación en un ADN son

denominadas F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas (23-24 nucleótidos típicamente) a 40 nucleótidos de los extremos de F2c y B2 son designadas F1c y B1 y dos secuencias (17-21 nucleótidos) externas a los extremos de F2c y B2 son denominadas F3c y B3. Las secuencias de FIP y BIP son diseñadas así: FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia B1c complementaria a B1, un espaciador de TTTT y a B2. Los dos cebadores externos consisten en B3 y la secuencia F3 complementaria a F3c.

El contenido de GC de los cebadores debe ser aproximadamente del 50-60% y alrededor de 40-50 % para AT. Los cebadores deben ser diseñados de manera que no se forme fácilmente estructuras secundarias. La secuencia del extremo 3' no debe ser rica en AT o complementarias de otros cebadores. La distancia entre el extremo 5' de F2 y B2 debería ser 120 - 180pb, y la distancia entre F2 y F3, así como de B2 y B3 debe ser 0-20pb. La distancia para las regiones de formación de bucle (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) debe ser 40-60pb (24).

2.2.15. Amplificación

Se lleva a cabo en dos pasos: no cíclico y cíclicos.

NO CÍCLICO .- Los cebadores inician su acción en dirección 5'->3', el primer cebador en interactuar con el DNA blanco es el FIP el cual se une a su región complementaria F2c y así comienza a sintetizar la hebra complementaria del DNA blanco, el siguiente cebador en interactuar es el F3 uniéndose a la región F3c complementaria del DNA blanco, la Bst polimerasa tiene una cualidad, esta actúa también como helicasa lo que ocasiona que la doble hebra se abra y la F3 pueda seguir con su camino; por el otro extremo tanto BIP como B3 siguen los mismos pasos, la hebra complementaria simple cadena hace que por complementariedad sus extremos formen un Loop o bucle esta hebra es la que servirá como secuencia madre para la posterior síntesis de DNA (24).

CICLIZACIÓN. - En la secuencia madre, interactúan nuevamente el cebador FIP donde la región F2 se une a su región F2c de la hebra complementaria realizando la hibridación, así como también por el otro extremo BIP donde la región B2 se une a su región B2c de la hebra complementaria, en el transcurso de la polimerización las secuencias sintetizadas van adquiriendo una forma de coliflor (24).

2.2.16. Amplificación de RNA

Se lleva a cabo mediante Transcripción Inversa (RT -LAMP) donde además de los reactivos de DNA para la amplificación (cebadores, ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra, sustratos, etc.) se añade transcriptasa inversa. La detección se puede llevar a cabo en un solo paso.

2.2.17. Bst polimerasa

LAMP utiliza Bst polimerasa con temperaturas óptimas oscilan entre 60-65°C y se inactiva a 80°C. Aunque la temperatura de almacenamiento recomendada es - 20°C, la Bst polimerasa es relativamente estable fuera de la cadena de frío durante más de 14 días (24).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La recolección de muestras biológicas de ganglios y biopsia pulmonar se llevó a cabo en el camal municipal del cantón Valencia, ubicado vía al río San Pablo, a unos minutos de la Urbe. En el laboratorio de biología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Campus "Ingeniero Manuel Agustín Haz Álvarez", ubicada en la Av. Quito km. 1 1/2 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Quevedo, se llevó a cabo el almacenamiento y extracción de ADN de las muestras. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de rumiología en la Finca Experimental "La María", de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el km 7 de la Vía Quevedo–El Empalme. Recinto San Felipe, cantón Mocache, provincia de Los Ríos.

3.2. Tipo de investigación

Investigación de campo. Se tomaron muestras de nódulos pulmonares en el camal municipal del cantón Valencia, para así posteriormente analizar las muestras en el laboratorio.

3.3. Métodos de investigación

Se empleó el método de observación; en el camal municipal del cantón Valencia se tomó muestras de nódulos pulmonares de animales que probablemente estén infectados, posteriormente a ello se realizó un análisis de laboratorio para la detección de *Mycobacterium bovis*.

3.4. Fuentes de recopilación de información

Se obtuvo información a través de fuentes primarias como análisis de datos, análisis de laboratorio y recolección de muestras; e información de fuentes secundarias tales como libros, revistas, artículos científicos, tesis de ingeniería, entre otros.

3.5. Instrumentos de la investigación

3.5.1. Variables estudiadas

- Raza
- Peso
- Sexo
- Edad
- Procedencia

3.5.2. Descripción del proceso

3.5.2.1. Tamaño de la muestra

Para calcular el tamaño de la muestra, es decir el número de animales a muestrear durante las ocho semanas del estudio, dado a que la población es finita (40 animales por semana) se empleó la siguiente formula:

$$n = \frac{Nz^2pq}{d^2(N - 1) + Z^2pq}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra.

p = proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia.

q = proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio.

d = error experimental

La suma de la p y la q siempre debe dar 1. Por ejemplo, si p= 0.8 q= 0.2

N = tamaño de la población (40)

z = llamado también nivel de confianza. (25)

$$n = \frac{40 * 2,72 * 0,50 * 0,50}{0,01 (40 - 1) + 2,72 * 0,50 * 0,50} = 25,4$$

$$N = 40$$

$$p = 0,50$$

$$q = 0,50$$

$$z = 2,72$$

$$d = 0,01$$

$$n = 25$$

Una vez aplicada la formula, se obtuvo un total de 25 animales por semana, dando un total de 200 animales durante las 8 semanas que duró la presente toma de muestras.

3.5.2.2. Toma de muestras

Se tomaron un total de 200 muestras de ganglios y pulmón en un periodo de ocho semanas, para la obtención de la muestra se procedió a la identificación del animal a muestrear, posteriormente se localizó el pulmón, se tomó una pequeña porción de este y se lo depositó en un frasco, de la misma manera, se identificó el ganglio ubicado en el pulmón y de acuerdo al tamaño del mismo, se tomó una porción o todo, ya que se encontraron ganglios de medidas de 1 a 10 centímetros; una vez obtenida la muestra, se deposita en el mismo frasco en el que fue depositada la muestra de pulmón del animal, luego de esto, se rotulan las muestras y se guardan momentáneamente en una hielera con pilas, para mantenerlas frescas durante el transporte, y luego ser almacenadas en el laboratorio de biología molecular de La Universidad Técnica Estatal De Quevedo a una temperatura de -20°C.

3.5.2.3. Preparación de la muestra

Para el procesamiento se procedió a descongelar la muestra durante unos minutos, luego se le separó la grasa y cualquier tipo de impureza presente, se tomó la parte más limpia y libre de grasa, se la depositó en un mortero previamente refrigerado a -20 °C, ubicado sobre una pila a la misma temperatura y se la picó en porciones muy diminutas, se le agregó nitrógeno líquido para posteriormente macerar la muestra con un pistilo, una vez obtenida la muestra

macerada, se trasvasó aproximadamente 100 microgramos de muestra en un microtubo de 1,5 ml previamente esterilizado.

3.5.2.4. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó aproximadamente 100 microgramos de muestra de tejido macerada, y se procedió con el siguiente protocolo:

3.5.2.4.1. Protocolo de TENS

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 ul de proteinaza K (20mg/ml).
2. Incubar a 56 °C por una hora.
3. Agregar un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1). Homogenizar para formar una emulsión.
4. Centrifugar 10000 rpm por diez minutos.
5. Transferir la parte superior “acuosa” a un nuevo tubo.
6. Agregar dos volúmenes de Etanol 95% helado. Homogenizar para ayudar a la precipitación del ADN.
7. Centrifugar a 10000 rpm por cinco minutos.
8. Descartar Etanol 95% y resuspender con Etanol al 70%.
9. Centrifugar a 10000 rpm por cinco minutos.
10. Descartar Etanol 70% y dejar secar.

11. Resuspender con 50 μ l de TE.

3.5.2.4.2. Verificación de presencia de ADN

Se realizó mediante el gel de agarose al 0,5%,

Gel de Agarosa al 0,5%

Materiales

- TAE 1X.
- Agarosa en polvo.
- Bromuro de etidio.
- Azul de metileno.
- ADN.
- Matraz.
- Balanza.
- Cubeta.
- Peine de 13 compartimentos.
- Agitador calentador.
- Foto documentador o Transiluminador.

Procedimiento

- Medir en un matraz 50 ml de TAE 1X.
- Agregar al TAE 1X 0,60 g de agarosa en polvo.
- Fundir la mezcla a 400 °C durante 20 aproximadamente.
- Llevar a la cámara de flujo y agregar 3 μ l de bromuro de etidio y agitar.
- Colocar el peine en la cubeta y verter la mezcla.
- Dejar enfriar durante 15 minutos aproximadamente.

- Luego, retirar el peine del gel y colocarlo en la cámara de electroforesis.
- Mezcla * μl de azul con * μl de ADN y colocarlo en la celda.
- Migrar a 90 voltios durante 15 minutos.
- Retirar la cubeta y colocar en el foto documentador o Transiluminador para ver el resultado (Ilustración 3).

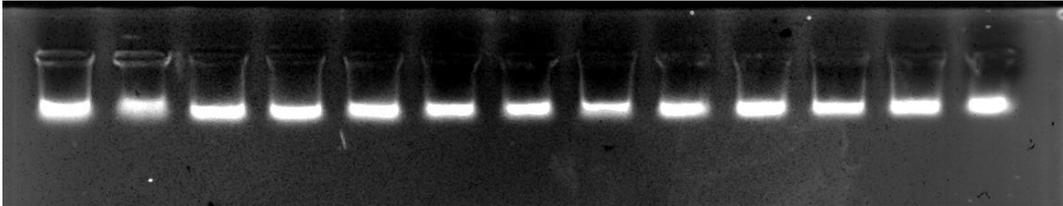


Ilustración 3 Gel de agarosa de las muestras de la 1 a la 13 de la semana 1.

3.5.2.5. Técnica de LAMP

El análisis de laboratorio de las muestras se lo realizó mediante la técnica de LAMP.

Ampliaciones isotermales como LAMP, Loop-LAMP, RT-LAMP

Preparación del mix (mezcla) para la LAMP:

Es importante considerar en la preparación del mix el número de muestras que se van a analizar, 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 aumentó un tubo de reacción en los cálculos de los reactivos que constituyen el mix.

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

Preparación del LAMPmix.

	Para 1 tubo de reacción
Agua ultrapura	4,5 uL
Primer - FIP (20pmol/uL)	2,0 uL
Primer - BIP (20pmol/uL)	2,0 uL
Primer - F3 (5pmol/uL)	1,0 uL
Primer - B3 (5pmol/uL)	1,0 uL
Reactivo R1 (dNTPs 10 mM)	3,5 uL
Reactivo R2 (Buffer 10X Bst)	2,5 uL
Reactivo R3 (MgSo4 100 mM)	1,5 uL
Reactivo R4 (Betaina 5 M)	4,0 uL
Bst DNA Pol (8000 U/mL)	1,0 uL
Volumen final	23 uL

Ilustración 4 Preparación del LAMPmix.

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

Programación de la reacción.

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



Ilustración 5 Aplicación de LAMP

Análisis de resultados en el gel de electroforesis.

1-Preparación del gel

- Preparar gel al 2% de agarosa.
- Dejar entibiar y colocar BET a una concentración fenal de 0,5 ug/ml de gel. La solución madre se encuentra a 10 mg/mL.

2-Deposito de las muestras.

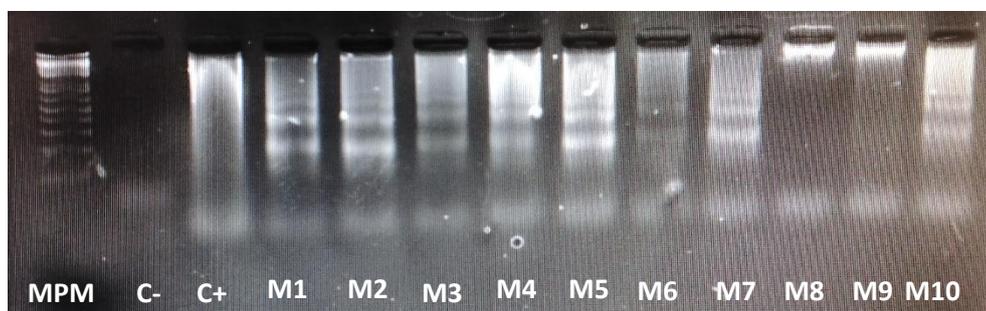
- Tomar 10 ul del producto de la LAMP y mezclar con 2 ul de tampón de depósito.
- Depositar un producto por cada pozo.
- Anotar el orden de las muestras en el cuaderno de trabajo.

3-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.)

4-Lectura de los resultados.

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



Pozo 1 MPM, pozo 2 - control negativo (C-), pozo 3 - control positivo (C+), pozos del 4 al 13, muestras del 1 al 10 de la semana 1 (M1 – M10)

Ilustración 6. Gel de agarosa observado a través de la foto documentador.

3.5.2.6. Prevalencia

La prevalencia (P) cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado. (20)

Para realizar el cálculo de la prevalencia, se utilizó la siguiente formula:

Ecuación 1 *Formula de la prevalencia.*

$$P = \frac{\text{Nº de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de población de la muestra}}$$

Fuente: (20)

Procedimiento:

- Portadores de tuberculosis 123.
- Total de la población 200.

$$P = \frac{123}{200} = 0,615$$

3.6. Tratamiento de los datos

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

3.7. Recursos humanos y materiales

3.7.1. Humanos

La presente investigación se llevó a cabo con la orientación metodológica del Dra. Diana Lucia Vasco Mora, directora del proyecto de investigación, y, como autora del proyecto de investigación Rosa Gabriela Bermeo Quiroz.

3.7.2. Materiales

3.7.2.1. Materiales de campo

- Caja térmica
- Alcohol
- Guantes
- Mandil
- Mascarilla
- Botas de caucho
- Pinzas
- Pilas

3.7.2.2. Equipos de laboratorio

- Balanza
- Baño maría
- Transiluminador uv
- Microcentrífuga
- Bordex
- Tensiómetro
- Cámara de electroforesis
- Refrigeradora

3.7.2.3. Materiales de laboratorio

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

- Puntas azules
- Micropipetas

3.7.2.4. Reactivos

- Caja térmica
- Tris
- HCl
- Lta
- Cloruro de sodio
- Sds
- Cloroformo alcohol isoamil
- Alcohol 95%
- Alcohol 70%

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Análisis estadístico

Una vez ejecutada la técnica de LAMP se logró evidenciar que, de los 200 animales muestreados, un total de 123 resultaron positivos a tuberculosis, representando el 61,5% del total, en comparación a los resultados reportados por Ramos (12) en la parte baja de la provincia de El Oro, donde el 100% de los animales resultaron negativos, Tabla 1.

Tabla 1. *Resultados de análisis de laboratorio.*

Semana	N.º de muestras	Positivos	Porcentaje	Negativos	Porcentaje
1	25	19	76	6	24
2	25	14	56	11	44
3	25	19	76	6	24
4	25	11	44	14	56
5	25	19	76	6	24
6	25	21	84	4	16
7	25	9	36	16	64
8	25	11	44	14	56
Total	200	123	61,5	77	38,5

Según los datos obtenidos, se pudo notar que, la raza más afectada fue la Holstein, ya que representa el 58,5% del total de animales infectados, a continuación, le sigue la raza Brahman con un 24,4% y en menores proporciones las razas Brown Swiss y Nelore, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. *Razas de animales portadores de tuberculosis.*

Raza	Cantidad	Porcentaje
Holstein	72	58,5
Brahman	30	24,4
Brown swiss	16	13
Nelore	5	4,1
TOTAL	123	100

En la Tabla 3 se observa que el 78,9% de los animales portadores de tuberculosis son hembras, con lo que se deduce que los animales más propensos a adquirir dicha enfermedad, son las hembras, resultados que difieren con los reportados por Cushicóndor (13) quien, al

analizar los factores como el sexo en relación a la positividad, en su trabajo realizado en el matadero del cantón Pichincha no encontró ninguna asociación significativa.

Tabla 3. *Sexo de animales portadores de tuberculosis.*

Sexo	Cantidad	Porcentaje
Hembra	97	78,9
Macho	26	21,1
TOTAL	123	100

Referente a las edades, se puede apreciar en la Tabla 4 que, de los animales portadores de tuberculosis el 71,6% corresponde a animales adultos de 6 a 8 años, el 21,1% animales de 4 a 5 años y el 7,3% de animales de 2 a 3 años; datos con los cuales observamos, que la mayor cantidad de animales portadores de tuberculosis son animales adultos, datos similares se indican en un trabajo realizado por Quinatoa y Chicaiza (14), que al igual de los datos obtenidos en esta investigación, mostró que la edad aumenta el riesgo de la enfermedad en animales adultos.

Tabla 4 *Edades de animales portadores de tuberculosis.*

Edad (años)	Cantidad	Porcentaje
2-3	9	7,3
4-5	26	21,1
6-8	88	71,6
Total	123	100

En la Tabla 5 se observa que, de los animales portadores de tuberculosis, el 53,6% son procedentes del cantón La Maná, seguido por Valencia con un 17,9%, el 13,8% del cantón Pucayacu, el 5,7 y 2,4% corresponden a La Unión y Quevedo respectivamente.

Tabla 5 *Procedencia de animales portadores de tuberculosis.*

Procedencia	Cantidad	Porcentaje
La Maná	66	53,6
Valencia	22	17,9
Pujilí	17	13,8
Pucayacu	8	6,6
La Unión	7	5,7
Quevedo	3	2,4
Total	123	100

4.2. Prevalencia de la enfermedad

Al aplicar la fórmula propuesta por Pita et al, Pértegas, Valdés (20) a los datos obtenidos de las 200 muestras tomadas durante un periodo de 8 semanas consecutivas, se determinó que la prevalencia epidemiológica de la tuberculosis bovina en el camal municipal del cantón Valencia fue del 0,615% como se muestra en la Tabla 10, comparada a un estudio realizado por Paillacho (21) que determinó que la prevalencia de la dicha enfermedad en el cantón Tulcán fue del 0,54%, utilizando el método de prueba de tuberculinización Cervical Comparativa, obtuvo resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

Tabla 6 *Prevalencia de la enfermedad.*

Animales muestreados	Animales positivos	Prevalencia
200	123	0,615

4.3. Análisis económico

Una vez analizados los valores de la presente investigación, se determinó un costo por muestra de \$ 3.90, para obtener dicho valor se tomó en cuenta varios puntos como se muestra en la Tabla 11; se determinó un costo total de \$ 780.00 por las 200 muestras analizadas.

Tabla 7 *Análisis económico por muestra*

Descripción	Costo por muestra
Materiales	0,43
Equipos	1,45
Extracción de ADN	0,19
Técnica Lamp	1,70
Gel de agarosa para comprobación de ADN	0,05
Gel de agarosa para comprobación de resultados de Lamp	0,08
Total	3,90

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye los siguiente:

- Al aplicar la técnica de LAMP para la detección de tuberculosis bovina en las 200 muestras tomadas, 123 animales resultaron portadores le dicha enfermedad durante el periodo de duración de la presente investigación (ocho semanas).
- Se determinó una prevalencia de 0,65% de tuberculosis bovina en el camal municipal del cantón Valencia.
- Se definió un costo por muestra de total \$ 3,90, y un costo total de \$ 780,00 por las 200 muestras analizadas

5.2. Recomendaciones

- ✓ Incrementar el control general a nivel de camales por parte de las autoridades pertinentes.

- ✓ Monitorear el uso de la indumentaria respectiva entre el personal que colabora dentro en dicha entidad.

- ✓ Inspeccionar las condiciones de los animales faenados en el camal municipal del cantón Valencia.

- ✓ Controlar el faenamiento de animales en estado de gestación.

CAPITULO VI
BIBILOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. CReSA Centre de Recerca en Sanidad Animal. [Online].; 2008 [cited 2018 mayo 2. Available from: http://www.cresa.es/granja/tuberculosis_efectos.php.
2. Pérez-Barragán EMTB. Tuberculosis por Mycobacterium bovis: ¿una infección reemergente? Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social [Internet]. 2017; 55(5)(635-640).
3. Animal OMdS. Organizacion Mundial de Sanidad Animal. [Online].; 2018 [cited 2018 Mayo 2. Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/Bovine-tuberculosis/>.
4. Chavarrias M. Fundacion EROSKI. [Online].; 2009 [cited 2018 Junio 2. Available from: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2009/04/15/184677.php>.
5. EE. DDSYSHD. Centro para el control y la prevencion de enfermedades. [Online].; 2016 [cited 2019 Marzo 23. Available from: <https://www.cdc.gov/tb/esp/>.
6. Rodríguez G. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Segunda ed. Uruguay : Oficina del libro FEFMUR ; 2006.
7. Rodríguez Buenfil JC, Martínez Maya JJ. Epidemiología veterinaria Morales Saavedra JL, editor. Mexico D.F.: El Manual Moderno; 2010.
8. Alejandra Moreno-Altamirano CMAA, López-Moreno S, Corcho-Berdugo A. Principales medidas en epidemiología. salud publica Mexico. 2000 Aug; 42(4).
9. Animal OMdS. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. [Online].; 2004 [cited 2018 junio 3. Available from: <https://www.oie.int/doc/ged/D6508.PDF>.
10. de Ward JH. Tuberculosis Bovina. In Ward JHd. Manual de Ganadería Doble Propósito.. Caracas ; 2005. p. 365-369.
11. National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention. [Online].; 2013 [cited 2018 6 24. Available from: https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/pdf/m-bovis_spanish_mcb.pdf.
12. Ramos Morales Ne. Determinación de prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de hatos ganaderos en la parte baja de la provincia del oro. Tesis de grado. Machala : universidad tecnica de machala , ramos morales nairobi elizabeth; 2017.
13. Cushicóndor Collaguazo DM. Prevalencia de tuberculosis bovina (tbb) mediante inspección post-mortem y cultivo bacteriológico en el matadero municipal del cantón mejía (pichincha). Tesis de grado. Quito: universidad central del ecuador, facultad de medicina veterinaria y zootecnia; 2014.
14. Quinatoa Basantes I, Chicaiza Maldonado d. Analisis de factores de riesgo y determinacion de tuberculosis bovina utilizando tecnicas bayesianas en las provincias de Cotopaxi, Carchi E Imbabura. Quito: Universidad Central Del Ecuador, facultad de medicina veterinaria y zootecnia; 2013.

15. Amasino CF. Enfermedades infecciosas de los animales y zoonosis. Primera ed. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata; 2017.
16. Tuberculosis bovina. [Online].; 2009 [cited 2018 junio 3. Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovine_tuberculosis-es.pdf.
17. Gonzalez K. ZOOTECNIA Y VETERIBARIA ES MI PASION. [Online].; 2017 [cited 2018 6 20. Available from: https://zoovetesmipasion.com/ganaderia/enfermedades-bovinas/tuberculosis-bovina/#que_es_la_tuberculosis_bovina.
18. Centros para el control y prevencion de enfermedades. Centros para el control y prevencion de enfermedades. [Online].; 2016 [cited 2018 6 24. Available from: <https://www.cdc.gov/tb/esp/default.htm>.
19. Rivera P. S, Francisco yGJ. La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. Revista electrónica de Veterinaria. 2010 Sep; 11(9).
20. Pita Fernández S, Pértegas Díaz S, Valdés Cañedo F. Fisterra. [Online].; 2004 [cited 2019 Marzo 24. Available from: https://www.fisterra.com/mbe/investiga/medidas_frecuencia/med_frec2.pdf.
21. Pillacho P. “prevalencia de tuberculosis bovina en la parroquia santa martha de cuba del cantòn tulcán”. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniero en desarrollo integral agropecuario. Tulcan: universidad politécnica estatal del carchi, escuela de desarrollo integral agropecuario; 2015.
22. Garrido Haro P. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. ECUADOR ES CALIDAD. 2016; 3.
23. Tsugunori Notomi HOHMTYKWNATH. Amplificación isotérmica del ADN mediada en bucle. Nucleic Acids Research. 2000 junio; 28(12).
24. Sánchez Edwin NM, Aguirre Pamela AMTNVR. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnostico clínico. Rev.Cs.Farm. y Bioq. 2014 Jun; 2.
25. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. Salud en Tabasco. 2005 enero - agosto ; 11(1-2).

CAPÍTULO VII
ANEXOS



Anexo 1 *Preparación y elaboración de materiales de trabajo de laboratorio.*



Anexo 2 *Preparación de reactivos.*



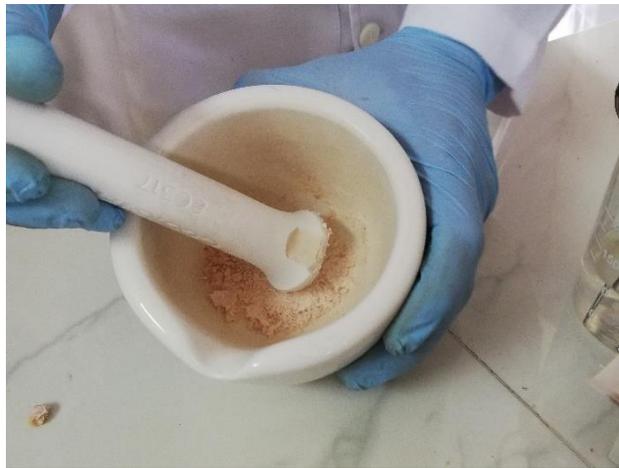
Anexo 3 Proceso de faenamiento.



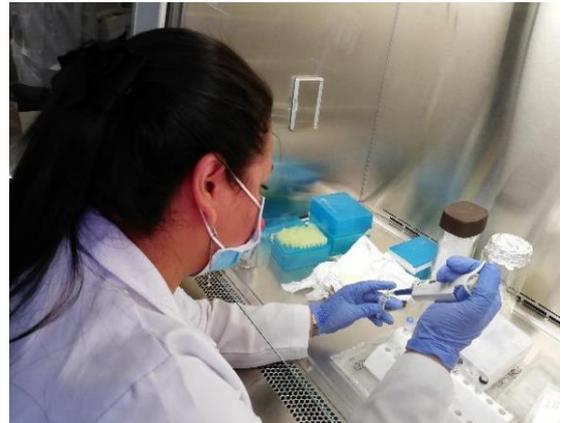
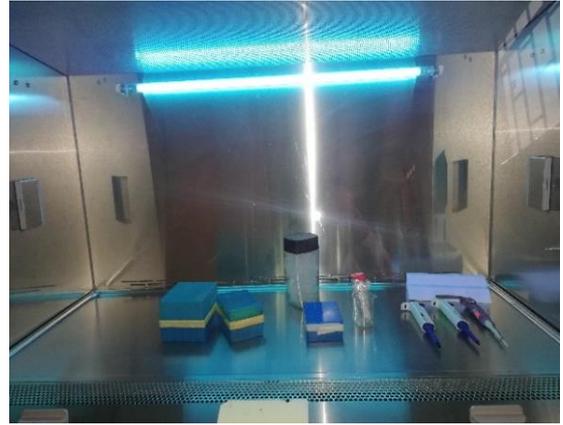
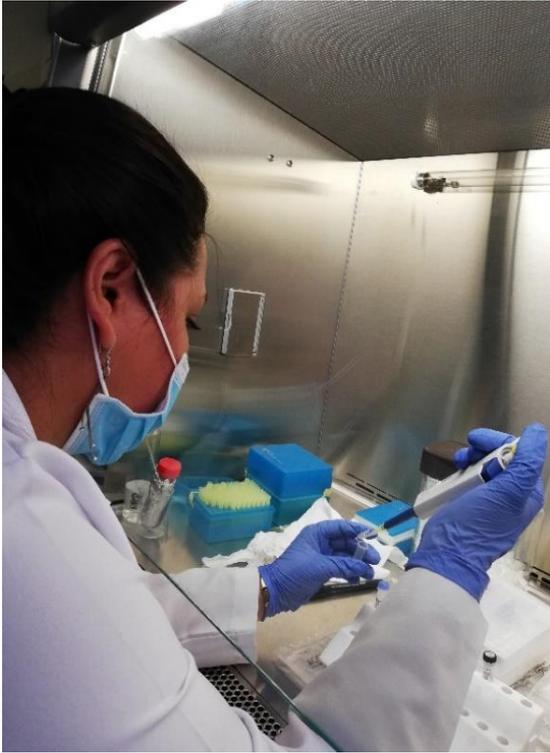
Anexo 4 Toma de muestra.



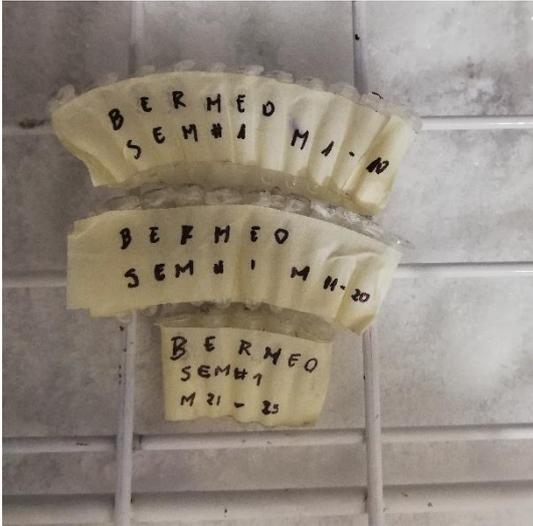
Anexo 5 Transporte y almacenamiento de muestras.



Anexo 6 *Preparación de la muestra.*



Anexo 7 *Preparación de la reacción LAMPmix.*



Anexo 8 *Aplicación de la técnica de LAMP.*

Tabla 8. *Razas de animales muestreados.*

Razas	Cantidad	Porcentaje
Holstein	105	52,5
Brahman	63	31,5
Brown swiss	22	11
Nelore	10	5
Total	200	100

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz

Tabla 9. *Sexo de animales muestreados.*

Sexo	Cantidad	Porcentaje
Hembra	137	68,5
Macho	63	31,5
TOTAL	200	100

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz**Tabla 10.** *Edades de animales muestreados.*

Edades	Cantidad	Porcentaje
2-3	53	26,5
4-5	53	26,5
6-8	94	47
Total	200	100

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz**Tabla 11.** *Edades de animales muestreados.*

Procedencia	Cantidad	Porcentaje
La Maná	79	39,5
Valencia	50	25
La Unión	19	9,5
Pujilí	19	9,5
Quevedo	14	7
El Vergel	10	5
Pucayacu	9	4,5
Total	200	100

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz**Tabla 12** *Costos de reactivos de gel de agarosa al 1%.*

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

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz

Tabla 13 *Costos de reactivos de gel de agarosa al 2%.*

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

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz**Tabla 14** *Costos de reactivos para técnica de LAMP.*

Descripción	Presentación	Valor	Valor (ul=	Cantidad (ul)	Subtotal
Proteinasa k	10 ml	300	0,03	7,00	0,21
Agua ultra pura	1lt	65	0,000065	25,50	0,002
Primer TB1R(20pmol/ul)	1000ul	40	0,04	2,00	0,08
Primer TB1F(20pmol/ul)	1000ul	40	0,04	2,00	0,08
Primer MB4(10pmol/ul)	1000ul	40	0,04	1,00	0,04
Primer MB5(10pmol/ul)	1000ul	40	0,04	1,00	0,04
Reactivo R1(dNTPs 10Mm)	1000ul	10	0,01	4,00	0,04
Reactivo R2(Buffer 10x Bst)	1000ul	12	0,012	5,00	0,06
Reactivo R3(mgso4 100 Mm)	1000ul	16	0,016	3,00	0,048
Reactivo R4(Betaina 5M)	1000ul	254	0,254	4,00	1,016
Bst DNA Pol (8000U/ml)	1000ul	180	0,18	0,50	0,09
Total					1,706

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz**Tabla 15** *Costos de materiales.*

Descripción	Valor/uL	Cantidad	Total
Microtubos 1,5ml	0,032	2	0,064
Puntas amarillas	0,01	3	0,03
Puntas PCR	0,03	5	0,15
Frasco m/orina	0,14	1	0,14
Puntas azules	0,01	5	0,05
Total			0,434

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz

Tabla 16 *Costos de reactivos para extracción de ADN.*

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

Elaboración: Rosa Bermeo Quiroz