



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES FAENADOS EN EL CAMAL
DEL CANTÓN PASAJE PROVINCIA DE EL ORO

CAPELO LOPEZ JORDY VINICIO
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES FAENADOS EN EL
CAMAL DEL CANTÓN PASAJE PROVINCIA DE EL ORO

CAPELO LOPEZ JORDY VINICIO
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO TITULACIÓN
PROYECTO TÉCNICO

TUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES FAENADOS EN EL CAMAL DEL
CANTÓN PASAJE PROVINCIA DE EL ORO

CAPELO LOPEZ JORDY VINICIO
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MAZA VALLE WUNSTER FAVIAN

MACHALA, 01 DE MAYO DE 2020

MACHALA
2020

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado TUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES FAENADOS EN EL CAMAL DEL CANTÓN PASAJE PROVINCIA DE EL ORO, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



MAZA VALLE WUNSTER FAVIAN
0701791741
TUTOR - ESPECIALISTA 1



VARGAS GONZALEZ OLIVERIO NAPOLEON
1101446894
ESPECIALISTA 2



AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN
0704217348
ESPECIALISTA 3

Machala, 01 de mayo de 2020

Tuberculosis bovina

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE
INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.unheval.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 35 words

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, CAPELO LOPEZ JORDY VINICIO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado TUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES FAENADOS EN EL CAMAL DEL CANTÓN PASAJE PROVINCIA DE EL ORO, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.


El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 01 de mayo de 2020



CAPELO LOPEZ JORDY VINICIO
0704291483

DEDICATORIA

A Dios por darme sabiduría y sobre todo salud para así permitir lograr mis objetivos. A mi madre Irlanda López que es mi pilar fundamental de apoyo durante todos estos años de estudio, a mi papá Vinicio que desde el cielo me guía, me cuida y me protege, quienes son mi motivación principal para seguirme preparando, así mismo a mis hermanos Dusstin y Naommy que me dieron su apoyo cuando necesitaba Y a las personas que siempre estuvieron a mi lado para seguir con mi carrera adelante.

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento al camal del cantón Pasaje, por permitirme ingresar a su instalación y recoger muestras para la debida realización del trabajo de tesis, así mismo al Instituto Nacional de Salud Pública e investigaciones (INSPI) que permitieron que realice las investigaciones y analices en sus instalaciones y a mis amigos que estuvieron en toda la realización de la tesis apoyándome para que este objetivo lo cumpla.

A mi tutor Dr Favián Maza Valle por su apoyo y motivación para terminar con el último requisito de mis estudios, que es la realización de la tesis.

UNIVERSIDAD TECNICA DE MACHALA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA EN
ANIMALES FAENADOS EN EL CAMAL DEL CANTÓN
PASAJE – PROVINCIA DE EL ORO.”**

Autor: Jordy Capelo López

Tutor: Favian Maza Valle

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa que afecta principalmente al ganado bovino y siendo una de las más preocupantes de las enfermedades por la zoonosis existente, que quiere decir que afecta al hombre, el agente etiológico de esta enfermedad es el *Mycobacterium Bovis* y una vez diagnosticada puede ocasionar pérdidas económicas serias para los productores, en los humanos se pueden contagiar mediante el consumo de carne infectada y de sus productos lácteos no pasteurizada, algunas zonas del país y el mundo la leche se la toma cruda y puede ser peligroso contagiarse de esta enfermedad ya que pueden venir los productos de animales portadores o que contengan esta bacteria, los animales se pueden contagiar mediante la vía principal que es la vía respiratoria por estar en el lugar con animales positivos a tuberculosis y esta enfermedad en su principio es asintomática y requiere de análisis complementarios para diagnosticarla. Esta investigación tiene como objetivo determinar la prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de camal en la provincia del El Oro del cantón Pasaje, a través de recolecciones de muestras de ganglios linfáticos de bovinos que iban hacer faenados, estas se recolectaban dos veces por semanas, por cuatro semanas, estas muestras se extrajeron de los linfonodos respiratorio y gastrointestinal que se observaban sospechosos o alterados en su forma o tamaño. Esto consistió en dos partes: campo y laboratorio, donde la primera

parte del trabajo consistió la observación y recolección de ganglios linfáticos, como: retrofaríngeos, cervicales, mediastínicos que presenten alterados tanto en tamaños como en forma y lesiones pulmonares en la inspección post mortem por un mes en el camal del cantón Pasaje que se realizó el día 7 de Noviembre hasta el día 29 de Noviembre del 2019 realizando la revisión de ganglios dos veces por semana observando un total de ocho días. La segunda parte consistió los análisis en el laboratorio donde se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública (INSPI) que estuvimos ubicados en el área de zoonosis, donde se realizó el respectivo cultivo de las muestras que se extrajeron de los bovinos sospechosos con tuberculosis, estos cultivos se los realizo en *Ogava kudoh* (OK) y Stonebrinks (ST), también se realizó la técnica de baciloscopia, donde previamente se realizó la tinción que de Ziehl- Neelsen (ZN) para visualizar los bacilos con claridad, para luego realizar la prueba molecular PCR- LAMP con los resultados positivos a bacilo alcohol ácido resistente (BAAR). La prevaecía que se encontró en las cuatros semanas del mes de noviembre del 2019 de 151 animales que llegaron los días Jueves y Viernes que fueron los días que más animales llegan al camal, macroscópicamente se extrajo 15 ganglios alterados teniendo un resultado de 9,93%, para luego realizar la técnica microscópica realizando las prueba de baciloscopia con tinción de ZN dando positivo a (BAAR) obteniendo un resultado de 26,67%, las razas que llegaron al camal y que se hicieron dichos análisis fueron todas mestizas y la edad de los animales que se recogió las muestras son bovinos de 4 años en adelante.

Palabras claves: Tuberculosis Bovina, Mycobacterium Bovis, Camal, Zoonosis, Animales Faenados, LAMP

“PREVALENCE OF BOVINE TUBERCULOSIS IN FAILED ANIMALS IN THE CAMAL DEL CANTÓN PASAJE - PROVINCE OF EL ORO.”

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an infectious and contagious disease that mainly affects cattle and is one of the most worrisome of existing zoonosis diseases, which means that it affects man, the etiologic agent of this disease is *Mycobacterium Bovis* and once diagnosed it can cause serious economic losses, both for animals and for producers, in humans they can be spread by eating infected meat and its unpasteurized dairy products, some areas of the country and the world the milk is taken raw and can It is dangerous to be infected with this disease since the products of animals carrying or containing this bacterium may come, the animals can be infected, by the main route that is the respiratory tract by staying with animals that are susceptible to tuberculosis and this disease is in principle Asymptomatic requires complementary analysis. This research aims to determine the prevalence of bovine tuberculosis at the road level in the El Oro province of the Passage canton, through samples collected from bovine lymph nodes that were to be slaughtered, these were collected twice a week, by Four weeks, these samples were extracted from the respiratory and gastrointestinal lymph nodes that were suspected or altered in shape or size. This consisted of two parts: field and laboratory, where the first part of the work consisted of the observation and collection of lymph nodes, such as: retropharyngeal, cervical, mediastinal that present altered in both size and shape and lung lesions in the post mortem inspection by One month in the Caña del Cantón Pasaje, which was held on November 7 until November 29, 2019, performing the ganglion review twice a week, observing a total of eight days. The second part consisted of the analysis in the laboratory where it was carried out at the National Institute of Public Health Research (INSPI) that we were located in the zoonosis area, where the respective culture of the samples that were extracted from the suspicious cattle with tuberculosis, these cultures were carried out in

Ogava kudoh (OK) and Stonebrinks (ST), the smear technique was also performed, where previously staining was performed by Ziehl-Neelsen (ZN) to visualize the bacilli clearly, and then Perform the PCR-LAMP molecular test with the positive results for Bacillus Resistant Acid Alcohol (BAAR). The prevailing one that was found in the four weeks of the month of November 2019 of 151 animals that arrived on Thursday and Friday that were the days that more animals reach the camal, 15 altered nodes were macroscopically extracted having a result of 9.93% , and then perform the microscopic technique by performing the smear test with ZN staining, giving a positive (BAAR) obtaining a result of 26.67%, the races that reached the camal and that were made said analyzes were all mestizo and the age of The animals that collected the samples are cattle 4 years and older.

Keywords: Mycobacterium Bovis Bovine Tuberculosis, Channel, Zoonosis, Faulated Animals, LAMP

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	5
INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE FIGURA.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. OBJETIVOS	15
1.1.1. OBJETIVO GENERAL.....	15
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1. GENERALIDADES.....	16
2.2. ETIOLOGÍA	17
2.3. MORFOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN.....	17
2.3.1. <i>Mycobacterium bovis (M.bovis)</i>	17
2.3.2. Crecimiento.....	17
2.3.3. Bacilo humano y el bovino	18
2.3.4. Animales susceptibles.....	18
2.4. PATOGENIA.....	18
2.5. EXCRECIÓN Y PERIODO DE INCUBACIÓN	19
2.6. TRANSMISIÓN	19
2.7. MANIFESTACIÓN CLINICA.....	21
2.8. PERDIDAS QUE OCASIONA ESTA ENFERMEDAD	22
2.9. SALUD PÚBLICA	22
2.10. POST MORTEM	23
2.11. DIAGNOSTICO.....	23
2.11.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	24

2.11.2.	DIAGNÓSTICO INDIRECTO.....	24
2.12.	REACCIÓN A LA CADENA POLIMERASA (PCR).....	27
2.13.	ERRADICACION PREVENCIÓN Y CONTROL	28
2.14.	TRATAMIENTO.....	28
2.15.	TUBERCULOSIS BOVINA EN DIFERENTES PAÍSES.....	29
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1.	MATERIALES.....	34
3.1.1.	Localización del área de estudio.....	34
3.1.1.1.	Límites.....	34
3.1.1.2.	Coordenadas geográficas.....	35
3.1.2.	Materiales.....	35
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	37
3.3.	METODOLOGÍA.....	37
3.3.1.	Técnica e instrumentos de investigación	37
3.3.2.	Población y muestras	38
3.3.3.	Diseño de la investigación	38
3.3.4.	Variables de estudio.....	38
3.3.5.	Metodología de trabajo	39
3.3.5.1.	Análisis y recolección de muestras.....	39
3.3.5.2.	Baciloscopia	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1.	DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFONÓDULOS ALTERADOS EN ANIMALES MUESTREADOS.....	48
4.2.	IDENTIFICACIÓN DE PRESENCIA DE BACILOS ALCOHOL-ÁCIDO RESISTENTE (BAAR), COMO CAUSA DE LAS LESIONES GANGLIONARES.....	49

4.3. DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA DE MYCOBACTERIUM BOVIS POR EL MÉTODO DE PCR-LAMP	51
4.4. ASOCIACION ESTADISTICA.....	51
4.4.1. Variable Raza.....	51
4.4.2. Variable Edad	52
4.4.3. Variable Sexo.....	54
5. CONCLUSIONES	57
6. RECOMENDACIONES	58
7. BIBLIOGRAFÍA	59
8. ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Población total de animales muestreados para evaluar la presencia de tuberculosis bovina en la provincia de Parinacochas	30
Tabla 2 Descripciones de lesiones y resultados de las diferentes pruebas para tuberculosis bovina.....	31
Tabla 3 Bovinos reactivos de los reactores del Cantón de Loja	32
Tabla 4 Aumento de grosor mm del sitio de inoculación en los bovinos ya sean positivos o sospechosos.....	32
Tabla 5. Proporción de población bovina inspeccionada según la presencia de alteraciones compatibles con Tuberculosis bovina.....	48
Tabla 6 Resultados de baciloscopia de colonias aisladas de los medios de cultivo Stonebrink y Ogawa kudoh.....	49
Tabla 7 Resultados obtenidos del aislamiento de colonias positivas en los medios de ..	51
Tabla 8 Presencia de tuberculosis bovina de acuerdo con la raza	51
Tabla 9 Presencia de tuberculosis bovina de acuerdo con la edad de los animales.....	53
Tabla 10 Presencia de tuberculosis bovina de acuerdo con el sexo del animal	54
Tabla 11 Presencia de tuberculosis bovina respecto al lugar de la procedencia.....	56

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 Ciclo de transmisión.....	21
Figura 2 Mycobacterium bovis por la técnica Ziehl/Neelsen	25
Figura 3 Cultivo Stonebrinks.....	26
Figura 4 Mapa cantón Pasaje	34
Figura 5 Porcentaje de baciloscopia de colonias aisladas de los medios de cultivo Stonebrink y Ogawa kudoh.....	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 4 Edad de los animales muestreados	53
Gráfico 6 Presencia de tuberculosis bovina respecto al lugar de la procedencia.....	55

1. INTRODUCCIÓN

El agente etiológico principal de la tuberculosis bovina es el *Mycobacterium bovis*, que es una enfermedad de grado crónico a nivel mundial por su transición fácil, esta patología es zoonótica que transmite al humano y puede llegar a afectar a cualquier órgano, y en ocasiones puede ser asintomática (1). Es una bacteria gran positiva que pertenece al género *Mycobacterium*, esta patología se caracteriza por presentar lesiones granulomas denominadas tubérculos que estas se pueden encontrar en diferentes órganos, la capacidad que tiene este microorganismo de infectar a diferentes animales es de muchos factores que tiene como característica la bacteria, ya sea con el huésped y las condiciones ambientales, el ingreso del microorganismo al individuo se da con más frecuencia por la vía oral o también llamado por la vía respiratoria, y su tiempo para lesionar al individuo es tardío con una incubación prolongada dependiendo de la virulencia del agente etiológico y su respuesta inmune del huésped (2).

Esta patología una vez comprobada que sea positiva en el rebaño conlleva fuertes pérdidas económicas y sociales para el hato ganadero por su disminución en la producción tanto como leche y carne, ya que con esta patología se prohíbe totalmente su comercialización y exportación del ganado y sus subproductos.

Existen investigaciones en el Ecuador de tuberculosis bovina que se realizaron pruebas diagnósticas in vivo que fue la prueba tuberculina simple o comparada, que ejecutaron estudiantes de diferentes universidades del país que pueden ser preocupante para la salud de las personas. Ya que tiene importancia económica en el país y más en las zonas rurales ya que se les ofrece leche, carne y sus derivados. Esta enfermedad cuando se presenta en los rebaños como es infectocontagiosa y los ganaderos ya tienen conocimiento sobre estas medidas como plan nacional, evitan hacer conocer a las autoridades correspondientes por el miedo de las pérdidas en la producción (3).

En nuestro país esta patología no es considerada obligatoria, se puede decir que es participativa para los ganaderos que quieren tener su rebaño o ganadería libre de enfermedad para obtener una certificación que puedan comercializar sus productos, pero como ya antes mencionado la falta de vigilancia o registros de esta enfermedad se desconoce la prevalencia real. En la actualidad hay un proyecto diseñado por Agrocalidad para diferentes enfermedades como son la tuberculosis y brucelosis, y con la ayuda del

sector privado elaboran programas, y prevenciones para combatir erradicar y controlar estas enfermedades que son de interés para la salud y economía del país.

Debido a la gran importancia que tiene esta patología se realizó esta investigación donde se puso como objetivo determinar la prevalencia de tuberculosis bovina en el camal del cantón Pasaje donde se realizó la observación y extracción de los linfonodos que estaban alterados tanto en forma y tamaño que se encontraban sospechosos a esta patología, para luego llevarlos hacer análisis en el instituto nacional en investigaciones y salud pública (INSPI) para realizar los medios de cultivo con *Stonebrinks* (ST) y *Ogawa Kudoh* (OK) para luego realizar la tinción de Ziehl Neelsen para posteriormente hacer la técnica de baciloscopia y observar presencia de BAAR para luego realizar la prueba de PCR-LAMP para su respectiva comprobación de la bacteria como es *Mycobacterium bovis*

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de tuberculosis bovina, mediante observaciones macroscópicas, microscópicas, cultivos especializados, análisis de PCR-LAMP de linfonódulos obtenidos de canales sospechosas a nivel de camal.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar la presencia de linfonódulos alterados de las cadenas ganglionares gastrointestinales y respiratorio compatibles con tuberculosis, mediante análisis patológico macroscópico.
- b. Identificar la presencia de *Mycobacterium bovis* como causa de las lesiones ganglionares mediante cultivo en tubos con medio de *Ogawa kudoh* y *Stonebrinks* y tinción para gérmenes ácido resistentes.
- c. Confirmar la presencia de *Mycobacterium bovis* mediante la técnica PCR-LAMP.
- d. Establecer el índice de prevalencia de tuberculosis bovina según: raza, sexo, edad y lugar de procedencia.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES

La tuberculosis bovina es una patología provocada por el microorganismo llamado *Mycobacterium Bovis* (2), esta enfermedad puede aparecer signos clínicos en meses o en años a un animal infectado, en ocasiones los animales que presentan esta enfermedad pueden tener un estado subclínico que supuestamente estén sanos, para el contagio existen tres vías donde la bacteria pueda ingresar, la vía principal de esta enfermedad es aerógena, esta contaminación se puede dar por medio de comederos, bebederos, hacimientos y sala de ordeño, la segunda vía de contaminación es la digestiva por consumo de alimentos y pastos contaminados, este medio de contaminación es de importancia para los terneros que aun estén amamantándose con leche provenientes de vacas contaminadas, se calcula que el 2% de vacas infectadas por tuberculosis eliminan la bacteria por la leche. Y la tercera vía de contaminación es la congénita se da mediante la madre y el feto la cual se estima el 1% de las vacas infectas (1).

La bacteria de tuberculosis bovina provoca necrosis granulomatosa crónica que se encuentra un proceso inflamatorio en muchos órganos dependiendo de la ruta de entrada (4). Aunque la *Mycobacterium bovis* no es el patógeno principal que provoca la tuberculosis al hombre sino la responsable es la *mycobacterium tuberculosis*, solo que las personas contraen esta bacteria (*M.bovis*) al consumir leche crudas de animales infectados o al respirar gotículas infectadas (5). Se estima que en algunos países llega hasta el 10% de los casos de tuberculosis humana son ocasionados o provocados por el agente de *M. bovis* (6)

Las pérdidas económicas que causa esta enfermedad son altas para la industria ganadera, ya que esto se da por la disminución de la eficiencia productiva como también reproductiva de los animales infectados, teniendo de estos bajo peso, y la baja producción de la leche que puede llegar hasta el 20% y en casos se ha visto mal aspecto de la leche al ordeñar, asimismo una vez comprobada la enfermedad a las autoridades hay un decomiso de los animales o las canales sin remuneración alguna (3).

2.2. ETIOLOGÍA

La tuberculosis bovina el principal agente es el *M. bovis*, del género *Mycobacterium* en las cuales tenemos las siguientes: *M. microti*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canneti* y *M. pinnipedi*, aunque se conoce otras bacterias tuberculosas en el bovino como son, *M. tuberculosis* y *M. Avium*, y de este último habido proceso generalizado, la forma de esta bacteria es bacilar y como todas las bacterias de este tipo son alcohol ácido resistente y su pared celular es lipídica que esto le permite al patógeno tener un crecimiento lento y ser resistente a las condiciones adversas en el hospedador que es el animal y en el medio (7). Esta bacteria es gram-positiva que no forman esporas y son resistentes a muchos desinfectantes químicos y a los rayos ultravioleta (8).

La bacteria de *M bovis* y *M tuberculosis* son clínica y radiológicamente no distinguible por lo que se puede observar con métodos genotípicas y fenotípicas, ya que estas diferencias son importantes al momento de realizar un tratamiento farmacológico, ya que el patógeno *M. bovis* tiene resistencia a la pirazinamida (9).

2.3. MORFOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN

2.3.1. *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*)

Es un bacilo aerobio que es intracelular obligado, pero también pueden vivir en el medio ambiente que quiere decir que puede estar fuera del huésped por mucho tiempo o periodo, se lo observa rectos como bastón pero en ocasiones se doblan haciendo forma de club, estas bacterias no forman esporas y no son móviles, su tamaño varía entre 0.6-1.1 x 1.0-10um(10).

2.3.2. Crecimiento

En los medios de cultivo es lento y pueden demorar de 2 a 8 semanas para que esta bacteria haga visible sus colonias, este microorganismo es el principal agente causal que provoca la enfermedad en los mamíferos (10).

2.3.3. Bacilo humano y el bovino

Según Suquilanda (10) estos dos bacilos se los puede identificar por su pH que necesitan para su multiplicación, ya que las bacterias de las cepas humanas tienen un mejor crecimiento en medios de pH 7.4-8.0 y las bacterias del bovino crecen mejor de 5.8-6.9, y el *mycobacterium avium* optan a una alcalinidad media.

2.3.4. Animales susceptibles

La susceptibilidad de diferentes animales a *M. bovis* depende de ciertas características como son: en la ruta de exposición, virulencia de la cepa, la dosis y duración de la exposición (11). Esta bacteria infecta al bovino y especies que tienen como interés productivo como tenemos al equino, porcino, caprino y ovino asimismo a los de fauna silvestre a los animales en cautiverio y al hombre, se sabe poco respecto a la infección en las aves de *M. bovis*, por lo general se piensa que en las aves son resistentes a esta bacteria, se han realizado experimentos en palomas infectando vía oral e intraperitoneal incluidos los cuervos y los patos reales resultaron ser resistentes a la infección (12).

2.4. PATOGENIA

Las formas de infección de esta enfermedad son por la vía aérea, se presume que un 95% de los casos tratados son por medio de esta vía, y la otra vía de contagio como la digestiva cuenta con un 5% (13). Ya que las partes más contagiosas se da por las secreciones respiratorias que vienen de los animales que son positivos a esta enfermedad y cual contaminan o diseminan el lugar (14). Una vez que el microorganismo entra al organismo, esta provoca daños como lesión granulomatosa (15).

Al entrar esta bacteria al organismo, esta se manifiesta en dos etapas que son: el complejo primario y el complejo secundario (16). El complejo primario de la infección la encontramos por lo general en el pulmón de bovino adulto y del hombre, en los terneros, aves y cerdos se los encuentra en el tubo digestivo en las partes como son faringe. Intestino y el hígado como asimismo en los ganglios correspondientes. La diseminación secundaria actúa luego del complejo primario, esparciéndose en todas las partes del

organismo que se forma granulomas en cualquier parte de él, provocando alteraciones como la tuberculosis cavitaria, miliar y perlada (17).

Cuando el animal se encuentra inmunodeprimido se da el complejo secundario que no es otra cosa que la relación del agente infeccioso y el huésped. Las lesiones que se encuentran en latencia, estas continúan y se dispersen por vía linfática y sanguínea, a la semana que las bacterias ingresan se brota el punto primario visible y luego de 15 días ya comienza la calcificación (17).

El complejo primario se lo encuentra en los pulmones, ganglio linfático y bronquial, ya que la vía respiratoria es la fuente principal de entrada de este microorganismo en los bovinos, en el hombre y en el perro, en los terneros que ingieren leche de vacas contaminadas se suele encontrar en los ganglios mesentéricos y las lesiones secundaria se encuentra sobre todo en el hígado (18).

2.5. EXCRECIÓN Y PERIODO DE INCUBACIÓN

El microorganismo como *M. Bovis* es eliminado por distintas vías, la mayor parte sucede en la finalización o último estadio de la infección por los distintos fluidos corporales como leche, orina, saliva, secreciones, vaginales y semen, ya que también es expulsada por las heces, los signos de esta patología como la tuberculosis tardan meses, alrededor de 15-34 meses para que se desarrolle en el ganado o también pueden presentarse en varios años cuando el animal se encuentre deprimido, con estrés o edad avanzada (19).

2.6. TRANSMISIÓN

La vía respiratoria se acepta como el método primario de propagación de las infecciones en todas las especies. Pero también existen otros métodos de contaminación que no son comunes de propagación, pero tenemos los orales, congénitos y por heridas, esta patología no depende de la edad o sexo, los signos clínicos se llega a observar en animales adultos o viejos, estos animales se convierten en portadores asintomáticos que son una fuente de infección (20).

Para que haya esta transmisión al ganado con *M. bovis* va a depender de varios factores como la frecuencia de excreción, la ruta de infección, el periodo de transmisibilidad y susceptibilidad que tenga el huésped, esta bacteria puede salir por las secreciones de las fosas nasales, leche, calostro, orina y se ha dicho que en ocasiones sale por el semen, este microorganismo puede estar presente en los yogurts o queso que se lo elabora con leche cruda, estos subproductos a base de la leche debe tener un tratamiento de calentamiento de la leche o pasteurización de la misma para eliminar esta bacteria y así evitar su propagación (21).

El bovino la eliminación de *M. bovis* es por vía respiratoria y contagia a otro bovino por las partículas infectadas que va a inhalar, ya que estos animales pueden contaminar la sala de ordeño, la granja, los comederos y bebederos e incluso el forraje que va hacer consumido si se encuentra con orine o heces de animales infectados, este microorganismo puede vivir en condiciones ambientales óptimo para el hasta 6 meses (22)

Según Garro (22) El *M. bovis* como ya se ha dicho que puede estar en la leche o en el calostro esto se ha considerado como un vehículo transmisor en los terneros que consumen de vacas infectadas, ya que en la glandula mamarias no se observan la infección o signos a temprano tiempo, pero en ocasiones estas bacterias pueden alterar la consistencia o apariencia de la leche.

En el hombre las transmisiones de este microorganismo son por el consumo de leche no pasteurizada sino por el consumo directo de la leche cruda o también por quesos artesanales, se ha considerado muy poco el consumo de carne de animales infectados ya que por su cocción, pero también en carnes que no son bien cocinadas o azadas resulta ser un peligro para la salud pública (23). El contacto directo con animales infectados con esta bacteria en fincas o en camales puede ser otro factor de contagios para las personas por la inhalación de las partículas eliminadas del animal enfermo (24).

Según Garro (24) Otro factor de contaminación o transmisión es por vía vertical que se da de madre a feto, esto ocurre atreves del cordón umbilical, se considera poco común, que puede llegar hasta el 1% de animales infectados.



Figura 1 Ciclo de transmisión

2.7. MANIFESTACIÓN CLÍNICA

Los signos clínicos varían dependiendo los factores como dosis de la infección, el grado de patogenicidad que va a tener el agente etiológico, y la inmunodepresión que tendrá el animal y la manifestación de la enfermedad dependerá en la fase que se encuentre la patología (25). Se da el caso que los animales que presentan tuberculosis miliar difusa hay un enflaquecimiento progresivo que deberá ser sospechosa a tuberculosis, los animales ya enfermos suelen ser tranquilos e inactivos, cuando ya afecta a los pulmones se caracteriza por obtener una tos seca que es provocada por la bronconeumnia, las tos que hace el animal no es fuerte (26).

Aunque los animales jóvenes o a temprana edad no presentan signos clínicos ya que para ellos desarrollan una etapa subclínica que después de cierto tiempo será reactivado, es usual observar a estos animales infectados con cansancio, pérdida de peso, débil, les dificulta respirar, se cansan rápido, tos seca, los linfonodos agrandados, hay presencia de tos. Ya en la necropsia se puede observar tubérculos que tienen la apariencia amarillenta y fibrosa, en los diferentes órganos afectados y en los ganglios al momento

de abrirlos se encuentran negros, estos tubérculos varían dependiendo de la etapa que se encuentre la enfermedad (27).

2.8. PERDIDAS QUE OCASIONA ESTA ENFERMEDAD

PERDIDAS DE PRODUCCIÓN (28)

- La producción disminuye un aproximado de 10% ya sea en kilos de carne como la producción de leche
- La fertilidad se ve afectada en un 6%
- Disminución de peso en un aproximado de 15% de lo normal
- Predisposición a otras enfermedades por lo que el animal esta inmunodeprimido
- Disminución de vacas preñadas en el hato o abortos
- Decomiso total o parcial de los animales infectados

2.9. SALUD PÚBLICA

La tuberculosis en el hombre que es provocada por el *M. bovis* se da muy rara vez en países donde la leche es pasteurizada y encontramos programas de erradicación de tuberculosis bovina. Esta enfermedad la encontramos en lugares o países donde los controles no son muy estrictos, asimismo investigaciones se ha encontrado que los humanos pueden adquirir esta enfermedad por otras especies como focas, cabras, rinocerontes, ciervos de granja, los animales salvajes adquiridos de la caza pueden ser una fuente principal de contraer esta bacteria por el consumo de la carne (29).

Las infecciones en humanos pueden ser en algunos casos asintomáticas, en otros casos la enfermedad puede desarrollarse en un periodo corto después de la infección o también puede desarrollarse años después, cuando el organismo este deprimido y esto da paso a la reactivación. Esta bacteria afecta a los linfonodos, huesos, piel, articulaciones, vías respiratorias, muy pocos casos presentan tuberculosis cutánea, esta es conocida como lupus vulgaris. Esta enfermedad como la tuberculosis se la puede tratar con antibióticos pero cuando es bien avanzada no hay tratamiento (30).

2.10. POST MORTEM

Las lesiones que se presentan son tubérculos que varían de tamaños, que en ocasiones no pueden ser perceptible al ojo humano puede ser pasado por alto, ya que se considera que es necesario la realización de análisis, se puede encontrar agrandado los ganglios linfáticos, que más comunes se dice que son los de la cabeza y tórax, también se los encuentra a nivel de pulmón, hígado, bazo y en las cavidades corporales. Cuando la inspección es escrupulosa y se encuentra afectada se puede evitar el consumo de esta (4).

Asimismo, encontramos granulomas purulentos que tienen capas fibrosas con presencia de calcificación. Con las pruebas que se deben realizar a los seis pares de linfonodos con los mediastínicos, retrofaringeos, bronquial, inguinal y parotídeos. Pero los lugares donde se pueden encontrar son en los pulmones t ganglios mediastínicos hasta un 95% de animales que estén contagiado con esta enfermedad (31).

Esta inspección también se la realiza en casos para reforzar los diagnósticos en animales que se realizó la técnica de tuberculina, observando los ganglios linfáticos alterados que muy posiblemente este asociado con la enfermedad de tuberculosis bovina, por tanto también se debe realizar análisis presuntivos con muestra de tejidos, histopatología para comprobar alguna lesiones no observadas al ojo humano, para poder identificar esta bacteria con los ácidos , por medio de tinción de Ziehl/Neelsen, la técnica de PCR afirma la bacteria de *M. bovis* (31).

2.11. DIAGNÓSTICO

Este diagnóstico para confirmar la tuberculosis bovina es el método intradérmico de la tuberculina que permite acertar un 98% de los casos positivos en los animales infectados, esta prueba ha sido la más utilizada para erradicar la enfermedad en muchos países que gracias a este método se da la detección y el sacrificio a los animales infectados, esta prueba se la puede realizar de diferentes maneras, pero la más utilizada o simple es la prueba intradérmica única, en esta prueba se va a inyectar el derivado proteico purificado en el pliegue del animal y este debe ser revisado cuando hayan pasado 72 horas, si y el resultado es positivo se le va a observar al animal una tumefacción y en la zona va estar caliente done se colocó la inyección, la cual será de fácil de observar (14).

También podemos utilizar una prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas también llamada ELISA para que analice los anticuerpos y definir los antígenos de la bacteria *M. bovis* ya que este método puede ser utilizado para detectar animales que tengan reacción positiva. ELISA podría ser de gran provecho como una prueba complementaria a la prueba intradérmica, para encontrar en un rebaño los animales infectados que pueden contagiar a los demás, hasta que no se hagan las pruebas de confirmación de esta patología, los ganaderos en diferentes países no siguen un protocolo de control y erradicación de la tuberculosis o enfermedades que pueden ser infectocontagiosas (32).

2.11.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Para esta enfermedad el diagnóstico clínico no es seguro en campo, por lo que se tiene que tener un seguimiento al historial clínico del animal infectado, observar su sintomatología, por lo general se hace difícil diagnosticar a simple vista ya que sus signos tardan meses en ser específicos, y algunos animales que tienen la bacteria latentes se necesitan que entren en un periodo de estrés o depresión para que esta se reactive o esperar que el animal este viejo, por lo que es muy complicado hacer un diagnóstico presuntivo, ya que esta enfermedad se recomienda hacer métodos químicos o métodos indirectos para tener un diagnóstico certero (33)

2.11.2. DIAGNÓSTICO INDIRECTO

Una de las pruebas para el diagnóstico empleada por la enfermedad causada por micobacterias es la examinación directa a bacterias ácido-alcohol resistente. Pero este método se requiere personas que tengan experiencias con el frotis y para la lectura, una de las ventajas que es rápido y no es costosa. Estas tinciones existen dos que se puede decir que la principal es la de Ziehl-Neelsen y la otra que es la técnica de fluorocromo (34).

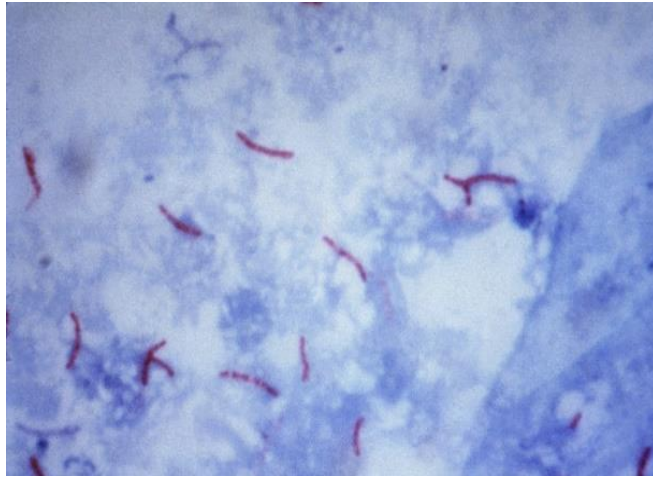


Figura 2 *Mycobacterium bovis* por la técnica Ziehl/Neelsen

Cultivo in vitro

El cultivo se realiza como un método ya definitivo para el diagnóstico de la tuberculosis y de idéntica la clase de micobacteria, las bacterias de tuberculosis tienen un crecimiento lento que puede demorar de 6-8 semanas para que sea visible. Para este cultivo las pruebas primero se las homogenizan y descontaminan median el ácido – alcohol esto se centrifuga y se pone a cultivar en varios métodos a base de huevos, se encuentra el lowesteimm Jensen (L-J), coletos o stonebrinks que contienen piruvato o deben tener el mismo y glicerol o también se le puede emplear agar como middlebrook o agar sangre (31)

La bacteria de *M bovis* no crece en lowestein ya que no se puede utilizar glicerol como fuente de carbono, sino el Stonebrink ya que contiene la misma composición que el L-J pero la diferencia que este en vez del glicerol es reemplazado por piruvato. La bacteria de *M.bovis* tiene un crecimiento lento y tiene que tener una temperatura de 37 grados centígrados y esto puede demorar para ser visibles sus colonias de 6-8 semanas (31)



Figura 3 Cultivo *Stonebrinks*

Prueba de tuberculina

En la prueba de tuberculina encontramos 3 clases de pruebas que son distintas y se le puede realizar al bovino, como tenemos la prueba ano-caudal que es de rutina la más utilizada, con PPD bovina que su siglas significa “derivado proteico purificado”, la prueba cervical simple de saneamiento también con PPD y la prueba cervical comparada que esta última tiene diferente que a pesar de PPD bovina también tiene el PPD aviar que quiere decir con *M. aviaum* con una concentración de 0.5mg/ml (35)

La prueba de ano-caudal tiene una sensibilidad aproximada de 69-96% y una especificidad de 97%, otra de las pruebas mencionadas como es la prueba cervical simple tiene una sensibilidad aproximada de 82-90% y especificidad de 76-96% y la última que mencionamos que es la prueba cervical comparada con una sensibilidad 56-94% y en especificidad aproximada de 89-99% (35)

El pliegue caudal

Es una de las técnicas más utilizada y una de las pruebas de rutina para las ganaderías que desconocen su estado sanitario con referente a la tuberculosis bovina, es un procedimiento sencillo como las demás inoculaciones de las pruebas, esta técnica se la realiza en el pliegue caudal de la cola del animal, que se coloca intradérmica 0.1 ml de PPD bovina ya

que esta zona no debe tener ninguna alteración que se vaya a realizar posteriormente su lectura, el medico que aplico debe hacer la lectura para que observe y palpe e interprete esta prueba posteriormente a las 72 ± 6 posteriores a su inoculación, se considera “Negativo” cuando son se observa ningún cambio en la zona de aplicación y “Reactor” cuando en la zona que se aplicó se observa o se palpe algún abultamiento o engrosor, rubor o dolor en el sitio que se inoculo (36)

Cervical simple

Esta técnica se utiliza en las ganaderías donde se conoce que en el sitio hay o hubo la bacteria de *M. bovis* o saber que animales que están expuestos en el hato no se hayan contaminado, esta técnica es la más sensible por lo que se requiere un trabajo más intenso, su técnica es el rasurado de la zona donde aplicara la tuberculina que es en el tercio medio superior del cuello, 10cm por debajo de la cesta, asimismo como la anterior se inocula 0.1ml de PPD bovino y su lectura es a las 72 horas ± 6 y su resultado de penderá lo que se observe, su negatividad y reactor es la misma que la prueba anterior (36)

Cervical comparativa

Esta técnica se la realiza inoculando PPD bovino y PPD aviar esta prueba se aplica cuando en el lugar hay una desconfianza que exista el *M: bovis* y *M: avium* una vez que se confirma que exista la infección por medio del laboratorio de deja de realizar esta prueba, esta técnica se la realiza rasurando dos partes cuadrangulares de 5cm por cada lado, la parte de aplicación es en el tercio medio del cuello, en una aproximado de 10cm de la cresta superior se realiza la inoculación y 110cm debajo de la anterior, así mismo se inocula 0.1ml de *M. avium* y *M. bovis*, una vez inyectado se levanta el pliegue en la zona rasurada y se mide con el cutímetro y se registra en milímetros, y las lectura se la debe realizar a las 72 horas ± 6 (36)

2.12. REACCIÓN A LA CADENA POLIMERASA (PCR)

Este método se lo realiza por su rapidez comparado con otros métodos de diagnóstico, esta se lo utiliza para identificar micobacterias, clamidias, micopalsmas, brucelas u otras

bacterias que su crecimiento es lento, ya que esta prueba se la puede hacer en un día. También es utilizado gracias a su sensibilidad y especificidad para tuberculosis en que tiene para detectar las al microorganismo como es la tuberculosis en ganado y humano. Ya que esta técnica amplifica pequeñas cantidades de ADN, el PCR tiene como ventaja que codifica el gen de la proteína MPB70 que se dice que es específica de *M.bovis* (37)

2.13. ERRADICACION PREVENCIÓN Y CONTROL

Una manera para minimizar y eliminar las pérdidas ocasionadas por la tuberculosis que ocasiona al ganado y así mismo para prevenir posibles casos en humanos por esta bacteria de *M. bovis*. La erradicación se refiere hacer las pruebas necesarias hasta la eliminación completa de los animales que sean reactores afirmativos de un rebaño (38)

La prevención es uno de los factores más importantes en las ganaderías que se tienen que tomar en cuenta, uno de los casos más antiguos y eficaz es la cuarentena al obtener un caso positivo, también otros métodos como es la higiene ambiental con el único propósito de minimizar la infección en el rebaño, asimismo tener charlas o capacitaciones para los ganaderos de las posibles enfermedades que pueden tener en su ganadería (38)

Para reducir los casos de tuberculosis bovina tanto en animales como en humanos se debe tener el control estricto como es la bioseguridad, un programa de eliminación de los animales que se encuentren positivos a las distintas pruebas sometidas, una pasteurización láctea, para venta o para realizar subproductos de la leche como mantequilla o quesos (39).

Ecuador no tiene un programa para el control de esta enfermedad como es la tuberculosis bovina o tener conocimientos exactos de esta enfermedad, se debe implementar obligatoriamente pruebas diagnósticas y en caso positivo eliminar los animales que pueden ser vehículo a infectar a los de más animales (39).

2.14. TRATAMIENTO

Si hay tratamiento de esta enfermedad pero no se la recomienda por lo que es demorado y costosa y corre el riesgo de contaminar a otros animales, la forma más efectiva es matar

al animal y botar su carcasa para evitar la contaminación tanto en el rebaño a las personas que pueden consumir de este animal infectado (40)

2.15. TUBERCULOSIS BOVINA EN DIFERENTES PAÍSES

En Perú la última investigación a nivel nacional tenía una prevalencia en el año 1965 la cual fue de 18.1% donde se realizaron la prueba de tuberculina ano-caudal, después en el año 1999 se realizaron evaluaciones por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) donde se realizó programas de control y erradicación para los animales infectados de tuberculosis bovina, donde se reportó que el 0.17% de reactores positivos se encontraron en el lugar de Junín en 1798 animales, en el Cusco no hubieron casos positivos por lo que dio resultado a 0% en 1500 animales, en la ciudad de Arequipa la prevalencia arrojó un resultado de 0.075% en 63702, en el sector el Puno la prevalencia fue de 0.21% en 1901 animales, y en la ciudad de Cajamarca los estudios dieron positivos creando una prevalencia de 0.64% de 7487 animales. En el año 2002 se realizó una investigación para ver si había presencia de tuberculosis bovina en la provincia de Parinacochas, Ayacucho con la técnica de intradermorreacción en la zona del pliegue ano caudal donde ningún animal bovino presentó positivo o como reactor teniendo 0%, puede ser por la baja densidad animal, por la explotación bovina, medio ambiente que no es el óptimo para la bacteria y la vigilancia que realiza el SENASA que prohíben el ingreso a animales positivos a tuberculina (41)

Distrito	Población de bovinos (n)	Estratificación de la muestra (n)	Animales muestreados (n)
Chumpi	4,195	63	85
Coracora	7,635	115	143
Pullo	6,008	91	101
Puyusca	7,664	116	132
Total	25,502	385	461

Tabla 1 Población total de animales muestreados para evaluar la presencia de tuberculosis bovina en la provincia de Parinacochas

En la ciudad de México en el año 2004 se realizó un estudio de 41 vacas la cuales se dividieron en dos grupos, donde el primero está conformado de 21 vacas Holstein Friesian que son reactivos a las pruebas de tuberculina simple caudal que en el lugar se encuentra alto índice de prevalencia de animales tuberculosos en el estado de México y como testigo en el segundo grupo se colocaron 20 vacas de la misma raza negativo a tuberculina simple caudal ubicados en la ciudad de Sonora. Este total de animales fueron sometidos a faenamiento y realizados la inspección post mortem donde se observaron los linfonódulos como traqueobronquiales, mediastínicos, submandibulares, retrofaríngeos, hepáticos, mesentéricos, supramamario e ilíacos, estas muestras se las llevaron a realizar las pruebas de bacteriología e histopatología, esta última se sometió a fijación en 10% en solución de formaldehído que se incluyeron en parafina, y los histopatológicos se tiñeron con Ziehl-Neelsen y hematoxilina-eosina con el fin de observar la bacteria de *M. bovis* y fueron cultivadas en Stonebrink con piruvato. Middlebrooks y Herrolds que es a base de huevo, y como resultados en las 21 vacas que tenían procedencia del sector alto en tuberculosis bovina, el 71.4% las lesiones eran acorde a tuberculosis bovina, Ziehl-Neelsen salieron positivas de 15/21 y en el 52.4 se aisló *M. bovis* (42)

Animal Num	LN:Lesion Degree	MGL	IP	HE	HISTOLOGY		PCR	
					ZN	Cultivo	Simple	Nested
1	SLM	I	-	+	-	+	-	+
2	Tr:2,M:2	I, II	+	+	-	-	+	+
3	Tr:3,M:3	I, II	+	+	-	-	-	+
4	Tr:3,M:3	III	+	+	-	-	+	+
5	Tr:3,M:3	III	+	+	-	+	+	+
6	Tr:3,M:3	III	+	+	-	+	-	+
7	SLM	I, II, III	-	+	+	-	-	+
8	R:2	I, III	+	+	+	-	-	+
9	Tr:2,M:2	I, II	+	+	+	+	-	+
10	Tr:3,M:3	I, II	+	+	+	-	-	+
11	Tr:3,M:3	I, II	+	+	+	+	+	+
12	Tr:1,M:3	I, III	+	+	+	+	+	+
13	Tr:2,M:3	I, III	+	+	+	+	+	+
14	Tr:2,M:2	I, III	+	+	+	-	+	+
15	Tr:2,M:1	I, III	+	+	+	-	+	+
16	Tr:2,M:2	III	+	+	+	-	+	+
17	Tr:1,M:1	III	+	+	+	+	-	+
18	Tr:1,M:1	III	+	+	+	-	+	+
19	Tr:2,M:1	III	+	+	+	+	-	+
20	Tr:1,M:2, :3	I, II, III	+	+	+	+	+	+
21	Tr:2,M:1,r:3	III	+	+	+	+	-	+
T-			2	0	6	10	10	0
%			10	0	29	48	48	0
T+			19	21	15	11	11	21
%			90	100	71	52	52	100

Tabla 2 Descripciones de lesiones y resultados de las diferentes pruebas para tuberculosis bovina

En el Ecuador la tuberculosis bovina a los animales es de bajo conocimiento por la insuficiente información la enfermedad, una de las pruebas que más se la utiliza es la intradérmica, comparativa y simple, es difícil obtener datos por lo dificultoso que es plantear programas de vigilancia (8).

Según Proaño (8) en un estudio que se realizó en Imbabura se indicó que la prevalencia es de 3.9% en los cantones de Otavalo, El Ángel, Espejo y Cayambe; en el sur de pichincha en el cantón Mejía su prevalencia fue de 7.9%. En el año 2008 por la misma zona revela que la prevalencia fue de 7.15% ya que esta es una región importante de Ecuador por su zona lechera.

En el año 2013 en las provincias de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas perteneciente región costa. Las investigaciones de tesis por la realización del método de tuberculina en el pliegue ano-caudal para 160 animales se llegó a conocer que la prevalencia llego a los 12.86% (43).

En la parte de la sierra, en la provincia de Loja en el 2014 se realizó la prueba de intradérmica simple y en animales faenados del matadero que se encontraron en frigoríficos, se realizaron pruebas mediante el método de baciloscopia con tinción de Zielh Neelsen, dieron positivos al 6.2% en inoculación intradérmica y 17.3% por el método de baciloscopia, llegando a conocer que en la provincia de Loja hay prevalencia de tuberculosis bovina (19).

SECTOR	POSITIVOS		SOSPECHOSOS	
	Nro.	Porcentaje	Nro.	Porcentaje
EL CISNE	0	0,00	0	0,00
YANGANA	1	4,55	6	23,08
EL VALLE	17	77,27	8	30,77
GUALEL	0	0,00	0	0,00
JIMBILLA	0	0,00	0	0,00
MALACATOS	0	0,00	1	3,85
QUINARA	0	0,00	0	0,00
SAN LUCAS	0	0,00	0	0,00
SAN SEBASTIÁN	3	13,64	9	34,62
SANTIAGO	0	0,00	1	3,85
TAQUIL	0	0,00	1	43,85
VILCABAMBA	1	4,55	0	0,00
TOTAL	22	100	26	100

Tabla 3 Bovinos retores de los reactores del Cantón de Loja

	Parroquia	Rango de Edad	Reactores, según parroquia	Promedios, en mm			
				Primera lectura	Segunda lectura	Diferencia entre lecturas	Incremento de grosor
Reactores Positivos Total 22	El Valle	1-4 años	4	4,00	13,00	9,00	9,79±4,93
	El Valle	5-8 años	12	4,80	15,70	10,90	
	Vilcabamba		1	3,00	9,20	6,20	
	Chuquiribamba		2	3,50	9,00	5,50	
	El Valle	9-12 años	1	5,00	24,50	19,50	
	Yangana		1	2,00	8,30	6,30	
	San Sebastián		1	2,90	13,20	10,30	
	Promedio			4,25±1,13	14,04±2,44		
Reactores Sospechosos Total 26	El Valle	1-4 años	7	3,36	6,68	3,32	3,33±0,36
	Yangana		3	1,71	5,08	3,37	
	El Valle	5-8 años	2	4,50	7,55	3,05	
	Yangana		2	2,02	5,33	3,31	
	Santiago		1	2,00	5,00	3,00	
	San Sebastián		8	4,07	7,51	3,44	
	Yangana	9-12 años	1	2,00	5,00	3,00	
	Malacatos		1	2,00	6,00	4,00	
	San Sebastián		1	4,03	7,08	3,05	
	Promedio			3,24±1,41	6,57±1,41		

Tabla 4 Aumento de grosor mm del sitio de inoculación en los bovinos ya sean positivos o sospechosos

Muestras	Número		Baciloscopia positiva	
	Cantidad	Porcentaje	Cantidad	Porcentaje
Pulmón	10	12,82	2	20,00
Hígado	23	29,49	4	17,39
Ganglio poplíteo	6	7,69	1	16,66
Ganglio cervical superficial	3	3,85	1	33,33
Ganglio mamario	19	24,36	1	5,26
Ganglio mediastínico caudal	3	3,85	0	0,00
Ganglio mediastínico medio	5	6,41	0	0,00
Ganglio mediastínico craneal	9	11,54	0	0,00
	78	100	9	100

Cuadro 1 Diagnóstico por medio de la tinción de Ziehl Nelsen

En la provincia de Cotopaxi, Carchi, Imbabura se realizaron pruebas a ganado con el método de tuberculina ano caudal y los resultados obtenidos fue de 8.5% en la provincia de Cotopaxi y Carchi y con un 4.6% en la provincia de Imbabura, llegando como una pequeña discusión que en la parte alta de la sierra se encontró positivo a tuberculosis bovina provocando una preocupación porque en la sierra los productos como la leche se toma cruda en algunos sectores de las diferentes provincias (43).

Según Ramos (3) en la parte baja de la provincia donde se muestreo 269 animales en la cual se realizó la prueba tuberculina intradérmica, ano caudal en los cantones de El Guabo, Machala, Santa Rosa, Arenillas y Las Lajas el resultado de prevalencia fue de 0% y en la cual el sexo de bovinos fueron más hembras 245 teniendo 91,1% y machos 24 teniendo 9,95.

En los humanos la tuberculosis bovina no registra un estudio exacto pero se registró un estudio solo presentaron trabajadores de fincas y de algunos camales, llegando a tener un 29% de positivo mediante la prueba de tuberculización, aunque se dice que no es específica para la bacteria de M tuberculosis se asocia entre el test y el consumo de leche cruda (19).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Localización del área de estudio

Esta investigación se la realizó en el camal del cantón Pasaje provincia de El Oro, para la toma de muestras de los ganglios linfáticos de los animales faenados.

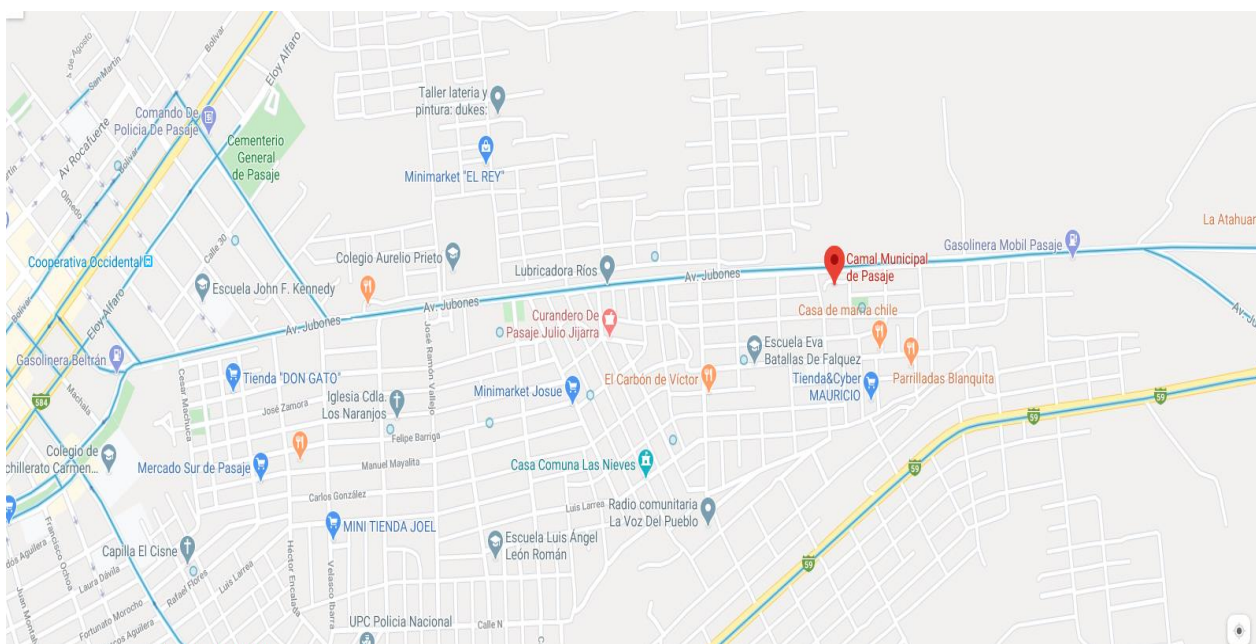


Figura 4 Mapa cantón Pasaje

3.1.1.1. Límites

Limita al norte con el cantón el Guabo, al sur con el cantón Santa Rosa, al este con la provincia del Azuay y Zaruma y al oeste con el cantón Machala

3.1.1.2. Coordenadas geográficas

Coordenadas

3°19'37"S 79°48'18"O

Altitud

- Media 550 m s. n. m.
- Máxima 1000 m s. n. m.
- Mínima 100 m s. n. m.

3.1.2. Materiales

Camal

- Recipientes para muestras
- Botas
- Casco
- Pilas refrigeradas
- Cámara fotográfica
- Guantes
- Empaques ziploc
- Mandil
- Envase con cloro
- Cuchillo
- Hojas de registro
- Marcador permanente

Laboratorio

- Bisturí
- Guantes
- Mascarilla 3M N95
- Zapatones
- Cofias
- Tijera
- Bajalengua
- Morteros
- Agua destilada
- Medio de cultivo Stonebrink y Ogawa Kudoh
- Isopos
- Cloro
- Porta objetos
- Papel filtro
- Microscopios
- Gradillas
- Pinza anatómica
- Algodón
- Asas bacteriológicas
- Fósforos
- Gafas

Equipos

- Estufa
- Microscopio óptico
- Cabina de seguridad biológica
- Termobloque
- Autoclave
- Congelador

Sustancias y reactivos

- Agua destilada
- Soda al 4%
- Alcohol industrial
- Alcohol acido
- Aceite de inmersión
- Colorante fucsina fenicada y azul de metileno
- Medios de cultivo Ogawa Kudoh y Stronebrinks

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Población de estudio: Comprende el total de los bovinos ingresados dos días a la semana en el camal durante un mes que fue un total de 151 bovinos

Unidad experimental se realizó un estudio descriptivo, observacional, sobre los ganglios alterados, ya seas por su tamaño o forma que presentaban los animales que iban hacer faenados

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Técnica e instrumentos de investigación

- Recolección de las muestras de los ganglios linfáticos, estos nódulos linfáticos deben ser extraídos del animal que se esté faenando y se vean alterados, que posiblemente sean por *Mycobacterium bovis*, este trabajo se lo realizara en los días que se faena más animales (Jueves y Viernes) que se realizó por un mes.
- Se realiza la siembra de medios de cultivo para el microorganismo *Mycobacterium* que en este trabajo se utilizaron *Ogava Kudoh* (OK) y Stonebrink (ST), este medio de cultivo se lo debe revisar cada 7 días para observar si hay

crecimiento de colonias en cada cultivo que se realizó, este procedimiento se lo debe verificar por 6 semanas, si no hay crecimiento de colonias el tubo de cultivo se lo desecha.

- Se realiza la técnica de baciloscopia cuando haya crecimiento de las colonias en los medios de cultivos, para luego realizar la tinción de Ziehl/ Neelsen y observar si hay presencia de mycobacterium

3.3.2. Población y muestras

La población que se utilizó, fueron los animales que llegaron al camal para ser faenados durante el mes de noviembre en el camal municipal del cantón Pasaje

De la población bovina que llegó al camal se realizó la respectiva inspección de los linfonódulos y todos aquellos que presenten alteración se procede a recolectar aquellos nódulos afectados para la realización de las investigaciones durante el periodo de estudio que se realizó en el mes de noviembre del 2019,

3.3.3. Diseño de la investigación

El presente trabajo investigativo es de tipo observacional, transversal, prospectivo y analítico.

En la investigación se valoró prevalencia de tuberculosis bovina, donde se utilizó la inspección macroscópica, análisis PCR-LAMP, cultivos y la realización estadística de los animales infectados con tuberculosis bovina además de las variables sexo, edad, raza y procedencia

3.3.4. Variables de estudio

- Raza
- Edad
- Sexo
- Procedencia

- Animales positivos a tuberculosis bovina

3.3.5. Metodología de trabajo

Este trabajo investigativo consistió en dos partes: campo y laboratorio, donde la primera parte del trabajo consistió la observación y recolección de ganglios linfáticos, como: retrofaríngeos, cervicales, mediastínicos que presenten alterados tanto en tamaños como en forma y lesiones pulmonares en la inspección post mortem por un mes en el camal del cantón Pasaje que se realizó el día 7 de Noviembre hasta el día 29 de Noviembre del 2019 realizando la revisión de ganglios dos veces por semana observando un total de ocho días. La segunda parte consistió los análisis en el laboratorio donde se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública (INSPI) que estuvimos ubicados en el área de zoonosis, donde se realizó el respectivo cultivo de las muestras que se extrajeron de los bovinos sospechosos con tuberculosis, estos cultivos se los realizo ogava kudoh (OK) y Stonebrinks (ST), también se realizó la técnica de baciloscopia, donde previamente se realizó la tinción de Ziehl- Neelsen (ZN) para visualizar los bacilos con claridad, para confirmar que es positivo a *Mycobacterium Bovis* se realiza la técnica PCR-LAMP

3.3.5.1. Análisis y recolección de muestras

Muestreo en el camal

En esta parte de la investigación consistió en observar los ganglios de los animales que se están faenando y ver que tengan alteraciones que se asemejen a la *M. bovis*, en el cual duro un mes que consistía en ir al camal los días que más animales faenaran que fueron dos veces por semana por el tiempo mencionado, a continuación, los pasos que se realizó en el camal.

- En el camal del cantón Pasaje se realiza el faenamamiento a las 3am, antes de que los animales ingresen a ser faenados, se hace una pequeña observación de los animales que podrían tener tuberculosis, observando si presentaban signos clínico como caquéticos, tos, decaimiento, debilidad, fiebre, también se anotaba la edad, raza, sexo y la procedencia de cada animal, pero apartemente de la observación

ante mortem, se observó a todo los animales en el momento de faenamiento para inspeccionar si presentaban los ganglios linfáticos alterados.

- El camal presenta una línea de faenamiento que sigue un orden al momento de la matanza como es: aturdimiento, degollado y desangrado, luego lo cuelgan mediante una cadena en las cual se prosigue a cortar las patas, descuerado, eviscerado y despiece. Una vez que las vísceras se la saco paso al área de revisión donde se procedió a observar los ganglios pulmonares que son: (mediastínicos y traqueobronqueales) y retrofaríngeos. Los ganglios que se buscaba son los que se encontraban alterados en su forma y su tamaño.
- Cuando se extraía los ganglios alterados se hacía un corte transversal con un cuchillo para observar internamente si presentaba una coloración negra o presencia de algo fuera de los común, posterior a eso se lo llevaba a la muestras para ser colocada en un envase de plástico (muestras de orina) y luego se la colocaba en una funda ziploc donde se anotaba el número de vaca para luego pedir los datos antes mencionados, y para finalizar se lo colocaba en un Cooler donde obtenía pilas de hielo para que la muestra no se dañe, y al finalizar se pasaba al cuchillo por un frasco que contenía cloro por 5 segundos para desinfectarlo y pasar a otro animal.
- Una vez que las muestras estén refrigeradas se las vuelve a colocar en el Cooler con las pilas de hielo para que las muestras puedan ser transportadas al laboratorio de Guayaquil, las muestras se las recolecto los días jueves y viernes por cuatro semanas o un mes, luego ser transportadas el día lunes al INSPI para ser sembradas.

Siembra en los medios de cultivos microbiológicos

Las muestras que se las llevó al instituto se las sembró en dos medios de cultivo: *Stonebrink* (ST) y *Ogava Kudoh* (OK) una vez sembrada se procedió a incubarlas a una temperatura de 37°C, luego de ser sembradas los tubos cultivados se mantienen en

posición horizontal y con la tapa semi abierta después de 48h se colocó vertical los tubos y se apretó las tapas, descripción de los pasos a continuación:

- Al momento de la siembra en la cámara de seguridad biológica se colocó un papel de despacho para poder realizar los cultivos, y colocar los materiales respectivos que se usarían en la practica
- Una vez que se ingresó los materiales se realizó una separación de lo estéril con lo no estéril para evitar contaminación en el procedimiento de los cultivos, una vez colocado los materiales en su posición se procedió a realizar el respectivo cultivo
- Para realizar el cultivo primero se sacó la muestra de la bolsa ziploc, se abrió en envase de plástico y con ayuda del bajalenguas se colocó la muestra (ganglio) dentro de los morteros de porcelana para realizar el macerado de la misma, antes del macerado con ayuda del bisturí se saca dos porciones del ganglio que estén más afectas, una va a hacer macerada y la otra se lo coloca en un Tubo Muestras Polipropileno para hacer una resiembra
- La muestra que va hacer macerada se agrega 1ml de agua destilada estéril y con la ayuda de la maja se lo tritura bien hasta tener una mezcla homogénea, posterior a la mezcla con la ayuda de un isopo se lo humedece bien sin coger grumos de ganglio para luego colocar en un tubo de soda conformado por hidróxido de sodio, sin antes mencionar que en el tubo de soda se lo debe introducir no más de dos minutos para descontaminar la muestra pero no matar al micobacteria
- Luego que pase los dos minutos en la soda, el isopo se lo coloca en el tubo de cultivo que ya está rotulado haciendo forma zigzag de abajo hacia arriba, recordando no hacer con mucha fuerza porque se puede dañar el medio y no vale la muestra y como se uso dos medios de cultivos y cada uno se divide en dos y cada uno se lo realiza con isopos nuevos, los cultivos que se realizo fue Ogawa Kudoh (OK) y Stonebrink (ST), cada uno con dos tubos, 4 en total. Una vez terminado este proceso con cada muestra llevado al instituto se coloca en un

envase boca ancha que contenga cloro al 5% para introducir los materiales contaminantes

- Al finalizar la investigación se cultivó 15 muestras con un total de 60 tubos de cultivos de OK y ST

Incubación y lectura de cultivos

- Una vez finalizado la siembra los tubos de cultivo se procede a colocar en una gradilla ordenadamente siguiendo la secuencia, estos se los coloco en una estufa a 37°C, los tubos no se los tapaba completamente, dejando semi abierto y de manera horizontal, no se los tapo completamente hasta dentro de 48h para que haya un intercambio de gases ya que el bacilo es aerobio estricto, una vez transcurrido las 48h se saca la gradilla de la estufa para levantar los tubos y cerrarlos completamente, estos permanecieron en la estufa de 6 semanas con la misma temperatura antes ducho. La primera lectura del primer cultivo se lo realizo después de 7 días y así sucesivamente con las demás muestras por un mes.
- Cuando era el momento de las lecturas se revisaba si el cultivo estaba bien sembrado y no haya contaminación, ya que si presentaban contaminación se debía hacer una resiembra. Las lecturas que se realizó se comenzaron a observar presencias de colonias en la segunda semana de siembra, en la primera no se notó algún cambio en el cultivo.

Incubación y conservación de las colonias bacterianas

- En esta etapa del trabajo ya habían transcurrido 5 semanas de la primera siembra por lo tanto se comenzó a aislar las colonias bacterianas presentes en el medio de cultivo. En la quinta semana los tubos que se cultivaron si presentaban crecimiento en dos muestras cultivadas por lo que tenían buen tamaño de colonia y se comenzó con la conservación de las mismas. A continuación, los pasos que se realizó en el INSPI

- Primero se equipó siguiendo con las normas de bioseguridad, una vez colocado el equipo a trabajar se procedió a retirar de la estufa los tubos de cultivo para realizar la observación, a lo que se iba revisando también se eliminaban los tubos que tenían más de 6 semanas y no presentaban algún tipo de colonia.
- Posteriormente se ordenó los tubos debido a su secuencia para luego llevarlos a la cámara de bioseguridad y trabajar con ellos, se ingresa los materiales necesarios que se utilizaran para la extracción de colonias de los diferentes tipos de cultivos, OK y ST, con la ayuda de un marcador se rotuló los microtubos en los cual iban hacer extraídos, estos microtubos con agua destilada se colocó las colonias adentro para estas luego pasar a conservar en congelación de -86°C . Los tubos de cultivo adquieren en algunos dos o más colonias, la cual en esos casos se debe extraer las colonias que contenga en la siembra.
- Estas colonias eran extraídas con la ayuda de un asa descartable, con la que se cogía la punta las colonias y llevado a los microtubos con agua destilada estéril teniendo que hacer movimiento circular para que la colonia del asa se desprende de la misma y quede en el microtubo, para cada colonia se requiere cada asa y se va eliminando la misma y así se la realiza para cada tubo de cultivo.
- Luego de cada extraída de la colonia en los microtubos, estos se los iba colocando en un termobloque (accublock digital dry bath) que contenía una temperatura de 87°C por un tiempo de 30 minutos para que suceda el proceso de inactivación de la bacteria.
- Una vez finalizado todo el proceso anterior con todas las muestras, los microtubos fueron colocados en una caja de congelación para mantenerlos a una temperatura de -86°C . para luego aplicar la técnica de tinción de Ziehl -Neelsen y la técnica de baciloscopia

3.3.5.2. Baciloscopia

El ácido alcohol resistente es la propiedad que tiene las micobacterias percibir en su pared la fucsina o también la auramina que es de un color amarillo fluorescente para conservar aun con la acción decolorante, así sea la mezcla de alcohol y ácido. Esta tiene características un alto contenido de lípidos, especialmente en los ácidos micólicos que contiene en la pared celular. Esta técnica si se la utiliza correctamente al bacilo se lo puede diferenciar como un bastoncito rojo fucsina. Esta técnica no es específico del bacilo tuberculosis, sino que tienen todos los géneros de *Mycobacterium*(44)

La baciloscopia se la utilizo para los medios de cultivo que si presentaron colonias mediante la técnica de Ziehl-Neelsen para observar si hay presencia de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR)

Rotulación de placas portaobjetos

Primero nos equipamos correctamente, una vez ya equipado se procede a sacar las colonias bacterianas que se encontraban en congelación y se las ubica en orden para poder rotular los portaobjetos. Terminado de rotular se pasa a la cámara de seguridad y se coloca papel de empaque y luego se ingresa todos los materiales que vamos a trabajar y se coloca en orden.

Preparación de las placas

Primero con la ayuda de una pipeta calibrada se coge aproximadamente una gota de los microtubos donde estaban las colonias bacterianas inactivadas, y se pone en el portaobjeto y con la ayuda de la punta del calibrador se hacen círculos expandiendo, para hacer lo mismo en otra muestra se debe eliminar la punta en un envase boca ancha con cloro, esta gota que se colocó en el portaobjeto se deja secar dentro de la cámara de seguridad colocando a un lado para que no moleste o se dañe la muestra.

Tinción de Ziehl-Neelsen

Una vez que ya se hayan secado las placas se procede a llevar a una área donde se procedió con la tinción, esa área se la equipo acorde a lo que tenemos que realizar, el lugar a trabajar fue un lavabo donde se lo cubrió con funda plástica para evitar que se manchen las paredes con el procedimiento de la tinción, se colocó una rejilla para poner los portaobjetos las cual no se debía colocar juntas para poder después moverlas.

Posterior se coloca un papel filtro cortados en cuadros que cubra la zona donde se colocó la gota de la muestra en cada portaobjeto, una vez colocado el papel filtro se destapa los tres colorantes que se iban a poner que son la fucsina, el alcohol y el azul de metileno. Ya teniendo los colorantes se procede a colocar primero la fucsina en toda la placa, fucsina se la deja actuar por 5 minutos, tiempo adecuado para que este colorante entre en el bacilo y se fije en sus lípidos, durante ese tiempo hay que flamear por debajo de las placas a todos los portaobjetos hasta observar tres emisiones de vapor en cada placa hay que tener en cuenta que no se debe dejar secar el papel filtro porque se puede quemar y tampoco hacer hervir la fucsina porque podría matar al bacilo y obtener de esta una mala tinción.

Una vez que ha pasado los 5 minutos del flameo se prosigue a sacar el papel filtro de todas las placas con la ayuda de una pinza y colocando en un envase de desecho, esas placas se la pone a cada en agua para que se lave el exceso de fucsina pero no abrir demandado la llave, sino un poquito y que no caiga directo en la mitad donde esta muestra si no de un lado, lavando de los dos lados, luego se coloca las placas en el mismo lugar y procede a colocar en cada placa alcohol acido durante un minuto, así mismo pasado el tiempo se procede a lavar con un chorro mínimo.

Las placas lavadas se las vuelve a poner en el lugar donde estaban y posterior se realiza la última tinción con azul de metileno y este colorante es colocado en todas las placas en su totalidad dejando que actúe durante un minuto, culminado el tiempo se la lava teniendo cuidado como las anteriores y se las coloca en un soporte para portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente, para luego ser observadas a microscopio.

Lectura de placas

Una vez secas las placas se las lleva a microscopio y debemos ver si se cumple con los dos objetivos, el primero determinar si en el extendido encontramos BAAR y el segundo cuantificar aproximadamente la riqueza de bacilos, para la respectiva observación al microscopio se realizó una limpieza a los lentes, ya limpiados se coloca la placa en el microscopio y se observa con la ayuda del lente 40x para ver si presentaba un color rojizo y si presentaba se aumentaba el lente 100x colocando en la mitad de la placa una gota de aceite de inmersión, observando de arriba abajo y de izquierda a derecha, y si encontramos como un bastoncito de color fucsina el resultado es positivo y si encontramos todo azul el resultado es negativo. Sin olvidar que al terminar la revisión de la placa de debe limpiar con un paño el lente para realizar la otra observación.

Diagnóstico molecular PCR-LAMP

LAMP es una técnica de ciclado automático cuya reacción es relativamente rápida, capaz de amplificar masivas copias de ADN (10⁹ - 10¹⁰) a partir de un pequeño fragmento, en un límite de tiempo de hasta una hora requiriendo una sola temperatura (isotérmica) y única enzima ADN polimerasa.

Para la técnica de PCR-LAMP se utilizaron los primers Forward interno MbFIP: 5' GGAAGGCGTCATGACCAAACCATTAATGTGCGAGCTGAGCG 3' y Reverse interno MbBIP: 5' GCCTACAACGGCGCTCTCCATTGACCAGCTAAGATATCCGG 3'; Forward externo MbF3: 5' TTCCGAATCCCTTGTGAAGT 3' y Reverse externo MbB3: 5' CCCGTAGCGTTACTGAGAA 3'.

Con este método diagnóstico se logra determinar la presencia de Micobacterias (sean típicas o atípicas), bacilos del complejo Mycobacterium tuberculosis (MTCB) y además el M. bovis. Para ello se efectúa el siguiente proceso:

Extracción de ADN. – El ADN genómico es obtenido a partir de las colonias positivas aisladas en los medios de cultivo OK y ST.

Diseño de primers LAMP. – Los primers o cebadores LAMP se diseñan en base al gen o secuencia específica que se desee amplificar, esto es posible por la disponibilidad del

software en línea Primer Explorer V4 que genera los conjuntos de cebadores en función de la secuencia objetivo (el gen específico de *M. bovis* es el gen mpb70; número de acceso de GenBank: EU683971).

Los conjuntos de cebadores que emplea LAMP son cuatro esenciales, Forward interno (FIP) y Reverse interno (BIP) y, dos externos: Forward (F3) y Reverse (B3), usados para identificar 6 regiones diferentes de un mismo ADN objetivo, lo que hace que sea altamente específico. Adicionalmente se puede emplear de manera opcional, los llamados cebadores de bucle: cebador de bucle hacia adelante (LF) y cebador de bucle hacia atrás (LB), que permiten acelerar la reacción y aumentar la sensibilidad al reconocer hasta 8 regiones diferentes de secuencia diana en total.

Los conjuntos de primers diseñados en este trabajo fueron tres, el primer o cebador 1 tiene como función reconocer si existe la presencia de Micobacterias, el primer 2 para conocer si pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y el primer 3 para estimar la presencia de *M. bovis*.

Desnaturalización. - Se coloca en un microtubo una porción de muestra y se la mezcla con el primer respectivo. Luego se realiza la desnaturalización, para ello se calienta en el termociclador a la mezcla a una temperatura de 96 °C durante 5 minutos para que se realice la separación de la doble cadena de ADN.

Alineamiento. – En esta etapa los primers se unen a un pequeño fragmento de ADN.

Elongación. - Es la etapa donde la hebra de ADN se alarga al agregar nuevos nucleótidos por la acción de la polimerasa. Para esto se agrega la polimerasa en cada microtubo y a continuación se los coloca en el termociclador a una temperatura de 60° C durante 60 minutos para posteriormente realizar la electroforesis.

Método de visualización. – Se aplica la electroforesis, la cual consiste en separar grandes moléculas (ácidos nucleicos) en un campo eléctrico, para esto se prepara un gel sea de agarosa o de acrilamida y se agrega bromuro de etidio que al unirse al ADN permite la visualización de amplicones en forma de bandas en una foto digital cuando es expuesto a la luz ultravioleta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFONÓDULOS ALTERADOS EN ANIMALES MUESTREADOS

Del total de 151 animales que fueron faenados, 15 animales fueron sometidos a análisis correspondiente para corroborar que tengan tuberculosis bovina, llegando obtener 90,1% sin alteración y 9,9% con alteración en los ganglios linfáticos.

Tabla 5. Proporción de población bovina inspeccionada según la presencia de alteraciones compatibles con Tuberculosis bovina

Inspección Macroscópica		
	Frecuencia	Porcentaje
Sin alteración	136	90,1
Con Alteración	15	9,9
Total	151	100,0

La frecuencia de canales de abasto con la sospecha de infección a *Micobacteria* de 151 animales, se obtuvieron 15 ganglios alterados macroscópicamente a *Mycobacterium bovis*, correspondiendo al 10% total de las muestras, mientras que Mora (2018) (45) manifiesta que de 2178 bovinos recogió 50 ganglios alterados correspondiendo al 3% total de muestras, asimismo Mora dice que (Rèbak, et al, 2005) que en 4769 cabezas de ganado obtuvieron 276 muestras con lesiones macroscópicas a *Mycobacterium bovis* que corresponde a 6% del total de la muestra teniendo un resultado similar.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE PRESENCIA DE BACILOS ALCOHOL-ÁCIDO RESISTENTE (BAAR), COMO CAUSA DE LAS LESIONES GANGLIONARES

De los 15 animales que se realizaron los análisis por el método de bacilos alcohol-acido resistentes después de efectuar la tinción de Zielh-Neelsen en las colonias de los medios de cultivo como *Stonebrink* (ST) y *Ogawa kudoh* (OK), la tabla 6 indica que, de las 15 muestras, 4 resulto positivo a BAAR que corresponde al 26.7%, y dando como negativo a 11 muestras obteniendo el 73.3% a BAAR

Tabla 6 Resultados de baciloscopia de colonias aisladas de los medios de cultivo *Stonebrink* y *Ogawa kudoh*

Baciloscopia BAAR/ Medio ST Y Ok	
	Frecuencia
Negativo	11
Positivo	4
Total	15

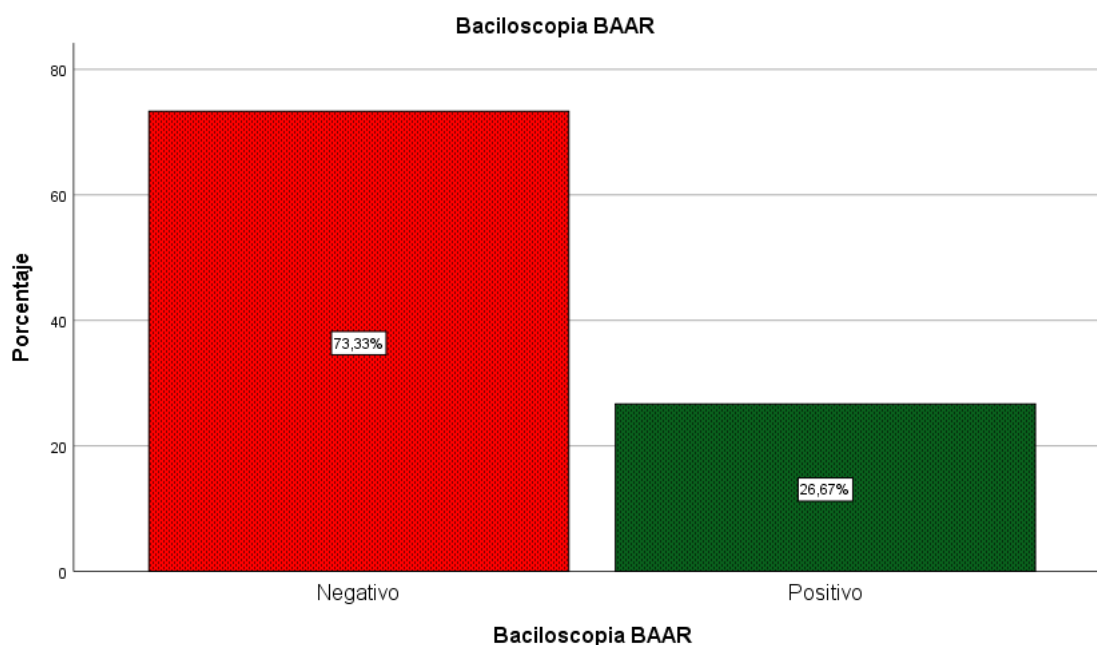


Figura 5 Porcentaje de baciloscopia de colonias aisladas de los medios de cultivo *Stonebrink* y *Ogawa kudoh*

En el estudio que se realizó de tuberculosis bovina, empleando el método BAAR de los ganglios de 151 bovinos, en 15 animales se observó alteraciones demostrando un resultado de 26.7% positivo y 73.3% negativo representando una porción de 4 y 11 respectivamente, mientras Cruz (2019) (46) de 225 animales, 62 muestras fueron llevadas a laboratorio dando un resultado de 27 muestras positivas a BAAR representando el 43.5% y negativo 35 muestras representando el 56,5% en los análisis de baciloscopia. Asimismo, llegando a una similitud con el resultado en el cultivo de *Stonebrink* donde hubo más crecimiento llegando a tener Cruz 16 positivos y en OK 12, mientras que en mi investigación 3 crecieron en ST y 1 en OK.

4.3. DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA DE MYCOBACTERIUM BOVIS POR EL MÉTODO DE PCR-LAMP

Tabla 7 Resultados obtenidos del aislamiento de colonias positivas en los medios de cultivos OK y ST sometidas a la técnica de PCR – LAMP.

PCR-LAMP			
PRIMERS	Positivo	Negativo	%
Mycobacterium spp	2	149	1.32
M. tuberculosis	-	151	0
M. bovis	-	151	0

La tabla 7 nos indica que los resultados obtenidos después de aplicar la técnica de PCR-LAMP a las colonias aisladas que resultaron positivas a bacilos aplicando la técnica de coloración Ziehl Neelsen que fueron sembrados en los medios de cultivo Ogawa Kudoh y Stonebrink, en donde se obtuvo el 1.32 % de positividad para micobacterias atípicas y el 0% tanto para M. tuberculosis y M bovis

4.4. ASOCIACION ESTADISTICA

4.4.1. Variable Raza

De las 15 muestras que se realizó por alteraciones de linfonódulos, el 100% fueron mestizas

Tabla 8 Presencia de tuberculosis bovina de acuerdo con la raza

RAZA DE BOVINOS

RAZA	MUESTRA	%	RESULTADOS DE PCR -LAMP	
			<i>Mycobacterium spp</i>	<i>M.bovis</i>
MESTIZA	15	100	1.32%	0%
TOTAL	15	100	1.32%	0%

En los animales muestreados el total 151 bovinos en el cantón Pasaje se obtuvo 15 animales representando una prevalencia de 26,7% positivo a BAAR, destacando que hubo el 100% raza mestiza de los 15 animales muestreados, mientras Cushicondor (2014) manifiesta que en la investigación realizada en los cantones Mejía, Santo Domingo de Tsachilas, Rumiñahi y Quito el mayor porcentaje fue en bovinos europeos representando el 56%, en bovinos Cebuinos representa 26% y en raza Mestiza llegó a tener 18%.

4.4.2. Variable Edad

Del total de 15 animales que fueron muestreados por presentar alteraciones de linfonódulos, el 33.3% corresponden a animales de 3-4 años, el 46.7% corresponden a bovinos de 5-6 años y el 20% de los animales están entre los 7-8 años.

Tabla 9 Presencia de tuberculosis bovina de acuerdo con la edad de los animales

RESULTADOS DE PCR -LAMP

EDAD	%		
		<i>Mycobacterium spp</i>	<i>M. bovis</i>
3-4 años	33.3	0%	0%
5-6 años	46.7	0.66%	0%
7-8 años	20	0.66%	0%
TOTAL	100	1.32%	0%

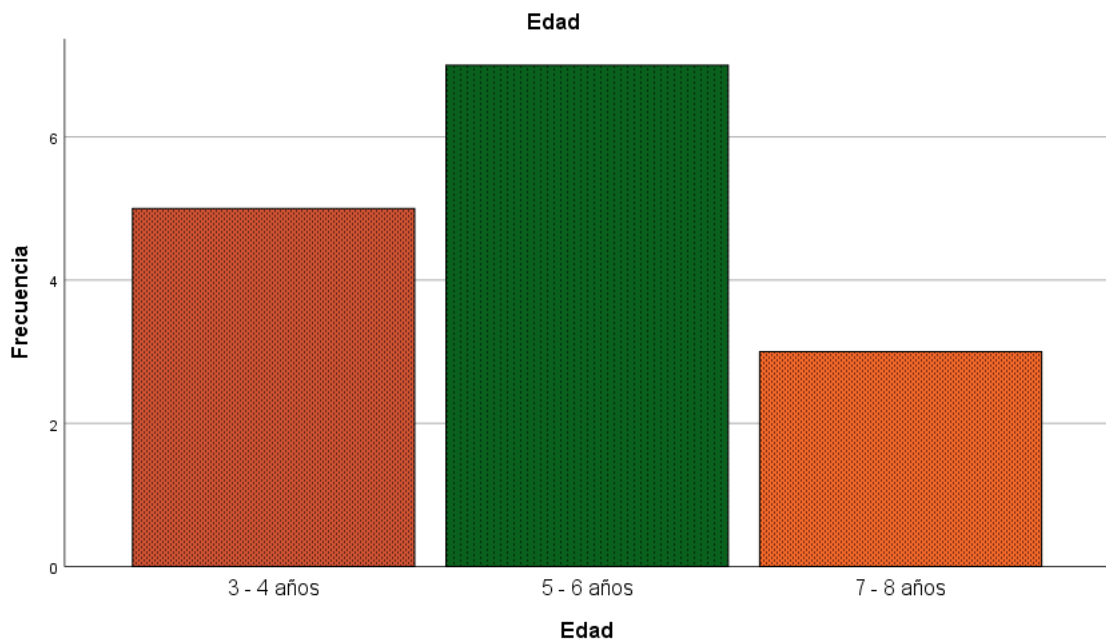


Gráfico 1 Edad de los animales muestreados

En los animales muestreados el total 151 bovinos en el cantón Pasaje se obtuvo 15 animales con alteraciones de linfonódulos representando una prevalencia de 26,7% positivo a BAAR, destacando que el mayor porcentaje de los animales analizados fueron 5-6 años correspondiendo al 46,7%, siguen los bovinos que tienen 3-4 años que fueron 5 correspondiendo al 33.3%, finalizando los animales que tuvieron 7-8 años que eran 3 obteniendo el 20%, mientras que Cushicondor (2014) manifiesta que de 395 animales llegaron 2-6 con alteraciones correspondiendo al 80%, siguiendo a los bovinos que tuvieron menor de 2 años teniendo 9%, terminando con animales mayor a 6 años llegando a 6%

4.4.3. Variable Sexo

Del total de 15 animales que se realizaron los análisis por alteración de ganglios linfáticos observados en el faenamiento, 6 fueron machos teniendo un 40% y hembra 9 corresponden al 60%

Tabla 10 Presencia de tuberculosis bovina de acuerdo con el sexo del animal

SEXO DE BOVINOS

SEXO	MUESTRA	%	RESULTADOS DE PCR -LAMP	
			<i>Mycobacterium spp</i>	<i>M. bovis</i>
MACHO	6	40	0%	0%
HEMBRA	9	60	1.32%	0%
TOTAL	15	100	1.32%	0%

En los animales muestreados el total en el cantón Pasaje se obtuvo 15 bovinos representando una prevalencia de 26,7 positivo a BAAR, donde se encontró que el 60% eran hembras y el 40% machos, mientras que Cushicondor (2014) señaló que en el cantón Mejía en una población de 395 bovinos llegó a tener un 75% hembras y 25% machos así mismo (Ramos, 2017) señaló que de 269 animales que realizó los análisis el mayor porcentaje en sexo fue de hembras teniendo un total de 91% y machos 9%, llegando a una conclusión que las investigaciones el mayor porcentaje en fue en hembras.

4.4.4. Variable Procedencia

Del total de 15 animales que se hicieron los análisis de los linfonodos alterados, 5 bovinos pertenecen a Daliche correspondiente a 33.3%, 4 animales son del sitio de Gualaquiza correspondiente al 26.6%, 3 animales pertenecen al Aguacate con 20% y Pasaje, Chilla y La Vega 1 animal por cada lugar correspondiendo al 6.7 % por cada bovino.

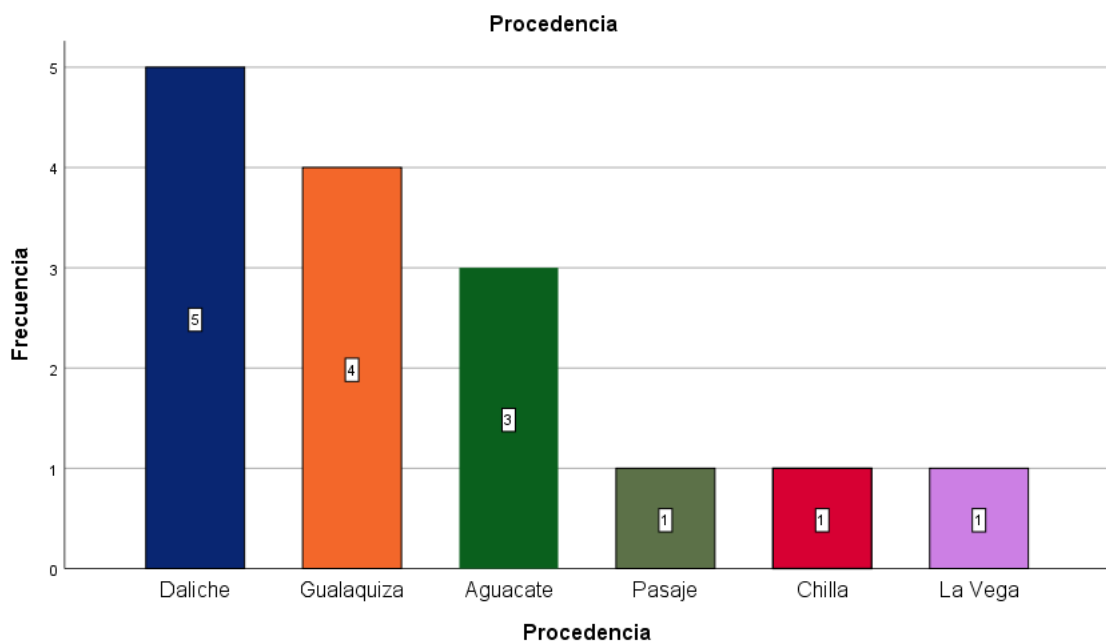


Gráfico 2 Presencia de tuberculosis bovina respecto al lugar de la procedencia

Tabla 11 Presencia de tuberculosis bovina respecto al lugar de la procedencia

PROCEDENCIA	%	RESULTADOS DE PCR -LAMP	
		<i>Mycobacterium spp</i>	<i>M. bovis</i>
DALICHE	33.3	0%	0%
GUALAQUIZA	26.6	1.32%	0%
AGUACATE	20	0%	0%
PASAJE	6.7	0%	0%
CHILLA	6.7	0%	0%
LA VEGA	6.7	0%	0%
TOTAL	100	1.32%	0%

En el estudio de tuberculosis bovina, empleando la prueba de BAAR que llegaron de los diferentes cantones, demostró un resultado del 1.32% positivos al cantón de Gualaquiza a *mycobacterium* atípica, total de la muestra de 4 bovinos; en comparación a Cruz y Pozo (2019) que obtuvo de 6 muestras, 3 en el cantón Daule que corresponde al 50%, siguiendo El Empalme con 2 obteniendo el 33.3% y Buena Fe 1 muestra adquirida teniendo el 16.7%

5. CONCLUSIONES

La prevalencia de Tuberculosis Bovina en el cantón Pasaje a nivel de camal es del 0%. Sin embargo, existe la presencia del 1.32% de Mycobacterium atípicas

Mediante el análisis patológico macroscópico se determinó que el 9.93% presentaron lesiones en la cadena ganglionares tanto en el color como en su tamaño, considerando alteraciones similares a las que provoca la enfermedad.

Mediante el estudio microbiológico en los medios de cultivo Ogawa Kudoh y Stonebrink se obtuvo el 26.67% de positividad para bacilos ácidos alcohol-resistente (BAAR). Por lo que es la causa de las lesiones de los linfonodos.

Mediante la técnica de PCR- LAMP existe el 0% de prevalencia de Tuberculosis Bovina.

Los resultados obtenidos en el análisis de las variables son las siguientes: En cuanto a la variable raza todos los animales que se faenaron su 100% son de razas mestizas. La variable sexo según los análisis se obtuvo el 1.32% en hembras y 0% en machos. En cuanto a la edad se obtuvieron los datos según rangos, donde el 0.66% en bovinos de 4-6 años de edad, al igual que el 0.66% en bovinos de 6-8 años de edad y el 0% en edades de 2- 4 años y de 8-10 años. Por lo que las mayores positividades a M. atípicas están en los bovinos hembras con edad de 5 a 7 años. Con respecto a la procedencia se obtuvo 1.32% de la ciudad de Gualaquiza. Datos obtenidos de las muestras positivas a Mycobacterium atípicas. Por lo que según los resultados obtenidos ninguna de las variables es positiva a M bovis. Por lo que no se puede establecer la prevalencia de TBB en las variables de estudio.

6. RECOMENDACIONES

Dialogar con las autoridades que estén a cargo de revisar las ganaderías para que puedan intervenir en campañas y en capacitaciones para poder controlar la enfermedad como la tuberculosis bovina, para así poder procurar y erradicar esta enfermedad para que estén libres de tuberculosis.

Confirmar a través de diagnósticos moleculares como PCR y PCR – LAMP y así estar seguros que realmente el animal es portador para tomar las acciones pertinentes. Además de sistematizarlas como herramientas diagnosticas para los sistemas de vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

Si observamos animales positivos a esta enfermedad tenemos obligatoriamente que sacrificarlos y decomisarlos e inclusive hacer la cremación, ya que esta enfermedad es altamente zoonótica

Recomendar a todas las haciendas o ganaderías que producen leche, que esta debe ser pasteurizada con el propósito de controlar y evitar problemas a futuro por esta enfermedad y así mejorar la bioseguridad de la ganadería

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez Odio A, Polanco RP, Marrero IG, Toirac Proenza R, Riquenes Garlo-Bo Y, Rodriguez Coipel Y, et al. Mycobacterium bovis: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria Mycobacterium bovis: realities and challenges for the veterinary biopharmaceutical industry. Rev Bionatura [Internet]. 2009;34–9. Available from: <http://revistabionatura.com/files/tuberculosis.pdf>
2. Domínguez-Odio A, González-Marrero I, Toirac-Proenza R, Rodríguez-Coipel Y. Prevención y diagnóstico veterinario de la tuberculosis bovina. Una revisión de las tendencias globales. Spei Domus [Internet]. 2019;12(25). Available from: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/2524-Texto del artículo-6361-3-10-20190530.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/2524-Texto%20del%20artículo-6361-3-10-20190530.pdf)
3. Ramos N. Determinación de prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de hatos ganaderos en la parte baja de la provincia del Oro [Internet]. Universidad Tecnica de Machala; 2017. Available from: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11718/1/DE00014_TRABAJODETITULACION.pdf
4. Souza MA de, Bombonato NG, Soares PM, Ramos GB, Santos MP dos, Ganda MR, et al. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. Arq Inst Biol (Sao Paulo) [Internet]. 2014;81(4):363–7. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/aib/v81n4/0020-3653-aib-81-04-0363.pdf>
5. Marchetti A. Prevalencia de tuberculosis bovina en haciendas ganaderas de parroquia Tulcan del Canton Tulcan [Internet]. Universidad Politecnica Estatal de Carchi; 2019. Available from: [http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/830/1/361 Prevalencia de tuberculosis bovina en haciendas ganaderas de la parroquia tulcan del canton tulcan.pdf](http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/830/1/361%20Prevalencia%20de%20tuberculosis%20bovina%20en%20haciendas%20ganaderas%20de%20la%20parroquia%20tulcan%20del%20canton%20tulcan.pdf)
6. Paccha D. Diagnóstico de tuberculosis bovina, por medio de la prueba cervical

- comparativa en hembras bovinas de la hoya de Loja [Internet]. Universidad Nacional de Loja; 2012. Available from: [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5399/1/TESIS Darwin Aurelio Paccha Paccha DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA,.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5399/1/TESIS%20Darwin%20Aurelio%20Paccha%20Paccha%20DIAGN%C3%93STICO%20DE%20TUBERCULOSIS%20BOVINA.pdf)
7. Paillacho PG. Prevalencia De Tuberculosis Bovina En La Parroquia Santa Martha De Cuba Del Cantòn Tulcán [Internet]. Universidad Politecnica Estatal de Carchi; 2015. Available from: [http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/468/1/292 prevalencia de tuberculosis bovina en la parroquia santa martha de cuba del caton tulcan.pdf](http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/468/1/292%20prevalencia%20de%20tuberculosis%20bovina%20en%20la%20parroquia%20santa%20martha%20de%20cuba%20del%20caton%20tulcan.pdf)
 8. Proaño-Pérez F, Benítez-Ortiz W, Portaels F, Rigouts L, Linden A. Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal* [Internet]. 2011;30(3):279–86. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/9451>
 9. Iturra L. Evaluación Del Impacto Económico De La Erradicación De Tuberculosis Bovina En Predios Lecheros Infectados [Internet]. Favet. Universidad de Chile; 2016. Available from: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140651/Evaluacion-del-impacto-económico-de-la-erradicacion-de-tuberculosis-bovina-en-predios-lecheros-infectados.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 10. Suquilanda R. Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB), en el cantón Loja mediante inspección post mortem en el camal frigorífico de Loja. 2015; Available from: [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10242/1/TESIS- Rober Luciano Suquilanda Ludeña.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10242/1/TESIS-Rober%20Luciano%20Suquilanda%20Ludeña.pdf)
 11. Vendrame FB, Amaku M, Ferreira F, Telles EO, Filho JHHG, Gonçalves VSP, et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. *Semin Agrar* [Internet]. 2016;37(5):3639–46. Available from: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/27280/19930>
 12. Thoen CO, Kaplan B, Thoen TC, Gilsdorf MJ, Shere JA. Zoonotic tuberculosis. A comprehensive one health approach. *Medicina (B Aires)* [Internet].

2016;76(3):159–65. Available from:
<http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/27295705.pdf>

13. Moura Mikael Arrais Hodon I Paulo Martins Soares Filho I Marina de Azevedo Issa I Ana Paula Ferreira de Oliveira I Antônio Augusto Fonseca Júnior I AI. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR Comparação de nove métodos de extração de DNA para dia. *Ciência Rural* [Internet]. 2016;46746(7):1223–8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n7/1678-4596-cr-46-07-01223.pdf>
14. Flor Flores C, Alfredo Delgado C, Armando González Z, Hermelinda Rivera G. Determinación de la presencia de tuberculosis bovina en la provincia de canta, Lima. *Rev Investig Vet del Peru* [Internet]. 2005;16(1):65–70. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6634/1/T-UCE-0014-010.pdf>
15. Balseiro Morales A, Gortázar Schmidt C. Tuberculosis animal: investigación y control en España [Internet]. Morales A, Gortazar C, editors. España; 2015. 162 p. Available from: <http://www.serida.org/pdfs/6345.pdf>
16. Leal-Bohórquez AF, Castro-Osorio CM, Wintaco-Martínez LM, Puerto-Castro GM, Villalobos R. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in workers of bovine tuberculosis sanitation farms in Antioquia, Boyacá and Cundinamarca. *Rev Salud Publica* [Internet]. 2016;18(5):727–37. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v18n5/0124-0064-rsap-18-05-00727.pdf>
17. Amasino C. Enfermedades infecciosas de los animales y zoonosis [Internet]. Vol. 1, Edulp. La Plata; 2017. 220 p. Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/63694>
18. Armendariz E. Identificación de lesiones anatomopatológicas en hígado de bovinos decomisados en la empresa pública Metropolitana de Rastro Quito [Internet]. Universidad de las Américas; 2016. Available from: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/5249/5/UDLA-EC-TMVZ-2016->

03.pdf

19. Cushicondor D. Prevalencia de tuberculosis bovina mediante inspeccion post mortem y cultivo bacteriologico en el matadero municipal del canton Mejia (Pichincha). Universidad Central del Ecuador; 2014.
20. Good M, Duignan A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Vet Med Int* [Internet]. 2011;2011. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/410470/>
21. Bolaños CAD, de Paula CL, Guerra ST, Franco MMJ, Ribeiro MG. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: An overview. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2017;59:1–13. Available from: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4982/1/T-ESPE-033021.pdf>
22. Garro C, Abdala A, Garbaccio S, Spath E, León E, Paolicchi F. Factores de riesgo de tuberculosis bovina en rodeos lecheros de las provincias de Córdoba y Santa Fe. *Rev Argentina Prod Anim* [Internet]. 2010;30(2):167–78. Available from: <http://pdfs.semanticscholar.org/bf68/a6955ec47be4058ad2c9a390a40ee2e09cf1.pdf>
23. Ramos DF, Silva PEA, Dellagostin OA. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Braz J Biol* [Internet]. 2015;75(4):830–7. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v75n4/1519-6984-bjb-1519-698423613.pdf>
24. Garro C, Morris W, Delgado F, Garbacci S. Tuberculosis Bovina en terneros. 2011;XXVIII:1–10. Available from: <https://www.veterinariargentina.com/revista/2011/04/tuberculosis-bovina-en-terneros/>
25. Chamizo E. Tuberculosis Bovina. 2019;1. Available from: <https://rcta.unah.edu.cu/index.php/ACUNAH/article/view/1177>
26. Ruiz SG, Alarcón GJC, Rodríguez-Hernández E, Villalba SF, Ponce SIR, Suazo FM. Natural resistance to tuberculosis infection in cattle. Review. *Rev Mex Ciencias Pecu* [Internet]. 2018;9(2):328–45. Available from:

<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v9n2/2448-6698-rmcp-9-02-328.pdf>

27. González López R, Olguin Y Bernal AF, Bedolla de Alba MA, Ruiz Romero RA. Reticulitis traumática y linfadenitis granulomatosa como posibles etiologías del síndrome de indigestión vaginal en un bovino adulto. *Clínica Vet abordaje diagnóstico y Ter* [Internet]. 2019;5:1–17. Available from: <http://132.248.200.11/index.php/Clinica-Veterinaria/article/view/37>
28. Flores H. Prevalencia y pérdidas económicas provocadas por tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en una planta faenadora de la Región de Los Lagos, 2006-2010. *Bol Vet Of SAG* [Internet]. 2012;14:1–16. Available from: https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_15_I_semestre_2012/articulos_PDF/regiones/prevalencia_TB_tesis_HFlores.pdf
29. Fell S, Bröckl S, Büttner M, Rettinger A, Zimmermann P, Straubinger RK. Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of *Mycobacterium-tuberculosis-complex* members in cattle and red deer tissue samples. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–15. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-016-0816-2>
30. Zelanda N, Riding N, Manitoba M De. Tuberculosis bovina. 2010;1–7. Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovine_tuberculosis-es.pdf
31. Echeverría GA. Escuela Politécnica Del Ejército Elaborado Por. Escuela Politecnica del Ejecito; 2011.
32. Arcelles M, Delgado A, Alzamora C, Manchego A, Gavidia C. Prevalencia de tuberculosis bovina en el distrito de Vegueta, Huaura. *Rev Investig Vet del Peru* [Internet]. 2005;16(2):154–7. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v16n2/a07v16n2.pdf>
33. Delgado C. A, González Z. A. Evaluación De La Prueba De Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (Elisa) En El Diagnóstico De La Tuberculosis Bovina. *Rev Investig Vet del Perú* [Internet]. 2014;11(2). Available from: https://www.researchgate.net/profile/Alfredo_C/publication/273335972_Evaluacion_de_la_prueba_de_inmunoabsorbancia_ligada_a_enzimas_Elisa_en_el_diag

nostico_de_la_tuberculosis_bovina/links/5c546906458515a4c750158b/Evaluacion-de-la-prueba-de-inmunoabsorbanci

34. Rivera P, Francisco J, Las VDE, Diagnósticas P, Tuberculosis P, Científica R, et al. Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del estado Zulia, Venezuela. 2009;19(6). Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95911621003.pdf>
35. Schiller I, Waters WR, Vordermeier HM, Nonnecke B, Welsh M, Keck N, et al. Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of Mycobacterium bovis-infected cattle. Clin Vaccine Immunol [Internet]. 2009;16(8):1196–202. Available from: <https://cvi.asm.org/content/cdli/16/8/1196.full.pdf>
36. SENASICA. Guía Para El Seguimiento Epidemiológico De La Tuberculosis Bovina [Internet]. 2016. p. 41. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/150601/10_GUIADESEGUIMIENTOEPIDEMIOLOGICO09-07-2015.pdf
37. Suazo FM, Harris B, Thomsen B, Stuber T, Díaz CA, Suárez DG, et al. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Tec Pecu en Mex [Internet]. 2010;48(4):403–15. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v1n4/v1n4a8.pdf>
38. Gates MC, Volkova V V., Woolhouse MEJ. Risk factors for bovine tuberculosis in low incidence regions related to the movements of cattle. BMC Vet Res [Internet]. 2013;9. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1746-6148-9-225>
39. Jojoa-Jojoa J, Maira Wintaco M, Francisco Osorio R, Puerto-Castro G, Guerrero-Guerrero M. First approach to molecular epidemiology of bovine tuberculosis in Colombia. Rev MVZ Cordoba [Internet]. 2016;21(1):5222–36. Available from: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/document.pdf>
40. Martha ZO. “Determinación de tuberculosis (Mycobacterium Bovis) con la prueba

- tuberculina en el área de influencia del cantón el Carmen” [Internet]. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Universidad Tecnics Estatal de Quevedo; 2013. Available from: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/604/1/T-UTEQ-0096.pdf>
41. Sánchez D, Rosadio R. Prevalencia De La Tuberculosis Bovina En La Provincia De. 2002;13(2):100–2. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v13n2/a17v13n2.pdf>
 42. Estrada C, Diaz F, Arriaga C, Villegas N, Pérez R, Gonzales D. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet Mex [Internet]. 2004;35(3):225–36. Available from: https://www.researchgate.net/publication/26505594_Concordancia_de_PCR_y_metodos_rutinarios_para_el_diagnostico_de_tuberculosis_bovina
 43. Maigua E. Prevalencia aparente de brucelosis bovina a través de ELISA indirecto en 48 fincas de los cantones Rio Verde y Quinindé, provincia de Esmeraldas. 2018;26. Available from: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7557/1/139526.pdf>
 44. Sequeria M, Barrera L. Manual para el diagnostico bacteriologico de la tuberculosis. Contemp Psychol A J Rev [Internet]. 2008;15(1):73–73. Available from: <http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopia1.pdf>
 45. Mora L. Determinación de micobacterias spp. En bovinos faenados en el matadero municipal de la ciudad de Guayaquil [Internet]. Universidad Agraria del Ecuador; 2018. Available from: https://doc-00-bg-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/pdf/0lm0rlh231qs5r08sglep0pfjp7er7r1/fclKunalvhu6hvfqj7sagsjgu59eiis1/1583085225000/drive/09317174418622668635/ACFrOgCziawKLF92-Xj2mfHuWOC82mdJ8-8tRt51G6D_cud0tPJpZ74UafnFqFM_pTRNFwdzzoOjMiKMv-g3C8CiHphRBms-nx2_voaTir-rlCB6xCeyv_72hFHmTAeOti2-KSNOpAtD_zyUdoNI?print=true&nonce=hukmc4u60uoie&user=09317174418622668635&hash=tg5ao61pe8utlc6hgs2fgd0t05jar5m0

46. Cruz L, Pozo K. “DIAGNÓSTICO DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS FAENADOS EN EL CAMAL DE DAULE DURANTE EL MES DE NOVIEMBRE DEL AÑO 2018” [Internet]. Universidad de Guayaquil; 2019. Available from: https://doc-0c-bg-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/pdf/0lm0rlh231qs5r08sglep0pfjp7er7r1/sol4dnj6ca14bdeb9omtgkrelce15dqu/1583086875000/drive/09317174418622668635/ACFrOgCCbi3HnzPz9xLleNqHae-MIkltIKWjOMMI0IOBsl5mlTTdjXB_imMy_ld4QljVIFHTnRjygppR0Oc0prnHN5ToH-2H7X51YfT8q3hfjshmVXD9UVdo38BP9GfWgAKllliS667h5TSans6S?print=true&nonce=9hkcljn67caco&user=09317174418622668635&hash=uuaumlqvbolpv n9i0a29dm0kcihtpkjo

8. ANEXOS



Anexo 1: Inspección de ganglios linfáticos alterados



Anexo 2: linfonodos alterados

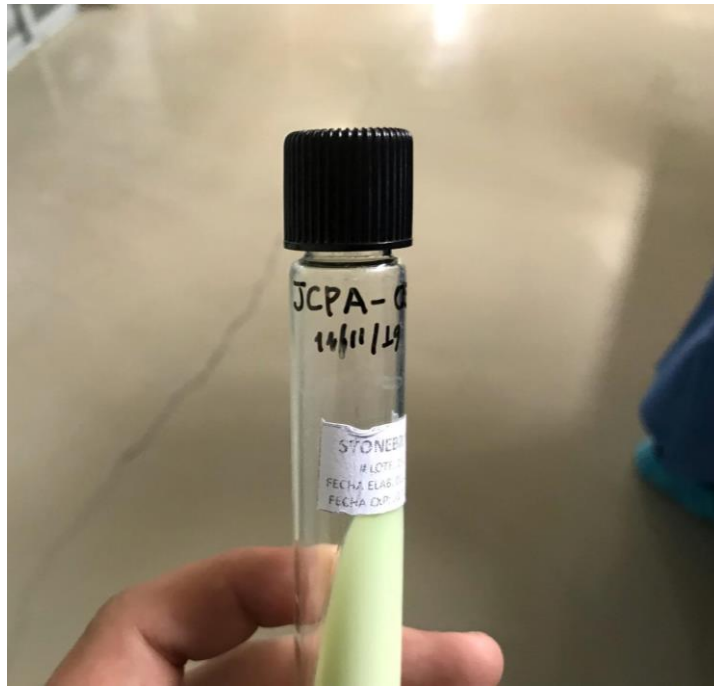


Anexo 3: Ganglio sano

LABORATORIO (INSPI)



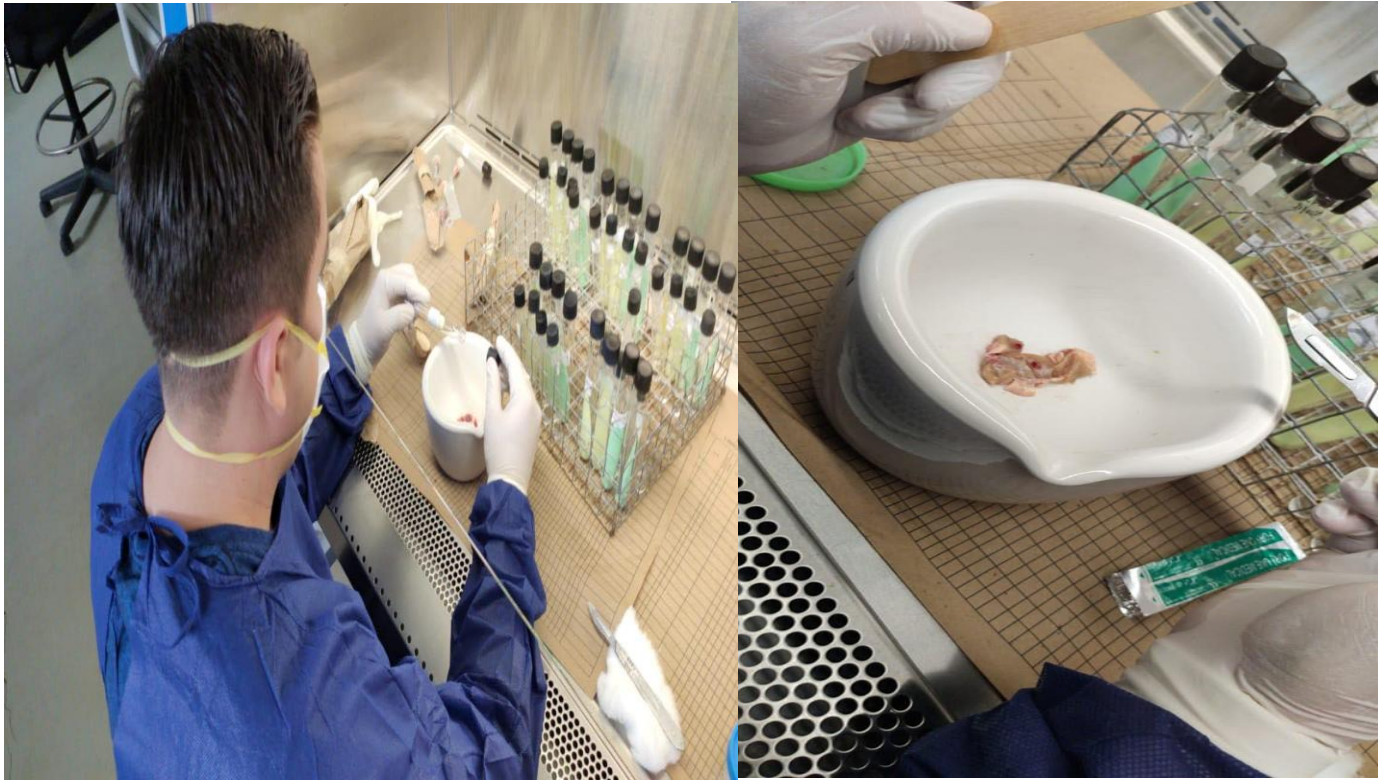
ANEXO 4: Preparación de medios de cultivo ok y st



Anexo 5: Rotulación de tubos



Anexo 6: materiales a utilizar



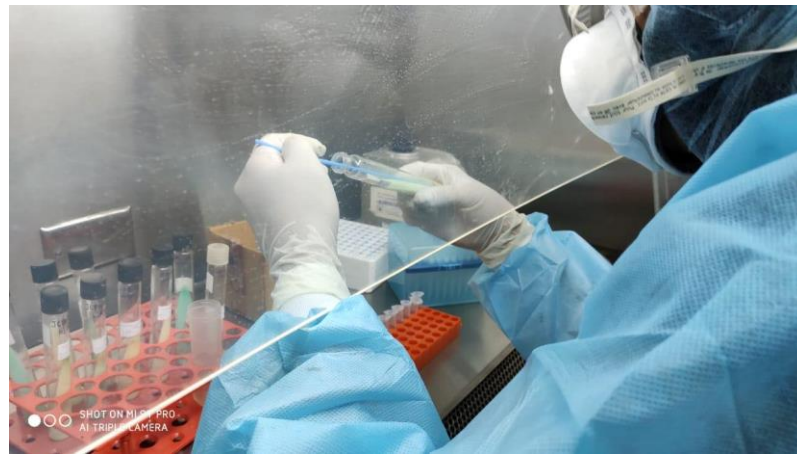
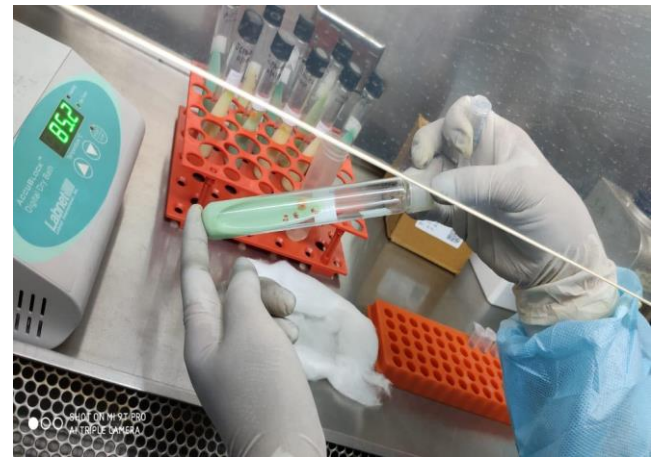
Anexo 7: triturar el ganglio infectado mezclado con agua destilada esteril



Anexo 8: colocación de muestra en medio de cultivo con Isopo



Anexo 9: Lectura de los medios de cultivo durante 4 semanas después de la siembra



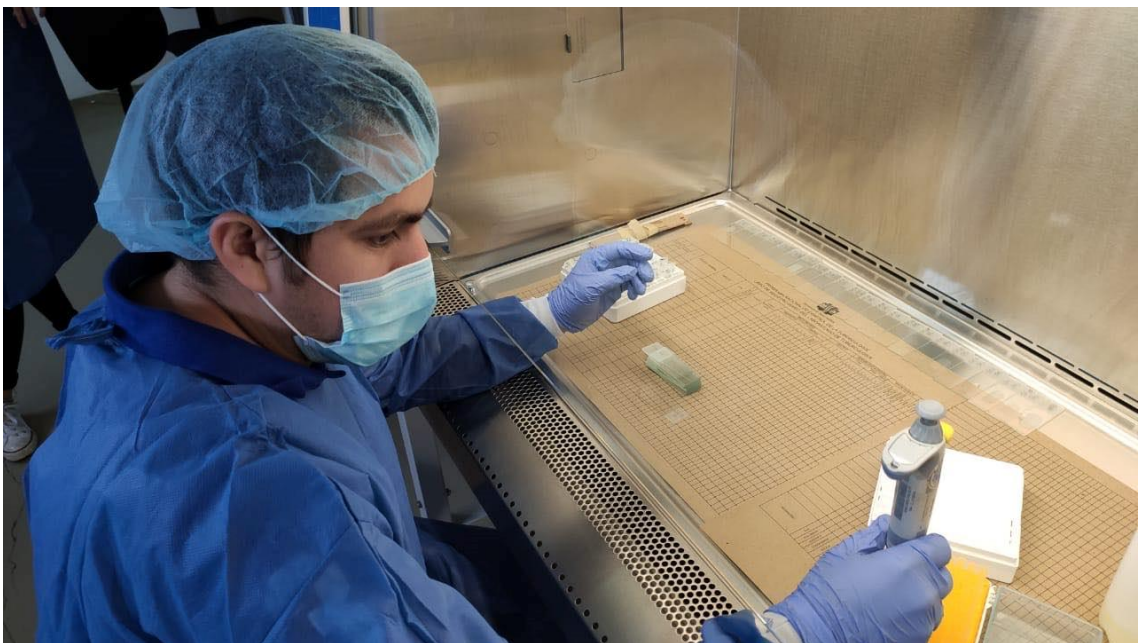
Anexo 10: extracción de las colonias de los medios de cultivo con ayuda de asas descartables



Anexo:11 inactivación de la bacteria



Anexo 12: Rotulación de los portaobjetos



Anexo 12: colocación de una gota de muestras en los portaobjetos y dejar secar al ambiente

TINCIÓN ZIELH NEELSEN



Anexo 13: frascos con fucsina, alcohol acido, azul de metileno



Anexo 14: Ubicación de placas para la respectiva tinción



Anexo 15: Colocación de papel filtro en los portaobjetos



Anexo 16: colocación de la fucsina



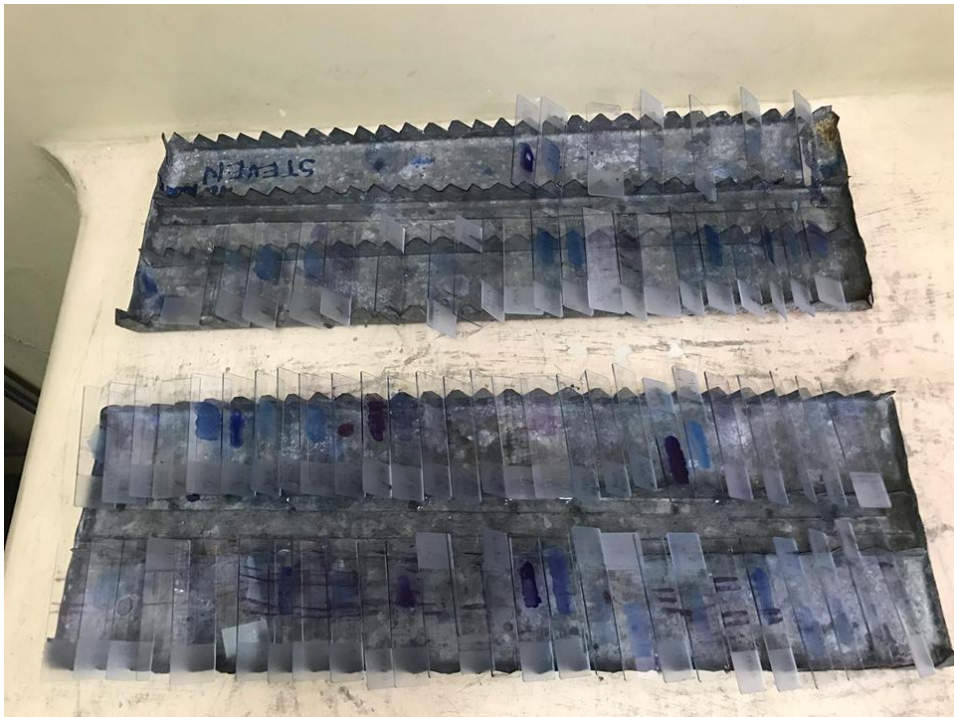
Anexo 17: Flameado por tres minutos o hasta observar tres emisiones de vapor



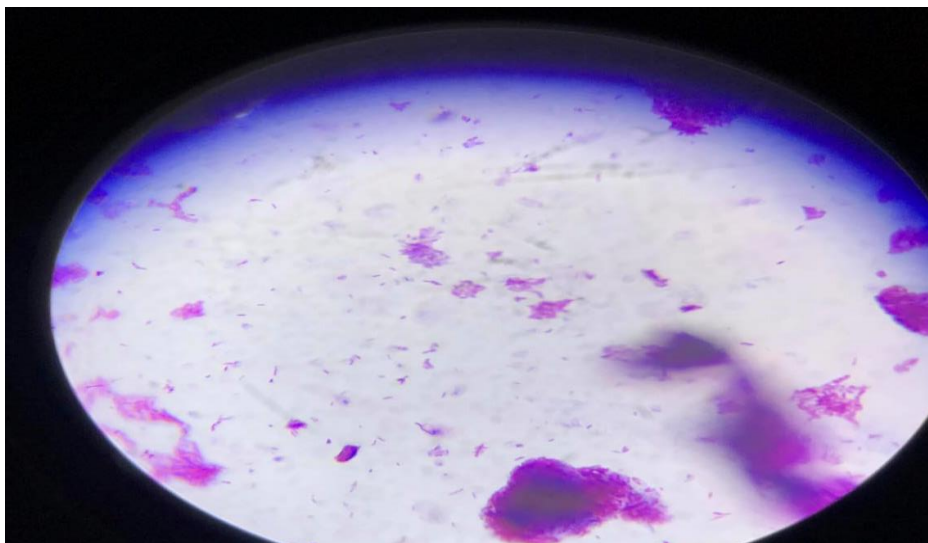
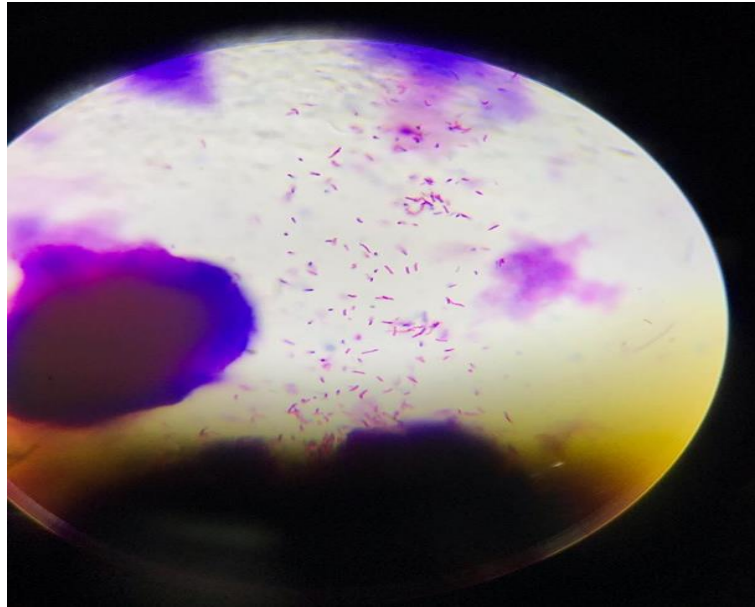
Anexo 18: colocación de alcohol ácido



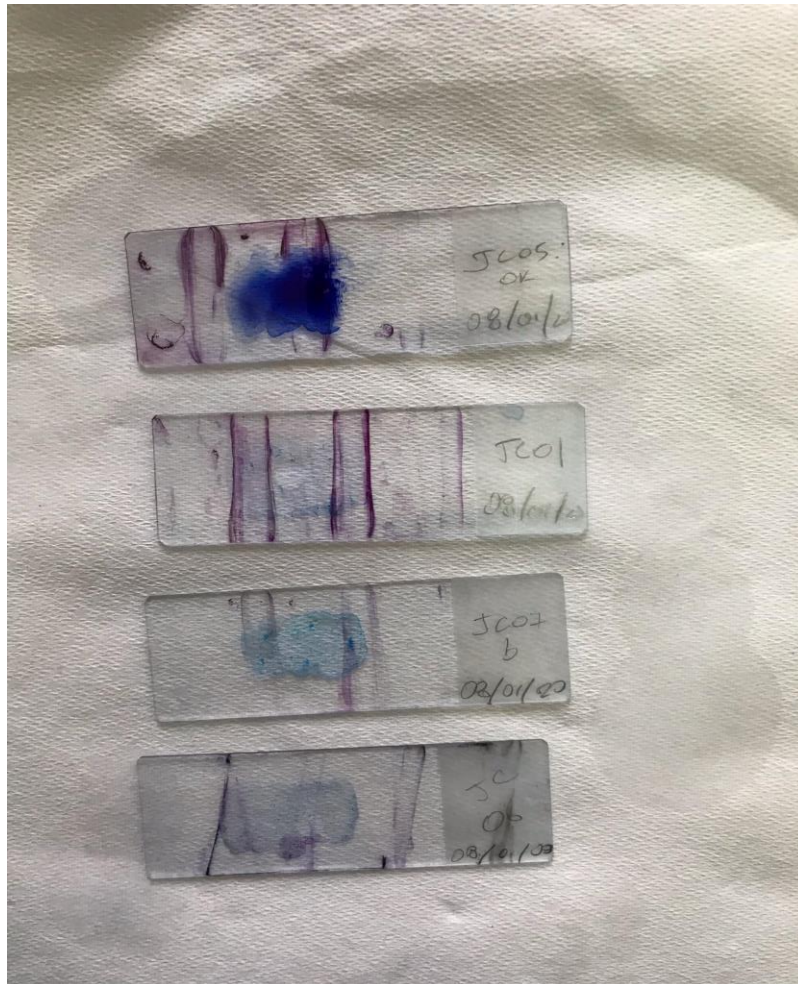
Anexo 19: colocación de azul de metileno



Anexo 20: Se coloca los portaobjetos en una platina para que se sequen al ambiente

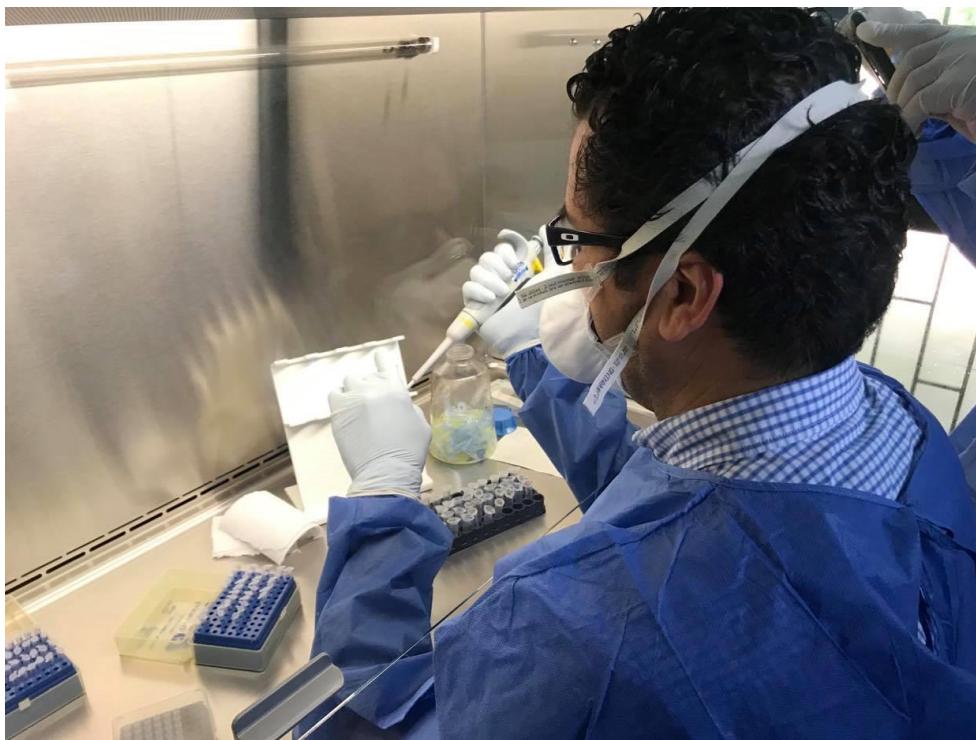


Anexo 21: Examinar al microscopio y observación de BAAR



Anexo 22: placas positivas a *mycobacterium*

PCR-LAMP



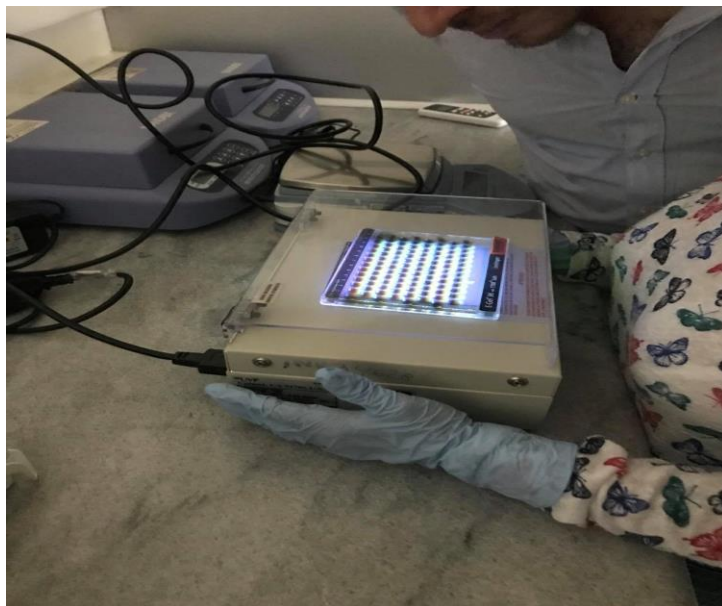
Anexo 23: Clasificación de la muestra en los tres primers



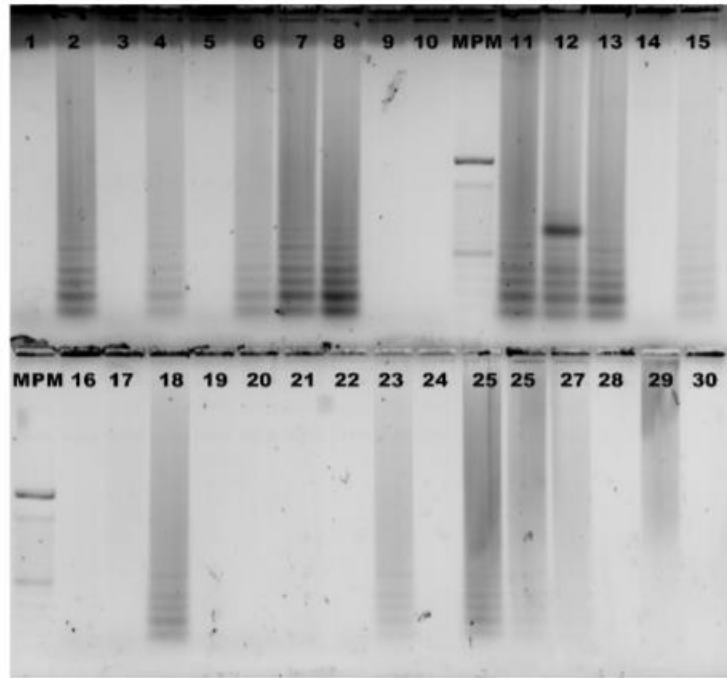
Anexo 24: Ubicación de los primers en el termociclador para que realice el proceso de desnaturalización



Anexo 25: Colocación del bromuro de etidio en las muestras para someterlos a la electroforesis



Anexo 26: Aplicando la electroforesis a las muestras



Anexo 27: Resultados de la electroforesis