UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

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

FIGUEROA BALLADARES CARLOS YORDAN
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 ARENILLAS PROVINCIA DE EL ORO

FIGUEROA BALLADARES CARLOS YORDAN
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 ARENILLAS PROVINCIA DE EL ORO

FIGUEROA BALLADARES CARLOS YORDAN
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

VARGAS GONZALEZ OLIVERIO NAPOLEON

MACHALA, 04 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 ARENILLAS 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.

VARGAS GONZALEZ OLIVERIO NAPOLEON
1101446894
TUTOR - ESPECIALISTA 1

MAZA VALLE WUNSTER FAVIAN
0701791741
ESPECIALISTA 2

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN
0704217348
ESPECIALISTA 3

Machala, 04 de mayo de 2020

Tuberculosis bovina

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%	0%	0%	0%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

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, FIGUEROA BALLADARES CARLOS YORDAN, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado TUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES FAENADOS EN EL CAMAL DEL CANTÓN ARENILLAS 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 dispociones 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, 04 de mayo de 2020

FIGUEROA BALLADARES CARLOS YORDAN
0705597847

Si a alguno de ustedes le falta sabiduría, pídasela a Dios, y él se la dará, pues Dios da a todos generosamente sin menospreciar a nadie

Santiago 1:5

DEDICATORIA

Con mucho cariño y amor le dedico este trabajo a mi madre a la Sra. Mary Balladares Suarez. Por darme su amor, respeto, comprensión y apoyo para lograr una de mis metas.

A todos los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Machala, ya que han aportado con sus conocimientos y experiencias, que lo he aplicado al realizar este trabajo de titulación.

Pues y por ultimo me lo dedico a mí, ya que he puesto todo el esfuerzo, dedicación, responsabilidad, honradez, etc. Para poder llegar a este punto tan importante de mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

Ante todo, darle las gracias infinitas a Dios, por su bondad y misericordia ya que les ha dado un suspiro de vida a todas aquellas personas que han formado parte de este proceso. A mi querida madre que a pesar de todos los inconvenientes que se han presentado siempre estuvo ahí para darme un empujón y seguir adelante.

A mi padre y hermanas por su ayuda incondicional. A todos los docentes que formaron parte de este proceso de aprendizaje en especial al Dr. Oliverio Vargas Mg. Sc, por brindarme su apoyo y tomarme en cuenta para realizar este trabajo de titulación.

A todos mis compañeros que estuvieron compartiendo aulas en todo este proceso, a mis amigos con los que realizamos juntos este trabajo, y en especial a las maruchas que estuvieron desde el día cero.

A la Universidad Técnica de Machala, al personal en cargado del laboratorio de Leptospira en el INSPI por brindar su apoyo, al personal del Camal municipal de Arenillas, y en general a todo aquella institución o persona que me brindó su apoyo.

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 ARENILLAS – PROVINCIA DE EL ORO"

Autor: Carlos Yordan Figueroa Balladares

Tutor: Oliverio N. Vargas G. Mg. Sc.

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una zoonosis bacteriana cuyo agente etiológico es *Mycobacterium bovis*, que forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Afectando al ganado bovino, siendo este su huésped principal, aunque también puede permanecer en reservorios como en animales silvestres, domésticos y en el humano. Esta enfermedad está considerada como una zoonosis dentro de la salud pública y veterinaria, esta bacteria tiene la capacidad permanecer por largo tiempo en el huésped sin presentar sintomatología, convirtiéndose en un proceso crónico, el mismo que se activa por una depresión en el sistema inmunológico del animal; según las estadísticas el humano se contagia por el consumo de productos lácteos no pasteurizados provenientes de animales portadores. En los animales su diseminación es muy rápida debido a que su principal vía de trasmisión es la aerógeno y en los procesos productivos hay una concentración de animales en espacios relativamente reducidos, esta al ser una enfermedad de evolución crónica es difícil su diagnóstico clínico, por lo tanto, se debe recurrir al uso de técnicas complementarias. La presente investigación está encaminada a determinar la prevalencia de tuberculosis bovina, mediante observaciones macroscópicas, cultivos especializados, microscopia y análisis de PCR-LAMP de linfonódulos obtenidos de canales sospechosas

a nivel de camal. El presente trabajo de investigación es de tipo observacional, transversal, prospectivo y analítico. La investigación se la realizo en dos fases una de muestreo y otra el estudio microbiológico con diagnóstico molecular PCR-LAMP. El muestreo se realizó en el camal municipal del Cantón Arenillas durante el mes de noviembre del 2019, con una población de 78 animales faenados provenientes de diferentes lugares del cantón Arenillas e incluso de otros cantones de la Provincia, de los cuales se tomó 16 muestras de animales que presentaron sus ganglios linfáticos infartados semejantes a los que provoca la enfermedad. El estudio microbiológico se lo realizo en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez en el área de Investigación y Zoonosis. La microbiología comprendió la siembras de preparados de linfonódulos en medios de cultivos especializados para *Mycobacterium* siendo los medios: *OGAWA KUDOH* y *STONEBRINK*, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 6 semanas para que así desarrollen las colonias bacterianas para posteriormente realizar Baciloscopia utilizando la tinción de *Ziehl Neelsen* y posteriormente a las colonias positivas a BAAR aplicar la técnica molecular PCR – LAMP, obteniendo los siguientes resultados: De los 78 animales faenados se obtuvo macroscópicamente el 20,5% (16/78) de ganglios pulmonares con lesiones similares a la que provoca la TBB. De las cuales el 43,75% (7/16) fueron positivas a BAAR con la posibilidad de que pertenezcan al complejo mycobacterium, datos obtenidos en el análisis microbiológico. A estas muestras positivas se las sometió a la prueba molecular PCR – LAMP para confirmar los resultados. Todas las muestras positivas según la procedencia pertenecen en su 100% al cantón arenillas, de las muestras positivas según la raza el 100% fueron de raza mestiza, en cuanto a la edad los animales se encuentran en una escala de edad de 4 a 6 años.

Palabras claves: *Mycobacterium bovis*, tuberculosis bovina, zoonótica, Baciloscopia, Linfonodos, *Ogaawa Kudoh*, *Stonebrink*, *Ziehl Neelsen*, LAMP.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a bacterial zoonosis whose etiologic agent is Mycobacterium bovis, which is part of the Mycobacterium tuberculosis complex. This pathology affects cattle, this being its main host, although it can also remain in reservoirs as in wild animals, domestic animals and human beings. This disease is considered a zoonosis in public and veterinary health, this bacterium has the ability to remain in the host for a long time without presenting symptoms, becoming a chronic process, which is activated by a depression in the animal's immune system; according to statistics, the human is infected by the consumption of unpasteurized dairy products from carrier animals. In animals its dissemination is very fast because its main route of transmission is the aerogen and in the production processes there is a concentration of animals in relatively small spaces, this disease has a chronic evolution, and it´s important to say that its clinical diagnosis is difficult, therefore, complementary techniques should be used. This investigation is aimed at determining the prevalence of bovine tuberculosis, through macroscopic observations, specialized cultures, microscopy and PCR-LAMP analysis of lymph nodes obtained from suspicious animals at the slaughterhouse. This research work is observational, transversal, prospective and analytical. The research was carried out in two phases, one sampling and the other the microbiological study. The sampling was carried out in the municipal slaughterhouse of Arenillas during November 2019, with a population of 78 animals slaughtered from different places of the Arenillas canton and even from other cantons of the Province, from which 16 samples were taken from animals that presented their infarcted lymph nodes with lesions similar to those caused by the disease. The microbiological study was carried out at the National Institute of Public Health Research (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez in the Research and Zoonosis area. The microbiology included the seeding of lymph node preparations in specialized culture media for Mycobacterium, in culture media like OGAWA KUDOH and STONEBRINK, they were incubated at a temperature of 37 ° C for 6 weeks and until the Mycobacterium colonies were developed to perform bacilloscopy using Ziehl Neelsen staining and subsequently to Mycobacterium-positive colonies apply the PCR- LAMP technique, obtaining the following results: Of the 78 animals slaughtered, 20.5% (16/78) of pulmonary nodes with lesions similar to that caused by TBB are obtained

macroscopically. Of which 43.75% (7/16) were positive for BAAR with the possibility of belonging to the mycobacterium complex, positive data in the microbiological analysis. These positive samples were subjected to the PCR-LAMP molecular test to confirm the results. All the positive samples according to the corresponding origin in their 100% to the arenillas canton, of the positive samples according to the race 100% were of mixed race, as for the age of the animals they are in an age scale of 4 to 6 years .

Keywords: Mycobacterium bovis, bovine tuberculosis, zoonotic, Bacilloscopy, ganglia, culture media, Ogaawa Kudoh, Stonebrink, Ziehl Neelsen, PCR.

INDICE

Pág.

INTRODUCCION 15

1. REVISION LITERARIA 18

1.1 Generalidades de la tuberculosis bovina 18

1.1.1 *Historia* 18

1.1.2 *Definición* 18

1.1.4 *Patogenia* 21

1.1.5 *Transmisión* 21

1.1.6 *Sintomatología* 23

1.1.7 Lesiones *post-mortem* 24

1.1.8 *Diagnostico* 24

1.1.9 *Factores asociados a la Tuberculosis bovina* 29

1.2 Situación de la tuberculosis bovina en el ecuador 30

2 MATERIALES Y METODOS 34

2.1 Zona de estudio 34

2.1.1 Localización de zona de estudio 34

2.1.2 Características de la zona de estudio 36

2.2 Materiales 37

2.2.1 De campo 37

2.2.2 De Laboratorio 37

2.2.3 Equipos 38

2.2.4 Sustancias y reactivos 38

2.3 METODOLOGIA 39

2.3.1 Técnicas e instrumentos de investigación 39

2.3.2 Población y Muestra 39

2.3.3 Diseño de la investigación.....39

2.3.4 Variables de estudio.....40

2.3.5 Metodología de trabajo.....40

3 RESULTADOS.....50

3.1 Determinación de la presencia de linfonodos alterados en animales muestreados.....50

3.2 Identificación de la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) como causa de lesiones ganglionares.....51

3.3 Determinación de muestras positivas a BAAR en el Diagnostico microbiológico en medio de cultivo Ogawa Kudoh.....52

3.4 Determinación de muestras positivas a BAAR en el Diagnostico microbiológico en medio de cultivo Stonebrink.....53

3.5 Determinación de la Prevalencia de Tuberculosis bovina mediante la técnica PCR-LAMP.....54

3.6 Asociación estadística.....55

3.6.1 Variable Raza.....55

3.6.2 Variable Edad.....55

3.6.3 Variable sexo.....57

3.6.4 Variable procedencia.....58

3. DISCUSIÓN.....59

4. CONCLUSIONES.....61

5. RECOMENDACIONES.....62

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....63

ANEXOS.....72

INDICE DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Forma de transmisión de la Tuberculosis Bovina 23
Figura 2. Mapa epidemiológico de la Tuberculosis Bovina con estudios de tuberculización e inspecciones veterinarias en Ecuador 1972 – 2008 31
Figura 3. Mapa geográfico del cantón Arenillas 34
Figura 4. Mapa satelital del camal Municipal del Cantón Arenillas 35
Figura 5. Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI) 36
Figura 6. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) – Sanidad Animal (Área de zoonosis) 36

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Situación actual de Tuberculosis bovina a nivel provincial en la República del Ecuador.....32
Tabla 2. Resultados de baciloscopia de colonias aisladas de los medios de cultivo Ogawa Kudoh y Stonebrink……53
Tabla 3. Resultados obtenidos del aislamiento de colonias positivas en los medios de cultivos Ok y St sometidas a la técnica de PCR – LAMP……. 56
Tabla 4. Prevalencia de Tuberculosis bovina de acuerdo a la raza.....55
Tabla 5. Prevalencia de Tuberculosis bovina de acuerdo a la edad.....56
Tabla 6. Prevalencia de Tuberculosis bovina según el sexo.....57
Tabla 7. Prevalencia de tuberculosis bovina según el lugar de procedencia 58

INDICE DE GRAFICOS

Pág.

Grafico 1. Prevalencia actual de TBB según las provincias del Ecuador.....33
Grafico 2. Proporción de la población bovina inspeccionada según la presencia de alteraciones compatibles con Tuberculosis bovina. 50
Grafico 3. Muestras positivas y negativas a BAAR en el medio de cultivo Ogawa Kudoh 52
Grafico 5. Porcentaje de animales muestrados de acuerdo al rengo de edad 56
Grafico 6. Frecuencia de animales muestreados con respecto al sexo 57
Grafico 7. Datos de frecuencia del lugar de procedencia de bovinos muestreados 58

INDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Ficha de reporte general de canales observadas.....72
Anexo 2. Ficha sobre el reporte por canal con lesión compatible detectada.....73
Anexo 3. Seguimiento de las siembras de ganglios para la determinación de tuberculosis.....74
Anexo 4. Inspección post-mortem de ganglios pulmonares.....78
Anexo 5. Ganglios pulmonares con alteraciones en su color y tamaño.....78
Anexo 6. Empaquetado de las muestras para ser llevados al laboratorio.....79
Anexo 7. Medios de cultivo que se utilizaron para realizar las siembras de las muestras Ok y St.....79
Anexo 8. Materiales utilizados para realizar todo el proceso de sembrado de las muestras.....80
Anexo 9. Materiales dentro de la cabima de seguridad listos para realizar la siembra..80
Anexo 10. Selección de la muestra para posteriormente macerarla con agua destilada para que quede una mezcla homogénea para ser sembrada en los medios de cultivo 81
Anexo 11. Descontaminación del homogenizado con hidróxido de sodio al 4 % (soda) 81
Anexo 12. Siembra de muestra descontaminada en medio de cultivo con hisopo estéril 82
Anexo 13. Tubos con medios de cultivos sembrados con las diferentes muestras listos para ser incubados.....82
Anexo 14. Tubos con medios de cultivos en la incubadora a 37° C, incubación durante 6 semanas.....83
Anexo 15. Lectura del crecimiento bacteriano 83
Anexo 16. Crecimiento de colonias bacterianas en los medios de cultivo.....84
Anexo 17. Colonias en los diferentes medios de cultivo listo para ser aislados.....84
Anexo 18. Materiales listos para hacer la etapa del aislamiento de las colonias.....85
Anexo 19. Aislando las colonias de los diferentes medios de cultivo, para luego ser llevado a congelación. 85
Anexo 20. Colonias bacterianas aisladas en los criotubos 86

Anexo 21. Rotulación de las placas para realizar el extendido de las colonias 86
Anexo 22. Materiales utilizados para realizar los extendidos de las colonias 87
Anexo 23.Realizando el extendido de las muestras en las placas.....87
Anexo 24. Placas secándose con temperatura ambiente para aplicarles la tinción Ziehl Neelsen 88
Anexo 25. Materiales para realizar la Tinción de Ziehl Neelsen.....88
Anexo 26. Placas portaobjetos con papel filtro sobre los extendidos 89
Anexo 27. Adición de Fucsina fenicada sobre los extendidos 89
Anexo 28. Flameado de las placas hasta que se produzca 3 emisiones de vapor 90
Anexo 29. Aplicación del alcohol acido sobre la placa.....90
Anexo 30. Aplicación del alcohol acido sobre la placa.....90
Anexo 31. Placas secándose a temperatura ambiente para realizar la baciloscopia 91
Anexo 32. Observación de placas mediante la baciloscopia 91
Anexo 33. Baciloscopia de bacilos acido – alcohol resistente (BAAR) positivos a mycobacterium.....91
Anexo 34. Placas positivas a BAAR 92
Anexo 35. Placas negativas a BAAR 92
Anexo 36. Resultados de la Baciloscopia……95
Anexo 37. Clasificación de la muestra en los tres primers……95
Anexo 38. Ubicación de los primers en el termociclador para que realice el proceso de desnaturalización…… .96
Anexo 39. Colocación de la Polimerasa en los diferentes primers……..96
Anexo 40. Colocación del bromuro de etidio en las muestras para someterlos a la electroforesis……96
Anexo 41. Aplicando la electroforesis a las muestras…… 97
Anexo 42. Resultados de la electroforesis……97

INTRODUCCION

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana de tipo zoonotica, que está presente en el Ecuador, el cual no se cuenta con estudios estatales o institucionales que den cifras o porcentajes de prevalencia de la enfermedad en el país, la última investigación que se realizó a nivel nacional por Proaño y colaboradores (1), manifestaron que "según datos exhaustivos obtenidos de encuestas sobre pruebas de tuberculina y de los estudios de vigilancia llevados a cabo en mataderos entre 1972 y 2008 en varias zonas geográficas del país manifiesta que debido a factores como el crecimiento de la industria láctea, el crecimiento de la población bovina y la falta de controles de la tuberculosis bovina han ocasionado un aumento de la prevalencia de esta".

La situación de esta enfermedad en el Ecuador es un poco desconocida debido a que no existen programas específicos y no se han implementado medidas tendientes a erradicar la enfermedad, además existe el temor en los productores de ganado bovino que sus reses sean decomisadas por ser notificadas como portadoras de esta enfermedad, lo cual ocasiona pérdidas económica muy significativa para ellos, ante esta situación en la actualidad las investigaciones son realizadas por universidades o institutos dedicados al estudio de las enfermedades zoonóticas

Las perdidas cuantitativas y cualitativas de los principales indicadores productivos y reproductivos que se ven afectados en esta especie ha causado una preocupación en la producción, además no solo por aquellos indicadores sino también por los altos costos de producción que conlleva el diagnóstico de esta enfermedad, por el decomiso de los animales, su alta transmisibilidad hacia los humanos, y por las restricciones comerciales que se les aplica a las producciones ganaderas para poder salvaguardar la salud pública, se ve la necesidad en controlar y erradicar de la TBb (2)(3)(4).

La presencia de la enfermedad en los campos: productivos, sanitarios y comerciales que junto al elevado costo del tratamiento antimicrobiano y al riesgo de la aparición de cepas resistentes que pueden provocar el uso inadecuado de fármacos, existen suficientes motivos para buscar una solución o encontrar una forma de protección efectiva y segura contra la tuberculosis bovina. El uso de nuevas metodologías ligadas a la tecnologías puede que se les facilite a los productores realizar un diagnóstico precoz a los animales infectados antes de llevarlos al matadero y así evitar su decomiso (2).

En el caso de la Provincia de El Oro específicamente se realizó una investigación por parte de Ramos en el año 2017" dirigida a la parte baja de la Provincia a través de la prueba de tuberculización (PDD) ella menciona que de 269 bovinos muestrados la prevalencia de tuberculosis bovina mediante este método es del 0%" (5). Ante este panorama epidemiológico, nuestro estudio se realizó en la Provincia de El Oro a nivel de camal en el Cantón Arenillas, donde se tomaron muestras de linfonódulos de los animales faenados y que presentan características que sugieren las presencia de la enfermedad, sometidos inmediatamente a una conservación en frío para posteriormente trasladarlos hasta la Ciudad de Guayaquil y ser procesados en el Instituto de Investigación INSPI, donde se efectuó el estudio de la tuberculosis bovina sometiendo las muestras a su preparación y cultivo en medios especiales usados para el efecto.

Este estudio plantea determinar la prevalencia de tuberculosis bovina a partir de linfonódulos obtenidos de canales sospechosas a nivel de camal en el Cantón de Arenillas, enfermedad que puede afectar la seguridad alimentaria y la salud pública. Por lo tanto, nuestros objetivos son: determinar la presencia de linfonódulos infartados de las cadenas ganglionares compatibles con tuberculosis, establecer la presencia de *Mycobacterium bovis* mediante medios de cultivo *Ogawa Kudoh y Stonebrink* y la aplicación de microscopia utilizando la tinción *Ziehl Neelsen* y posteriormente aplicar la técnica de PCR, para luego establecer la prevalencia de la enfermedad según raza, sexo, edad y lugar de procedencia. Los objetivos planteados en este estudio son:

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a. Determinar la presencia de linfonódulos infartados de las cadenas ganglionares gastrointestinal y respiratoria 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 *Ogawa Kudoh* y *Stonebrink* y tinción para gérmenes ácido-resistentes.

c. Confirmar la presencia de tuberculosis bovina mediante la técnica PCR.

d. Establecer el índice de prevalencia de tuberculosis bovina según: raza, sexo, edad y lugar de procedencia.

1. REVISION LITERARIA

1.1 Generalidades de la tuberculosis bovina

1.1.1 *Historia.* El nombre específico de "Bacterium tuberculosis" fue propuesto por Zopf en 1883 y, en 1896, Lehman y Neumann asignaron las especies al género Mycobacterium. A partir de la observación de pequeñas diferencias entre los microorganismos aislados en humanos y en ganado, se distinguió entre Mycobacterium tuberculosis hominis y Mycobacterium tuberculosis bovis. Las cepas de hominis eran aquellas reconocidas como causantes de enfermedad pulmonar en el hombre, y las de bovis aquellas responsables de tuberculosis en el ganado, y que podían dar lugar a enfermedad extrapulmonar en el hombre, como consecuencia de la ingestión de leche de vacas infectadas. El primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar bovina se describió en 1909, y las investigaciones posteriores concluyeron que, entre el 1 y el 3% de los casos de tuberculosis pulmonar, eran causados por Mycobacterium bovis. El nombre fue oficialmente asignado en 1970 por Karlson y Lessel (6).

La tuberculosis bovina es una zoonosis bacteriana crónica que al pasar de los años ha adquirido términos como tisis, consunción y plaga blanca cuyo agente etiológico es el *Mycobacterium bovis* que forma parte del complejo Mycobacterium tuberculosis y es de notificación obligatoria. (7).

1.1.2 *Definición.* La Tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad causada por una bacteria denominada *Mycobacterium bovis (M. bovis)* esta enfermedad posee una evolución crónica ya que puede desencadenarse después de meses o años hasta que el animal infectado comience a demostrar sintomatología y posteriormente la muerte, además puede presentarse en un estado subclínico es decir aparentemente sanos. Se la considera como una enfermedad infecciosa de carácter zoonosica, siendo su hospedador principal el bovino, pero además se lo ha encontrado en animales salvajes, domésticos y en el hombre (8).

Esta enfermedad es considerada granulomatosa por la presencia de gránulos en las zonas afectadas cuya patología es reflejada en el tracto respiratorio alto, por lo que se deduce que la primera vía de infestación es por vía respiratoria es decir que el M. bovis, se disemina por vía aerógeno (9). Sus lesiones son más notables en el sistema respiratorio y digestivo, esta enfermedad es de gran impacto en la salud pública por su adaptabilidad en el sistema humano (5).

Es caracterizada por ser una enfermedad de tipo crónico, con un período de incubación bastante largo y un curso muy lento que puede tomar varios años. La aparición de lesiones se debe a la reacción entre macrófagos, linfocitos T y la bacteria, que conduce a la formación del típico granuloma tuberculoso alrededor del foco infeccioso, cuyo fin es restringir o prevenir el crecimiento y diseminación de la bacteria. Si la infección no logra ser contenida por estos mecanismos primarios de defensa, la lesión se necrosa, caseifica, mineraliza y desarrolla tejido fibroso a su alrededor afectando posteriormente la función pulmonar (10).

Esta bacteria en los bovinos es un patógeno primario, pero posee amplios rangos de hospederos vertebrados, donde se ven afectados todos los animales de producción, es decir de interés económico entre ellos tenemos a los caprinos, ovinos porcinos, equinos, aves, animales afectivos y silvestres. En investigaciones realizadas se dice que esta bacteria se mantiene en los animales silvestres que son los causantes de la transmisión a los bovinos, siendo este un animal de abasto y al tener un contacto directo se ha convertido en una de las vías de contagio más importantes para que se produzca la infestación al ser humano (2)(11).

1.1.3 *Etiología.* EL género *Mycobacterium* está catalogado en el phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Actinomycelates, suborden Corynebacterineae, familia Mycobacteriaceae. Este género se encuentra comprendido en más de 120 especies y en presentaciones como bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y de los animales. Tienen características compartidas fundamentales en todos los géneros por su forma bacilar, dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y son acido-alcohol resistentes (12). El complejo Mycobacterium tuberculosis (Mycobacterium tuberculosis complex, MTBC) se caracteriza por causar tuberculosis en humanos y animales e incluye varias especies: *M.*

tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. microti, M. caprae, M. pinnipedii y M. canetti. Todas ellas se caracterizan por presentar una homología del 99.95% en su genoma. Sin embargo, estas especies difieren ampliamente en la preferencia de hospedador, fenotipos y patogenicidad (12).

La tuberculosis bovina proviene de la infección por *Mycobacterium bovis* que es una bacteria grampositiva del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de la familia Mycobacteriaceae. Es una bacteria acido-alcohol resistente debido a su elevado contenido de lípidos en su pared celular, entre los que se incluyen los ácidos micólicos, por ende para su identificación requiere de una coloración especial de *Ziehl-Neelsen*, esta bacteria crece en medios de cultivos especiales como por ejemplo *Ogawa Kudoh* y *Stonebrink*, además se caracteriza por tener un crecimiento lento por ende cuando se realiza la siembra en cultivos se lo notifica como negativo luego de 8 semanas (13)(14).

Esta bacteria tiene la gran habilidad de sobrevivir en el medio ambiente por varios meses especialmente en lugares fríos, oscuros y húmedos, tiene gran sensibilidad a la acción de los desinfectantes como el hipoclorito de sodio al 5%, formol al 3% y al fenol al 5% siempre y cuando estos sean utilizados de una manera prolongada, para la eliminación de esta bacteria hay se someterla a altas temperaturas como por ejemplo se puede utilizar el autoclave durante 20 minutos o la pasteurización, siendo la ultima una de las técnicas más empleadas en la producción de lácteos la cual garantiza que los productos lácteos sean de calidad y libres de contaminación (14).

Este tipo de enfermedad tiene susceptibilidad a las diferentes especies de animales es decir que el *Mycobacterium Bovis* puede infestar a los animales de producción, pero esto dependerá en la forma de exposición, el grado de patogénesis del agente, la dosis y tiempo de exposición. A pesar que esta bacteria también puede infestar a los animales silvestres y domésticos siendo así que según investigaciones su hospedador principal es el ganado vacuno y las demás especies solo son reservorios, y como el ser humano tiene un contacto directo con esta especie de animal pues se encuentra en una la alta exposición a la bacteria (5).

1.1.4 *Patogenia.* Sabiendo que esta enfermedad es de periodo de incubación muy largo de tipo crónico y de presentar lesiones lentamente el estudio de la patogenia de la tuberculosis bovina hay que tener en cuenta dos aspectos muy importantes el primero cuando la micobacteria tiene su primer contacto con el organismo, y el segundo cuando el contagio ha sido por un fenómeno postprimario es decir donde ya hubo un contacto, pero el animal presenta inmunidad. Sabiendo que la contaminación es por vía aérea a través de micropartículas o aerosoles producidas por el animal, en el caso del proceso primario los macrófagos se encargan de fagocitar a las micobacterias que están ubicadas en las mucosas digestivas y respiratorias. Mientras que por la vía oral no es primordial ya que queda exclusivamente restringida a terneros lactantes (10).

En la infestación primaria torna a formarse el típico granuloma tuberculoso alrededor del foco infeccioso, cuyo fin es restringir o prevenir el crecimiento y diseminación de la bacteria. Si la infección no logra ser contenida por estos mecanismos primarios de defensa, la lesión se necrosa, caseifica, mineraliza y desarrolla tejido fibroso a su alrededor afectando posteriormente la función pulmonar (10).

En el caso de los animales con contacto previo con la enfermedad este ya posee una inmunidad que fue adquirida durante la primera infección, responde a un nuevo contagio de forma diferente. El nuevo contagio puede deberse a bacterias que penetran desde el exterior y a focos primarios hasta entonces inactivos. El conjunto de reacciones recibe el nombre de complejo postprimario. Sólo hay difusión intracanicular (no linfohematógena), por lo que se puede originar tuberculosis crónica en un órgano concreto (sin caseificación) sin que se produzcan lesiones tuberculosas en los nódulos (15).

1.1.5 *Transmisión.* Según Yahyaoui y colaboradores (16) menciona que esta bacteria tiene una gran habilidad de infectar a una amplia gama de especies hospedadoras distintas del ganado (ganado, vida silvestre y mascotas) y humanos. Sin embargo, el ganado bovino sigue siendo el reservorio más importante para *Mycobacteriun bovis* en los cuales unos de los reservorios que causan la infestación de los bovinos y se encuentran en la vida silvestre son el tejon (*Meles Meles)* y la zarigüeya *(Trichosurus vulpécula).*

Para que exista una trasmisión de *M. bovis* entre el ganado hay que tener en cuenta ciertos factores que son: la frecuencia de excreción, la dosis de infestación, la ruta de infección,

la susceptibilidad del huésped, y el periodo de comunicabilidad (17). La transmisión se da sin importar el sexo y la raza a pesar que los más susceptibles son los Bos Tauros en cuanto a la edad como se sabe que esta enfermedad es de tipo crónico su sintomatología se presentará en animales más viejos siendo estos portadores asintomáticos y fuentes de infección para todo el ganado, por lo que en la primera estancia de la infección no se presentan lesiones significativas, además que excretan bajo número de *M. bovis*, y así los animales en contacto no fácilmente adquirir la infección (5).

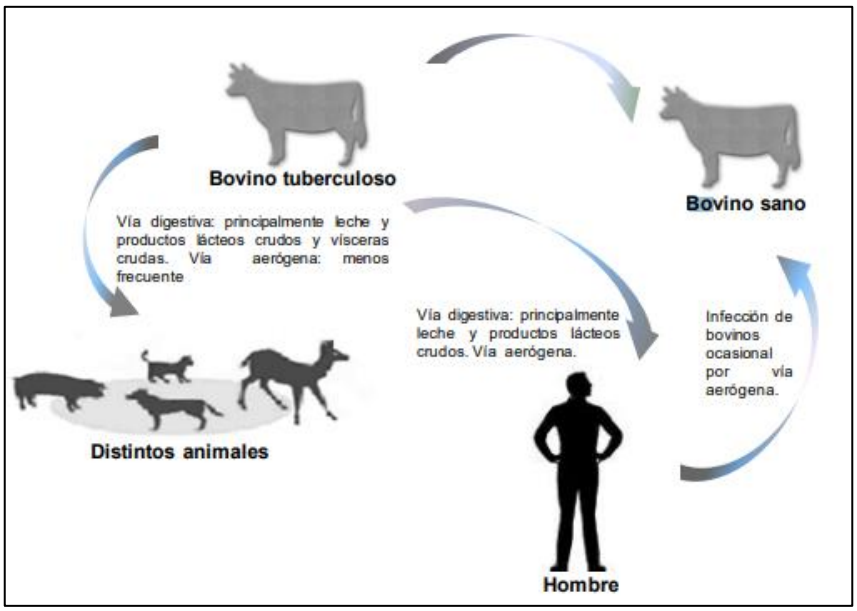
Las vías de eliminación de las micobacterias suelen ser por las secreciones del tracto respiratorio, leche, calostro, heces, orina, y ocasionalmente por el semen. La vía de transmisión más relevante que hay entre ganado y ganado es por los aerosoles que emiten las vacas al estornudar o también por el consumo vía oral de agua y alimento contaminado, en el caso de los terneros a través de la leche (18). Cabe recalcar que en el caso de la leche según (17) menciona que en la década del siglo 20, se demostró que son necesarios al menos 10 mg de bacilos de tubérculos bovinos para causar infección alimentaria en ternero. Mientras que la dosis requerida para la transmisión indirecta a través del intercambio de alimentos no está clara, pero es probable que sea más alta que la requerida para la transmisión por contacto directo (nariz a nariz) o transmisión por aerosol (19).

El *M. bovis* es relativamente resistente a los factores ambientales y en condiciones apropiadas (p. Ej., Fresco y protegido de la luz solar) puede persistir en el ambiente durante semanas o meses, prolongando la probabilidad de transmisión por ingestión, sabiendo que el *M. bovis* en una investigación realizada en Michigan sobrevivió hasta 88 días en el suelo, 58 días en agua y heno y 43 días en maíz. Aunque es capaz de sobrevivir durante muchas semanas en el medio ambiente, el riesgo del *M. bovis* ambiental radica por la ubicación de los bacilos en el suelo o el agua, lo que hace que los bacilos tuberculosos sean más accesibles para los huéspedes (19).

En el caso del ser humano el *Mycobacterium bovis*, puede contraerse por vía oral o por vía cutánea. En el caso de la vía oral se da por el consumo de productos lácteos sin haberlos sometidos a un proceso de pasteurización. Es muy rara la infección por vía cutánea a través de heridas con instrumentos contaminados, ya que dependerá de la cantidad de partículas infectantes, y la duración de la exposición. Por lo general la

exposición debe permanecer durante un lapso prolongado para que se produzca la infección tuberculosa (20).

Figura 1. Forma de transmisión de la Tuberculosis Bovina



Fuente: (21)

1.1.6 *Sintomatología.* Esta es una infección crónica que afecta principalmente a las vías respiratorias provocando un deterioro del estado general de salud, tos y a la larga la muerte. Habitualmente, los animales infectados se presentan aparentemente normales. El desarrollo de la enfermedad es lento, pudiendo en algunos casos no mostrar síntomas clínicos durante la vida del animal. (22).

En la fase más tardía, podemos apreciar falta de apetito, una progresiva pérdida de estado, debilidad y fiebre. Como las lesiones tuberculosas pueden tener distintas ubicaciones en el organismo, pueden percibirse otros síntomas que van a depender de donde estén localizadas las mismas. Los animales cuyos pulmones se encuentran comprometidos generalmente presentan tos húmeda. En la fase terminal, los animales pueden presentar un compromiso respiratorio agudo. Si los afectados son los ganglios linfáticos de cabeza y cuello, estos pueden agrandarse e incluso abrirse y supurar; al agrandarse y también pueden obstruir los vasos sanguíneos, las vías respiratorias o el tubo digestivo. Si se ve comprometido el tracto digestivo, suele observarse diarrea intermitente y estreñimiento (13,14,23).

- *En la salud Publica*

La sintomatología que se presenta cuando existe una contaminación al ser humano son los mismos síntomas que se presentan en la afectación de la Tuberculosis humana, pero cabe recalcar que la forma de infestación suele darse por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar o el vínculo directo que se tiene en las diferentes producciones ganaderas o en los mataderos.

Hoy en día, la TB humana atribuible al contacto directo con ganado infectado es inferior al 1% de los casos confirmados en pacientes desarrollados. Países, principalmente debido al tratamiento térmico de la leche y la implementación de vigilancia veterinaria en el matadero (24).

1.1.7 Lesiones *post-mortem.* Las lesiones que se observan en animales infectados luego del sacrificio son comúnmente lesiones nodulares llamados tubérculos que se los encuentra o se los localiza en cualquier órgano y tejido del animal en donde se observa nódulos granulomatosos con aspectos purulentos o caseosos con capsula fibrosas y en ocasiones presentan calcificación en el centro de la lesión, que se lo puede presenciar por el crujido al momento de hacer el corte con el cuchillo, también se puede encontrar lesiones generalizadas llamada tuberculosis miliar donde hay la presencia de nódulos de 1 a 3 cm de longitud distribuido en toda la carcasa, también se puedo observar el aumento del tamaño de los ganglios linfáticos mediastínicos, además simplemente no se presentan ningún tipo de lesión macroscópicamente a pesar que en la prueba intradérmica llamada Tuberculina haya salido positivo (25).

1.1.8 *Diagnostico.* Para diagnosticar la tuberculosis bovina se puede realizar un diagnóstico clínico y de laboratorio, en el caso del clínico se puede realizar a través de sintomatología en los animales, análisis post-mortem y la prueba de tuberculina. En el caso de laboratorio a través de muestras contaminadas o animales sospechosos sometiéndolas a siembra y aislamientos en medios de cultivos, además para su confirmación las pruebas de sensibilidad como el ensayo interferón gamma, prueba de serológica de inmuno-absorción enzimática ELISA, pruebas bacteriológicas y moleculares como PCR (5).

Cabe recalcar que en el diagnóstico clínico o basándose en la sintomatología pues no es muy certero al momento de diagnosticar ya que al aplicar esta técnica hay que tener en

cuenta que es aplicado solo en animales que tienen una edad avanzada siendo así este es más usado en las producciones lecheras ya que ahí encontramos animales viejos. En donde se realiza una observación a los animales que presenten lesiones graves que se encuentre en un estado caquéxico, imposibilidad al respirar, y tengan un bajo rendimiento en la producción de leche (23).

El diagnóstico bacteriológico es mediante la tinción de *Ziehl Neelsen* para microorganismos ácido alcohol resistente en un frotis realizado con el material sospechoso. En caso de ser positivo, se observarán bacilos teñidos de color fucsia, debido a la fucsina. Estos medios deben contener piruvato o glicerol. Los cultivos se incuban durante un mínimo de 8 semanas a 37ºC (21).

1.1.8.1 *Diagnostico ante-mortem*

- *Diagnostico por Prueba de Tuberculina*

Una de las pruebas estándar o la más empleada y confiable es la prueba de la tuberculina aplicada para el diagnóstico de la tuberculosis en animales vivos que se la utiliza en programas basados en estrategia de prueba y sacrifico para el control y erradicación de la tuberculosis bovina (26). La prueba de tuberculina se basa en una reacción de hipersensibilidad tipo IV y consiste en inyectar al animal un derivado proteico purificado (PPD) vía intradérmica para evaluar su respuesta inmunológica al cabo de 72 horas (23).

Este derivado proteico purificado es un antígeno de tuberculina bovina que es aplicado en pequeñas porciones en una única dosis a nivel del pliegue ano-caudal (PAC) o en la zona del cuello (Prueba Cervical Simple – PCS), cabe recalcar que esta prueba no es sinónimo de *Mycobacterium bovis,* sino que el animal ha tenido un contacto con cualquier tipo de mycobacterium por ende es necesario realizar la prueba cervical comparativa (PCC) en donde es utilizado el PPD bovino y el PPD aviar (27). La prueba de la tuberculina posee entre el 98% y el 99.9% de especificidad y una sensibilidad que va entre el 51% al 80% relativamente bajo por lo que es propenso a presentarse falsos negativos (28).

1.1.8.2 *Diagnostico post-mortem*

- *Diagnostico por Medios de Cultivo*

Los medios de cultivos son una mezcla compuesta de biomoléculas que contienen macronutrientes como el carbono, oxigeno, nitrógeno, hidrogeno, fosforo y azufre y micronutrientes como el magnesio, cobalto etc., Cuyo objetivo es servir como una fuente de crecimiento, mantenimiento y transporte de los microorganismos. Además, no poseen lo necesario para cumplir este objetivo por lo deben adquirir ciertas condiciones físicas para que se genere la multiplicación y crecimiento del microrganismo siendo estas: el pH, temperatura, luz, presión, entre otros (29).

El cultivo microbiológico sigue considerándose el estándar de oro para el diagnóstico de la Mycobacterias en todas sus formas; sin embargo, es muy lento, obteniéndose resultados tras 15 días y hasta 8 semanas de incubación de las muestras clínicas (30). El tiempo que requiere M. bovis en crecer es lento al igual que las demás micobacterias del complejo Mycobacterium tuberculosis y su aislamiento puede abarcar entre 6 – 8 semanas hasta tres meses para declararla como negativa, en donde los resultados que se obtengan dependerán de factores que influyen (31):

En primer lugar, la elección de muestras de tejido en el matadero es clave para el cultivo. Los ganglios linfáticos anormales y los órganos parenquimatosos con lesiones compatibles con bTB siempre deben incluirse cuando están presentes. Si no se detectan lesiones patológicas, se deben tomar ganglios linfáticos específicos (retrofaríngeo, bronquial, mediastínico, supramamario, mandibular y mesentérico) para su examen y cultivo (32).

En segundo lugar, la conservación de las muestras hasta el cultivo por refrigeración o congelación, junto con la etapa de descontaminación química, es obligatoria para disminuir el riesgo de contaminación con otros microorganismos. Por lo que el almacenamiento inadecuado y el tratamiento de la muestra influyen en la viabilidad de MTBC y pueden promover el crecimiento de microorganismos contaminantes (32).

En tercer lugar, el tipo de medio de cultivo elegido para cultivar micobacterias puede influir en la tasa de recuperación del cultivo microbiológico. El crecimiento de MTBC se puede detectar mediante la formación de colonias en agar y en medios sólidos a base de

huevo (como Middlebrook 7H10 / 7H11, Stonebrink o Löwenstein-Jensen con piruvato de sodio), o diferencias de fluorescencia o presión en medios líquidos (BACTEC 460 TB y MGIT 960 y sistema VersaTREK)(32).

Medio de cultivo OGAWA KUDOH

El medio de cultivo Ogawa Kudoh es un medio selectivo, utilizado para el aislamiento y cultivo de micobacterias a excepción de *M. leprae,* permite la identificación de un mínimo de 10 BAAR en una muestra si se realiza el procedimiento de forma adecuada, convirtiéndolo en un método más sensible. El medio de cultivo debe ser conservado a una temperatura de 4-8°C, en su empaque original, evitando la exposición a la luz directa, no debe ser congelado con el fin de preservar el medio. El medio básicamente está constituido por un conjunto de sales tales como citrato de magnesio, sulfato de magnesio, glutamato de sodio, fosfato disódico, fosfato monopotásíco anhidro, además incorpora glicerol, verde de malaquita y homogenizado de huevo; está mezcla debe tener un pH de 6,4. El medio no es selectivo para M. tuberculosis y por tanto otras micobacterias incluyendo algunas no patógenas pueden crecer en el mismo (33).

Medio de cultivo STONEBRINK

Es utilizado como cultivo y aislamiento de Mycobacterium tuberculosis variedad Bovis, el cual constituye un rico soporte para el crecimiento de *Mycobacterium bovis* ya que posee la verde malaquita que ayuda en la inhibición del desarrollo de la flora acompañante Gram positiva y de algunas bacterias Gram negativas está compuesto por: fosfato monosodico, fosfato disodico, piruvato de sodio huevos frescos enteros, verde de malaquita y agua purificada. Por lo que este medio por poseer el piruvato habrá crecimiento positivos con un porcentaje alto a M. bovis, cabe recalcar que para tener un resultado de calidad habrá que tomar ciertas aspectos muy importantes en el uso de este medio como por ejemplo realizar el procesamiento correctos de la muestra, en cuanto a la descontaminación realizarla en el tiempo prescrito y los más importante la ubicación y la temperatura que se serán sometidos para que haya crecimiento (33).

- *Diagnóstico molecular*

Reacción en cadena de la Polimera (PCR)

Pruebas de rutina como la Reacción en Cadena de la Po-limerasa (PCR) son herramientas que nos ayudan en el diagnóstico clínico, pero una de las principales desventajas es su alto costo debido al equipamiento que usa y su la larga duración en que esta puede entregar resultados. Para ello es recomendable usar métodos rápidos, sensibles y específicos que nos ayuden en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (34).

La aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a partir de medio líquido o sólido permite establecer diagnósticos más rápidos fiables. La mayor parte de técnicas comercializadas se basan en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de secuencias génicas específicas de especies del género Mycobacterium que son de utilidad para distinguir los miembros del complejo de M. tuberculosis de otras micobacterias, pero no entre ellos, debido a la invariabilidad genética de los loci más frecuentemente usados como diana (6).

Debido a los problemas asociados al aislamiento de esta micobacteria, se ha considerado confirmar el diagnóstico de TB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADN en el genoma de bacterias del complejo M. tuberculosis. La PCR para el gen que codifica la proteína MPB70 ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos, la instrumentación de una PCR altamente sensible y específica para confirmar el diagnóstico de TB, permitiría obtener resultados en pocas horas, en comparación con el cultivo que requiere usualmente meses (35).

Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP)

Un novedoso método que actualmente se usa en países desarrollados es la Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) de Ácidos Nucleicos. LAMP brinda resultados en menor tiempo con alta sensibilidad y especificidad, necesitando así de un baño maría que funciona a una sola temperatura entre 60°C a 65 (34). Se trata de una prueba que permite la amplificación de regiones de ADN bajo condiciones isotérmicas con gran precisión y

tiempos cortos de incubación, lo que le confiere ventajas sobre la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y evita la necesidad de termocicladores costosos (36).

El nivel de sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP es superior en contraste con las pruebas de PCR. Adicionalmente, LAMP amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez. La amplificación por medio de LAMP también puede ser cuantitativa y depende del desplazamiento de la cadena por auto ciclado, realizado por la ADN polimerasa (37).

1.1.9 *Factores asociados a la Tuberculosis bovina.* Según Broughan y colaboradores (38), menciona que la evaluación del riesgo depende de una medición imparcial de factores asociados con la transmisión entre la bacteria y el huésped y una clasificación precisa del estado de infección de animales y rebaños. Un riesgo factor se define como una característica, que en su presencia aumenta la probabilidad de infección, y pueden ser causales o no causales. Los factores esta interrelacionados por cada producción animal aplicando su propio sistema de distribución que puede ser por sexo, raza, y grupos de edad que contribuyen al perfil de exposición de cada rebaño.

Las diferentes técnicas de diagnóstico que se han venido empleando en las diversas investigaciones para erradicar esta enfermedad han obtenido bueno y malos resultados, siendo así que se ha deducido que existen varios factores en donde se podría decir que esta enfermedad se asocia a ciertas características del animal como la raza, sexo y edad. Po lo que según la investigación de Lomillos y Martínez (39) ellos mencionan que existe una asociación de la raza con la enfermedad, en este caso es la raza bovina de Lidia que en la actualidad son las que presentan mayor problema para erradicar la enfermedad la cual posee una prevalencia hasta 20 veces mayor en comparación con razas bovinas exclusivamente lecheras.

A nivel de Ecuador según Pacha (40) en su investigación titulada “Diagnóstico de tuberculosis bovina, por medio de la prueba cervical comparativa en hembras bovinas de la hoya de Loja”, declara que la raza si se asocia con la enfermedad siendo así que la raza Holstein Friesian tiene más susceptibilidad a la TBB, en comparación con los datos obtenidos con la raza Holstein mestiza.

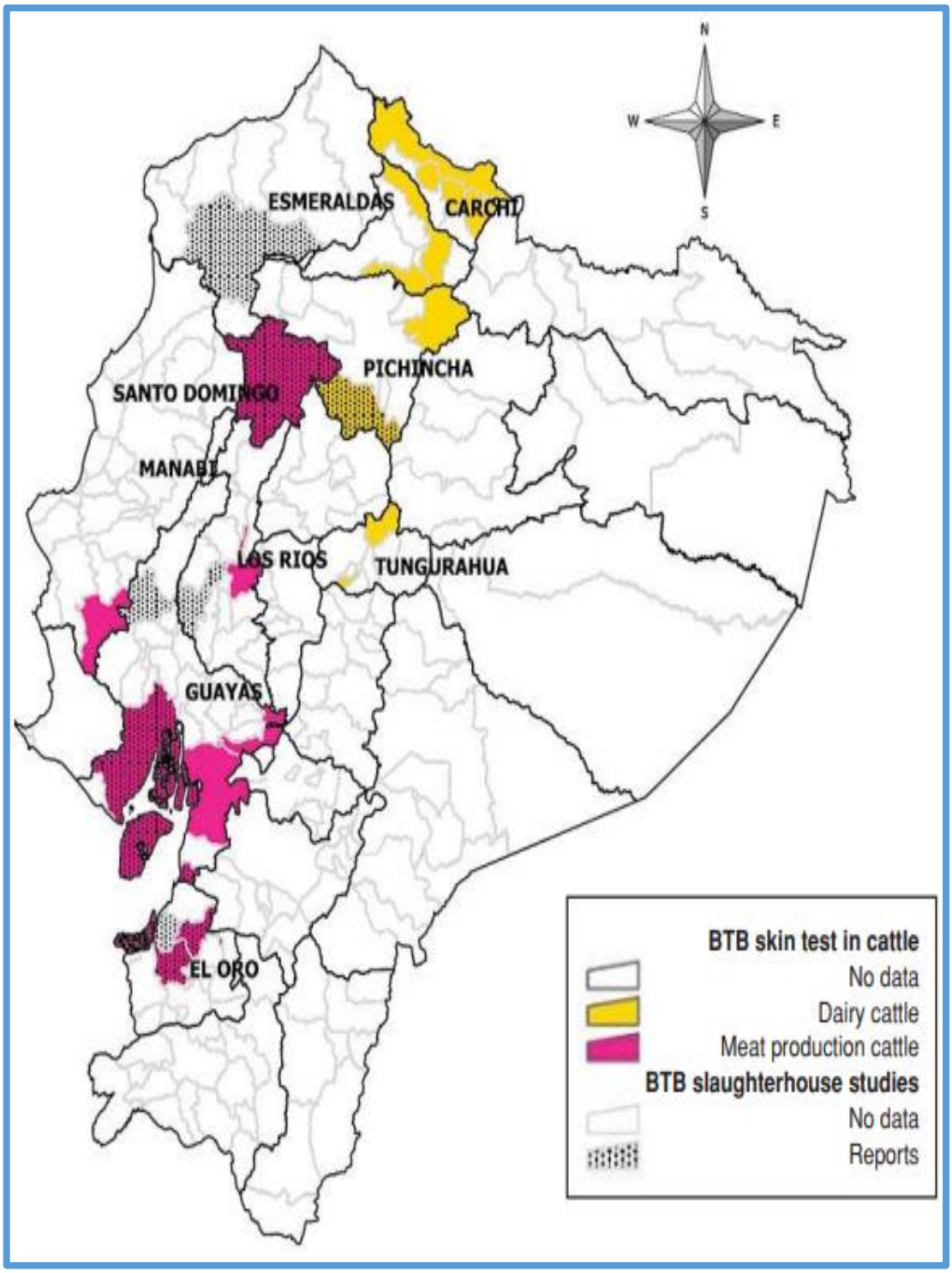
En la provincia del Guayas específicamente en el cantón Daule estudios realizados a nivel de camal analizados por proceso microbiológico realizados por Cruz y Pozo (31), mencionan que no encontraron asociación estadística significativa de *M. bovis* entre propósito, categoría zootécnica y sexo de los bovinos estudiados. Corroborando con la misma técnica de estudio, en la provincia de Pichincha en el camal de Mejía estudios realizados por Cushicondor (41) reporta que no encontró ninguna asociación entre el biotipo, la procedencia, la edad y el sexo, con la enfermedad TBB. Por lo que esta bacteria puede infectar a cualquier tipo de ganado bovino indiferentemente de la edad, sexo, raza, propósito.

1.2 Situación de la tuberculosis bovina en el ecuador

La TBB es una enfermedad que se encuentra en todos los países del mundo, en algunos países que promueven programas de erradicación han sido éxitos llegando a estar libres de TBB, mientras tanto, países en vías de desarrollo es un problema constante ya que pocos países tienen programas de erradicación. La incidencia y prevalencia es variable dentro de continente americano, tal es el caso de las islas del Caribe, México y países de Centroamérica que tienen prevalencia intermedia, mientras que, en países de Sudamérica varia de una prevalencia baja a prevalencia alta, como Argentina o Brasil siendo los más grandes productores de ganado bovino y sus derivados (7).

En el Ecuador la situación epidemiológica de la Tuberculosis bovina según Proaño (1) en un estudio realizado en 1972 hasta el 2008 obteniendo datos exhaustivos de encuestas de pruebas de tuberculina y estudios de vigilancia de mataderos realizados en una variedad de áreas geográficas del país. Menciona que, varios factores, incluida la expansión de la industria láctea (por la alta demanda de leche y sus subproductos), aumento de la población de ganado bovino, la presencia de M. bovis y la falta de controles han causado un aumento en la prevalencia de TBB. Ya que en nuestro país los casos positivos de Tuberculosis bovina no se conocen con exactitud por razones de que los ganaderos o finqueros no reportan estos casos por temor a la carencia de privacidad, por ende, la necesidad de tener datos exactos a nivel nacional se detallará a continuación todos los estudios realizados en el Ecuador.

Figura 2. Mapa epidemiológico de la Tuberculosis Bovina con estudios de tuberculización e inspecciones veterinarias en Ecuador 1972 – 2008



Fuente: (1)

Estudios realizados detallados a nivel provincial del territorio ecuatoriano:

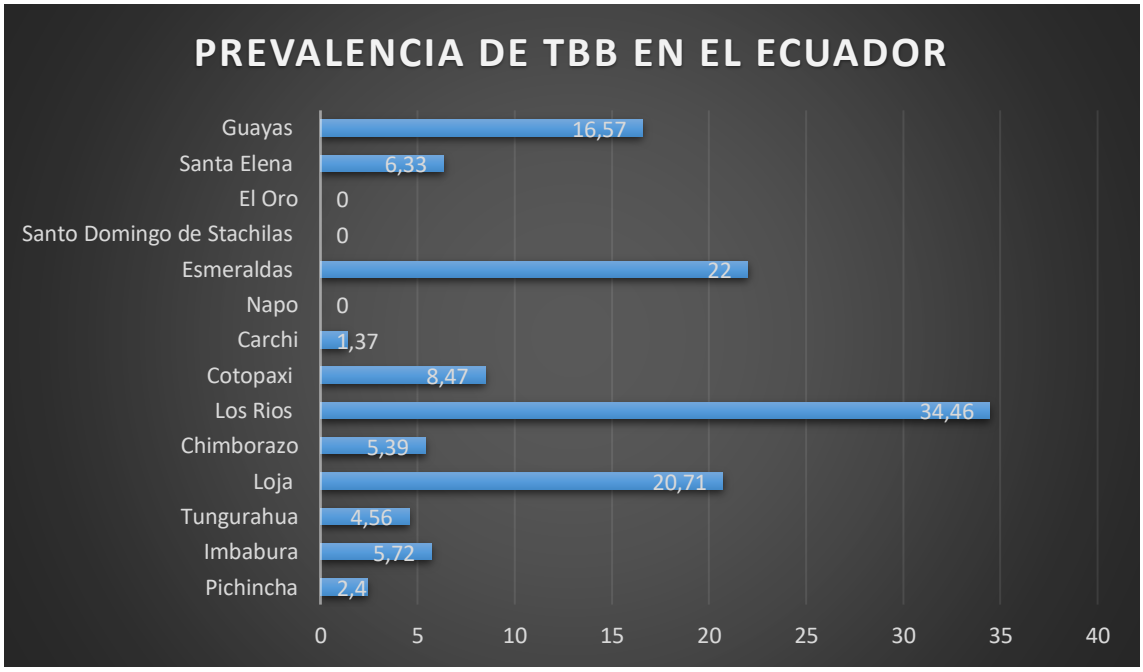
Tabla 1. Situación actual de Tuberculosis bovina a nivel provincial en la República del Ecuador

SITUACION ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS BOVINA A NIVEL PROVINCIAL EN LA REPÚBLICA DEL ECUADOR			
Provincia	**Métodos de diagnósticos**		**Prevalencia**
	Ante-mortem	**Post-mortem**	
Pichincha	2 de Tuberculina	1 de Nested (PCR) (42) 1 de cultivo bacteriológico (41)	2.40%
Imbabura	2 de tuberculina (43,44)		5.72%
Tungurahua		1 de Nested (PCR) (42)	4.56%
Loja	2 de tuberculina (45,46)	PCR (Kit Pure Link Genomic y PCR) (47) 1 tecnica de *Zhiel Neelsen* (48)	20.71%
Chimborazo	3 de tuberculina (49,50)		5,39%

Los Ríos	1 de tuberculina (51)	LAMP (52)	34.46%
Cotopaxi	1 de tuberculina (44)		8.47%
Carchi	3 de tuberculina (7,44,53)		1.37%
Napo	1 de tuberculina (21)		0%
Esmeraldas	1 de tuberculina (54)		22%
Santo Domingo de los Tsáchilas	1 de tuberculina (55)		0%
El Oro	1 de tuberculina (5)		0%
Santa Elena	1 de tuberculina (56)		6.33%
Guayas	1 de tuberculina (53)	LAMP (57)	16.57%

Fuente: Autor

Grafico 1. Prevalencia actual de TBB según las provincias del Ecuador



2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Zona de estudio

2.1.1 Localización de zona de estudio

La presente investigación se realizó en el camal municipal del Cantón Arenillas de la Provincia de El Oro. Arenillas se encuentra ubicada en la parte sur occidental del Ecuador, la cual cuenta con las siguientes características y coordenadas:

- Extensión: 810.17km2
- Altura: 15 msnm
- Clima: tropical
- Temperatura: 18°C - 30°C

Figura 3. Mapa geográfico del cantón Arenillas

Fuente: Google Maps

Las muestras fueron recolectadas en el camal del cantón Arenillas, el mismo que se encuentra ubicado en la ciudadela San Isidro vía la Arenilla- La Cuca, limita al norte con una zona agrícola (banano y cacao), al sur con el Batallón de Infantería Militar BIMOT, al Este con zona agrícola (banano y cacao) y al Oeste con el Batallón de Infantería Militar BIMOT. Siendo estas las coordenadas del camal 3°32'36.8"S 80°04'02.3"W **-3.543598, -80.067329.**

Figura 4. Mapa satelital del camal Municipal del Cantón Arenillas

Fuente: Google Map

En cuanto a la parte microbiológica de la realizo en la ciudad de Guayaquil en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, en el laboratorio de Leptospira, ubicado en la Av. Juan Tanca Marengo No 100 y Av. De las Américas.

Figura 5. Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI)

Fuente: Google Map

Figura 6. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) – Sanidad Animal (Área de zoonosis)

Fuente: Google Map

2.1.2 Características de la zona de estudio

El camal municipal de Arenillas es un centro de faenamiento de carácter público en donde se sacrifican cerdos y bovinos como animales de abasto. Al camal llegan animales de distintas regiones siendo la región Costa la mayor procedencia de animales faenados. El horario de sacrifico comienza a las 10 pm y termina a las 3 am de la madrugada, los días de faenamiento son de lunes a viernes y el número de bovinos a faenar varía por día, pudiendo haber entre 30 – 50 u entre 6 - 15 animales a faenar. Actualmente el camal fue

modernizado técnicamente para ofrecer una adecuada instalación higiénica y operativa durante el sacrificio de los animales.

2.2 Materiales

2.2.1 De campo

- ✓ Botas
- ✓ Overol
- ✓ Casco
- ✓ Guantes
- ✓ Cooler
- ✓ Pilas refrigeradas
- ✓ Envases plásticos (envase de examen de orina)
- ✓ Cuchillo
- ✓ Empaques ziploc
- ✓ Cloro al 5%
- ✓ Cubeta de 4L
- ✓ Hojas de registro
- ✓ Marcador permanente
- ✓ esferográfico
- ✓ Cámara fotográfica

2.2.2 De Laboratorio

- ✓ Batas quirúrgicas desechables
- ✓ Guantes
- ✓ Mascarillas 3M N95
- ✓ Cofias
- ✓ Zapatones
- ✓ Hisopos esterilizados
- ✓ Baja lenguas esterilizadas
- ✓ Gradillas
- ✓ Tubos de ensayo

- ✓ Papel de empaque
- ✓ Criotubos
- ✓ Morteros con mango
- ✓ Bisturís
- ✓ Mango de bisturís
- ✓ Pinza anatómica
- ✓ Algodón
- ✓ Placas porta objeto esmeriladas
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Asas bacteriológicas desechables
- ✓ Papel filtro
- ✓ Fosforo
- ✓ Pinzas
- ✓ Gafas

2.2.3 Equipos

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

2.2.4 Sustancias y reactivos

- ✓ Soda al 4%
- ✓ Agua destilada
- ✓ Alcohol industrial al 70%
- ✓ Alcohol – acido
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Colorantes: fucsina fenicada y azul de metileno
- ✓ Medios de cultivo: Ogawa Kudoh (OK) y Stonebrink (ST)
- ✓ Cloro

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Técnicas e instrumentos de investigación

- ✓ Recolección de muestras ganglionares, linfonodos con alteraciones que sugieren la presencia del Mycobacterium en bovinos faenados, especialmente en los días donde más faenan (viernes y sábado) trabajo que se ejecutó durante un mes.

- ✓ Siembra en medios de cultivo especializados para Mycobacterium en este caso se usaron el Okawa y Stonebrink, se hace revisión cada 8 días para observar el crecimiento bacteriano en cada muestra en proceso en los medios de cultivos durante 6 semanas.

- ✓ Baciloscopia de las colonias, una vez que se ha obtenido el crecimiento de los Mycobacterium en los medios de cultivos, se realizó la tinción para determinar la presencia del microrganismo utilizando la técnica de tinción Ziehl Neelsen.

2.3.2 Población y Muestra

La población utilizada fueron los bovinos que ingresaron al camal Municipal de Arenillas durante el mes de noviembre del 2019, en esta se procedió a observar y revisar los linfonódulos de todos los bovinos faenados y se recolectaron todos aquellos que cumplían con los requisitos y características propias de la enfermedad para la inclusión en la presente investigación.

2.3.3 Diseño de la investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo observacional, transversal, prospectivo y analítico. Se estimó la prevalencia de tuberculosis bovina utilizando técnicas de inspección macroscópica de linfonódulos, de los seleccionados por sus características se realizó cultivos especializados y a su vez de estos se procede a analizar con la técnica de PCR. Además, se evaluó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre animales enfermos con tuberculosis bovina en las variables raza, sexo, edad y lugar de procedencia.

2.3.4 Variables de estudio

Se analizaron las siguientes variables:

- ✓ Animales positivos a tuberculosis bovina
- ✓ Raza
- ✓ Sexo
- ✓ Edad
- ✓ Lugar de procedencia

2.3.5 Metodología de trabajo

La investigación se la realizo en dos fases: de campo y laboratorio. La primera fase la cual comprendió la recolección de muestras en el camal de arenillas durante el mes de noviembre del 2019 la cual consistió en tomas muestras de ganglios linfáticos retrofaríngeos y cervicales, mediastínicos y lesiones pulmonares los cuales presentan algún tipo de alteración mediante la inspección clínica post-mortem. La segunda fase comprendió todo el análisis de laboratorio realizado en el Instituto Nacional de investigación en Salud Pública (INSPI) en el área de zoonosis donde se realizó siembras en cultivo microbiológico de las muestras ganglionares de los bovinos sospechosos, los cultivos que se utilizaron fueron *Ogawa Kudoh* (OK) y *Stonebrink* (ST), además de la Baciloscopia de las colonias que se desarrollaron en los medios de cultivo, utilizando la técnica de *Ziehl Neelsen* (ZN) y posteriormente para confirmar las muestras positivas con PCR – LAMP.

2.3.5.1 Análisis y recolección de muestras

- *Muestreo en el camal*

La fase de campo consistió en la recolección de muestra de ganglios que presentaban alteraciones que se asemejen a las lesiones por causa del *M. bovis*, el muestreo se lo realizo durante un mes en los días en que llegan más animales para el faenamiento. A continuación, se detallará paso a paso lo realizado en esta fase:

- La hora de faenamiento en el camal de arenillas son de las 10:00pm hasta la 3:00 am, entonces lo primero fue realizar una inspección al ganado previamente a ser faenados donde se diagnosticó clínicamente cuales podrían ser los animales

sospechosos a la enfermedad, además de recoger todos los datos de cada animal como edad, sexo, raza, procedencia y tipo de ganado. Pero cabe recalcar que de igual manera se inspecciono a nivel ganglionar a cada animal luego del faenamiento.

- En el caso de este camal posee solo una línea de faenado por lo que el proceso de faenamiento se lo realiza del siguiente orden: aturdimiento, degollado y desangrado, descuerado, eviscerado y despiece. En nuestro caso se intervino en el eviscerado es decir una vez sacadas las vísceras del animal se las colgaba y ahí se realizó la inspección de los ganglios pulmonares (mediastínicos y traqueos bronquiales) y retrofaríngeos. Los ganglios que se escogieron fueron los que presentaban una coloración oscura y alteración de tamaño.

- Una vez extraída la muestra se le realizo un corte trasversalmente con la ayuda de un cuchillo, si la muestra presenta alteraciones se realiza el debido empacado de la muestra, se la guardo en un envase de plástico (envase para examen de orina) luego aquel envase se lo guarda en una funda ziploc. Se realizó el rotulado de la muestra y se lo guardo al Cooler que poseía las pilas refrigeradas seguidamente refrigerados hasta realizar su debido sembrado en los medios de cultivo. Cabe recalcar que en cada revisión o corte que se realizó con el cuchillo este pasaba por 5 segundo en cloro desinfectándolo para realizar la siguiente inspección.

- Ya empacadas las muestras se las refrigera hasta transportarlas al laboratorio a Guayaquil, se las transporto sumamente selladas y guardando la cadena de frio, las muestras se las recolecto los viernes y sábados, las respectivas muestras fueron sembradas los días lunes o martes, durante las 4 semanas de muestreo en el mes de noviembre.

➢ *Siembra en los medios de cultivo microbiológicos*

La siembra de las muestras se realizó en los medios de cultivo: *Ogawa Kudoh* (OK) y *Stonebrink* (ST), las muestras fueron cultivadas por duplicado en cada medio de cultivo y luego incubadas a una temperatura de 37°C, las primeras 24 horas los tubos quedaron

semi abiertos en una posición horizontal y luego se los tapo bien y se los puso verticalmente. En donde se detallará a continuación todo el proceso:

- Antes de realizar la siembra se preparó la cabina de seguridad biológica utilizando papel de despacho sobre la base de la campana para posteriormente colocar todos los materiales que se utilizó para realizar la siembra.

- Luego se ingresó a la cabina todos los materiales que se utilizó haciendo una división imaginaria separando lo estéril con lo no estéril para evitar cualquier tipo de contaminación en el proceso. Incluidas las muestras de los ganglios a sembrar, en los medios de cultivos.

- Posteriormente ya equipada totalmente la cámara y tomando toda la precaución el tesista se procedió a realizar la siembra. Con una baja lengua se colocó la muestra dentro de una capsula de porcelana para realizar el macerado de la misma, pero antes de realizar el macerado se escogió la porción más afectada haciéndole cortes con la ayuda del bisturí, se procedió a macerar la muestra en 1ml de agua destilada estéril con la ayuda del mortero se macera la muestra hasta tener una mezcla homogénea.

- Ya obtenida la mezcla homogénea se cogió un hisopo estéril y se lo humedeció con la muestra macerada evitando tomar grumos envolviéndolo en puntos diferentes del envase para abarcar toda la muestra, ya humedecido el hisopo se lo traspaso a un tubo el cual poseía hidróxido de sodio a una concentración del 4% (soda), por 2 minutos, el tiempo que la muestra permanece dentro de la soda es primordial para descontaminar y si la exposición es mayor se puede matar o inactivar al *Mycobacterium*.
  - Transcurrido el tiempo de descontaminación, se retira el hisopo escurriendo la mayor cantidad posible de soda y se realiza la siembra en los medios de cultivos con los tubos rotulados y como se uso dos tipos diferentes de medio de cultivo se utilizó un hisopo por cada tubo, se introduce el hisopo en el fondo del medio de cultivo sin tocar las paredes y el agar, se realiza la siembra de abajo hacia arriba en forma giratoria y estrías (zigzag). Los medios de cultivo fueron Ogawa Kudoh y Stonebrink, cada uno con dos tubos (en total 4 tubos por muestra). Se realizó lo mismo con cada muestra y se va descartando el material utilizado (hisopos, baja

lengua, bisturí y restos de macerado) en un envase plástico de boca ancha tapa rosca con cloro al 5%.

- Los sobrantes de cada muestra fueron almacenados en microtubos rotulados para realizar resiembras si el caso lo amerita o para seguir con la investigación. La totalidad de tubos sembrados que poseían los medios de cultivo tanto como Ok y St fueron 64 tubos.

➢ *Incubación y lectura de cultivos*

Los tubos sembrados y rotulados se los coloca ordenadamente en una gradilla para luego llevarlos a una estufa a 37°C, los tubos deben estar semi-tapados y en forma horizontal durante 48 horas para permitir el intercambio de gases, esto debido a que el bacilo es aerobio estricto. Una vez transcurrido el tiempo se procede a levantar los tubos y a cerrarles la tapa completamente, se los mantiene en la estufa hasta la sexta semana a temperatura constante, se realizan las revisiones semanalmente. La primera lectura de la primera muestra se la realizó a los 7 días después de la siembra, de la misma forma se procedió con todas las muestras recogidas semanalmente durante un mes.

En las revisiones semanales, si en el proceso se observaba algún tipo de contaminación en los medios de cultivo se procede a realizar las resiembras aislando la o las colonias que posiblemente sean positivas; pero en este caso no se realizó ninguna resiembra de las muestras en nuevos medios de cultivos. El crecimiento bacteriano se comenzó a observar a partir de la segunda siembra, la primera siembra hubo crecimiento alguno hasta la sexta semana de incubación.

➢ *Inactivación y Conservación de colonias bacterianas*

Para esta etapa de la investigación ya habían pasado 5 semanas de la primera siembra por ende ya se comenzó a aislar las colonias bacterianas que crecieron en los medios de cultivos. En este caso hasta la quinta semana de incubación de la primera siembra no hubo nada de crecimiento por lo que se eliminó todos los tubos, a la siguiente semana se realizó la conservación de todas las colonias que crecieron en este caso de la segunda y tercera siembra las cuales ya presentaron crecimiento y las colonias ya tenían un buen tamaño

además que ya habían pasado las primeras 5 semanas. A continuación, se detallará el trabajo que se realizó en el INSPI (central).

- Se procedió a equiparse siguiendo todas las normas de bioseguridad para el trabajo a realizarse, una vez ya equipados se extrajo los tubos con medios de cultivo Ok y St, y se ubicó ordenadamente siguiendo secuencialmente al número de muestras y se eliminó los tubos que no presentaban crecimiento y que haya el tiempo máximo de incubación.

- Ya ordenados los tubos se procede a preparar la cabina de seguridad biológica para hacer el debido proceso, se ingresa a la cabina todo el material a utilizar incluyendo los tubos, luego se rotulo los criotubos en donde se aisló las colonias y luego para conservarlas en congelación a -86°. Cabe recalcar que en los medios de cultivos crecieron de 2 a más colonias por ende en el momento de aislar se rotulo los criotubos según la coloración de la colonia de cada tubo, siguiendo el orden adecuado de las muestras.

- Ya rotulados los criotubos se comenzó a aislar, con la ayuda de una pipeta calibrada en 700 se absorbió con la misma agua destilada estéril y se colocó en cada criotubo, luego con la ayuda de un asa descartable evitando topar las paredes del tubo y evitando extraer agar del tubo se escogió a cada colonia que se encontraban en los medios de cultivo de cada tubo y se las coloco dentro de los criotubos haciendo movimiento rotativos para que la colonia quede dentro y posteriormente se desecha el asa utilizada con cada colonia y ese mismo procedimiento se lo hizo con todas la colonias.

- Luego los criotubos fueron ubicados en un termobloque (accublock digital dry bath) donde fueron sometidos a una temperatura de 87°C por 30 minutos para el proceso de inactivación de las colonias bacterianas.

- Luego los criotubos fueron ubicados en una caja de congelación para conservarlos a una temperatura de -86°C. Para posteriormente aplicar la Baciloscopia utilizando la técnica de coloración *Ziehl Neelsen*.

2.3.5.2 Baciloscopia

La Baciloscopia es un examen microscópico que se lo emplea en todas las investigaciones bacteriológicas de tuberculosis ya sea de tipo animal o humano, se basa en la capacidad de las micobacterias para incorporar y retener ciertos colorantes ante la acción de ácido y alcohol propiedad conocida como acido-alcohol-resistente. Que se puede efectuar mediante dos técnicas: *Ziehl Neelsen y Kinyoun*, siendo la primera la que se utilizó en esta investigación (58). La Baciloscopia se realizó a los medios que presentaron desarrollo de colonias mediante la técnica de tinción de *Ziehl Neelsen* para determinar la presencia de bacilos ácido – alcohol resistente (BAAR).

- *Rotulación de placas portaobjeto*

Esta etapa de la investigación se la realizo en el INSPI, en el área de zoonosis, se procedió a equiparse totalmente tomado todas las nomas de bioseguridad, se saca las colonias bacterianas de congelación y se las ordeno para facilitar la rotulación de la placa. De la misma manera que en el sembrado de los cultivos se prepara la cabina de seguridad biológica colocando papel de empaque sobre la base de la cabina y se colocan los materiales junto a las placas rotuladas con lo microtubos que poseen las colonias bacterianas ya descongelados.

- *Preparación de las placas*

Una vez que estén todos los materiales dentro de la cabina se procede a realizar las placas, con la ayuda de una pipeta Pasteur calibrada aproximadamente para una gota, se absorbe de los microtubos donde están las colonias inactivadas y se coloca sobre el porta objeto y con la misma pipeta se hace el extendido de forma circular, la punta de la pipeta se la elimina en un bote de boca ancha con cloro y se pone a secar la placa a temperatura ambiente para proceder con la tinción, ese procedimiento se lo realiza con todas las muestras.

- *Tinción de Ziehl Neelsen*

Ya secas las placas se las saca de la cabina de bioseguridad y se las llevó al lugar donde se realizó la tinción, aquel lugar previamente se lo amobló según las capacidades del laboratorio evitando que se produzca mucha contaminación, el lugar fue en un reservorio (lavabo) con tenia una llave de agua, se lo forro con plástico para evitar manchar las paredes, listo el lugar se ubica una rejilla como soporte para ubicar las placas, las placas se las ubica dejando un espacio considerable entre ellas que permitan moverlas con facilidad.

Se corta papel filtro en cuadros el tamaño aproximadamente que tape el extendido y se lo coloca sobre la misma en cada una de las placas, luego se prepara los colorantes que se utilizan en esta técnica que son la fucsina, alcohol y el azul de metileno. En este caso se hicieron 3 repeticiones de 5 placas en cada repetición. Lista las placas se procedió a realizar la primera coloración que fue con la fucsina fenicada sobre cada placa hasta cubrirla totalmente, la fucsina se la deja actuar durante 5 minutos tiempo suficiente para que esta penetre adecuadamente en los bacilos y se fije a sus lípidos, en el transcurso de ese tiempo se flamea con un mechero envuelto de algodón y embebido de alcohol industrial por debajo de los extendidos con movimientos de vaivén hasta producir tres emisiones de vapor. Y si se seca el colorante se le coloca más fucsina para evitar que se queme el papel filtro, claro este si es que el caso lo amerita. Además, se tuvo en cuenta que no hierva la fucsina ya que la pared de los bacilos se puede destruir y por ende resultar una mala coloración.

Transcurrido los 5 minutos y realizado el flameado se procede a quitar el papel filtro con la ayuda de una pinza desechándolos en un envase plástico. Se enjuago las placas con agua del grifo, pero teniendo en cuenta que el chorro sea muy suave evitando que caiga directamente sobre la tinción, enjuagando ambos lados, luego de enjugar las placas se las vuelve a colocar en el mismo lugar y se les agrega alcohol – acido sobre cada placa con una pipeta durante un minuto. Se vuelve a enjuagar así mismo con el chorro de agua lento evitando que caiga sobre la tinción.

Luego se realiza una contra tinción con el azul de metileno después de enjuagar las placas se las vuelve a ubicar y se les agrega el colorante con la ayuda de una pipeta dejando que actúe durante un minuto, luego de este tiempo se lava con agua corriente y se deja secar

a temperatura ambiente colocándolos en un soporte portaobjetos, luego de lo cual se procede a la lectura en el microscopio. Y se realizó el mismo procedimiento con todas las placas.

- *Lectura de placas*

Una vez secas las placas teñidas se hizo la lectura en el microscopio, la cual se deben cumplir dos objetivos determinar si en el extendido hay BAAR y si lo hay cuantificar aproximadamente la riqueza de bacilos. esta etapa de la investigación se la realizo en el INSPI área de zoonosis, se procedió a limpiar los lentes del microscopio, se colocó la placa observando con el lente de 40x para ver si es que había una coloración rojiza si existía aquella coloración se aumentaba el lente a (100x) de inmersión observando cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico siguiendo un recorrido en líneas rectas, sistemático para recorrer el extendido evitando repetir la lectura de algunos campos por ejemplo de izquierda a derecha y así identificar los bacilos es decir que si lo bacilos presentaban una coloración rojiza por la fucsina entonces eso indico que el resultado era positivo a BAAR. Para facilitar la observación se colocó aceite de inmersión en el extendido, y se fue aplicando el mismo procedimiento en las 23 placas teñidas de 16 muestras.

Hay que tener en cuenta en que si se observa BAAR y se mueven en forma anormal estos bacilos pudieron ser provenientes de otra Baciloscopia que fueron arrastrados por el aceite de inmersión por en donde es necesario repetir la Baciloscopia.

2.3.5.3 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.

3 RESULTADOS

Se mostrarán los resultados obtenidos en la investigación sobre la Prevalencia de Tuberculosis bovina en el Cantón Arenillas de la Provincia de El Oro, tomando en cuenta todos los objetivos planteados.

3.1 Determinación de la presencia de linfonodos alterados en animales muestreados

La representación en el grafico 2 muestra los resultados obtenidos de la población total de animales que fueron inspeccionados durante el faenamiento en el mes de noviembre del 2019, por lo que de los 78 animales faenados el 79,5% no presentaron alteraciones en sus ganglios y el 20,5 % si se observó lesiones macroscópicas en cuanto al color y a su tamaño por lo que según las alteraciones observadas se asemejan a las que causa esta enfermedad a nivel ganglionar, siendo ese el criterio para seleccionar la muestra.

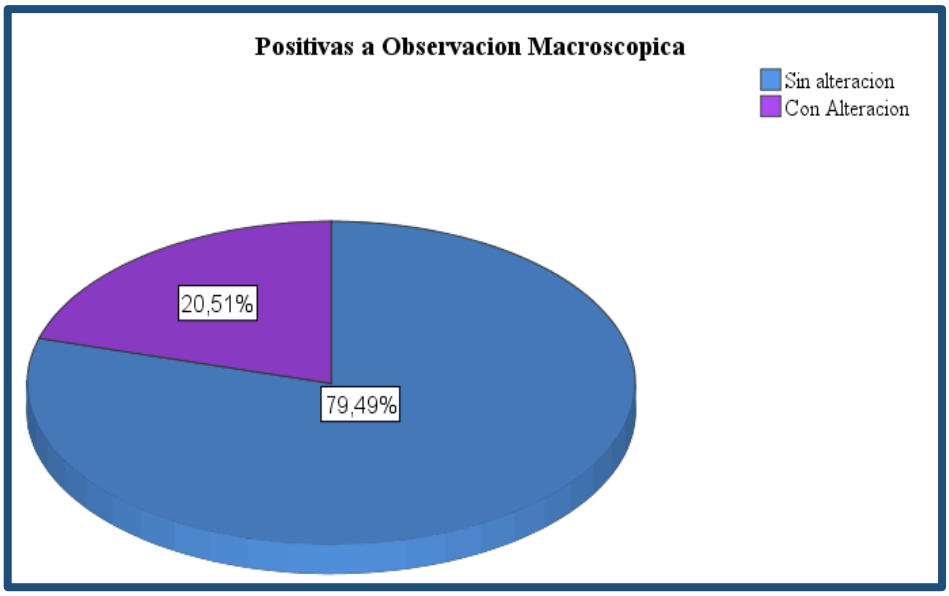


Grafico 2. Proporción de la población bovina inspeccionada según la presencia de alteraciones compatibles con Tuberculosis bovina.

Fuente: Autor

3.2 Identificación de la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) como causa de lesiones ganglionares

El grafico 3 representa el porcentaje de animales positivos y negativos a Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR), estos datos fueron obtenidos al aplicar baciloscopia después de haber realizado la tinción Ziehl Neelsen a colonias bacterianas aisladas de los medios de cultivo Ogawa Kudoh (OK) y Stonebrink (ST). A su vez, la tabla 7 indica que, de las 16 muestras obtenidas con lesiones compatibles a TBB, el 9% (7/16) fueron positivas a BAAR, esto quiere decir que 7 muestras presentaron bacilos ácido-alcohol resistentes. No obstante, el 11,5 % (9/16) de animales fueron negativos a BAAR.

Tabla 2. Resultados de baciloscopia de colonias aisladas de los medios de cultivo Ogawa Kudoh y Stonebrink

Baciloscopia BAAR / Medios OK y ST			
		Frecuencia	Porcentaje
Válido	Negativo	9	11,5
	Positivo	7	9,0
	Total	16	20,5
Total		78	100,0

Fuente: Autor

3.3 Determinación de muestras positivas a BAAR en el Diagnostico microbiológico en medio de cultivo Ogawa Kudoh

El gráfico 3, indica que de las 16 muestras obtenidas el 69 % de las muestras resultaron negativas y el 31% de las muestras dieron positividad a BAAR confirmadas con baciloscopia a través de la técnica de coloración Ziehl Neelsen para el medio de cultivo Okawa Kudoh.

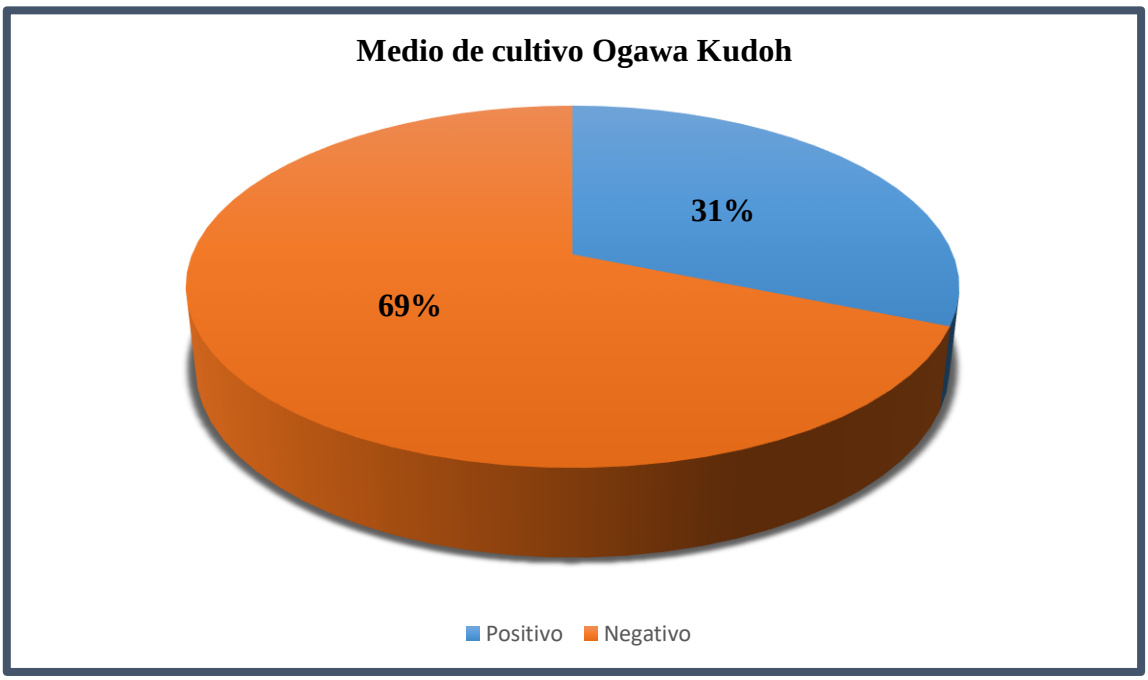


Grafico 3. Muestras positivas y negativas a BAAR en el medio de cultivo Ogawa Kudoh

Fuente: Autor

3.4 Determinación de muestras positivas a BAAR en el Diagnostico microbiológico en medio de cultivo Stonebrink

La presentación que se ve en el grafico 5 nos indica que de las 16 muestras obtenidas el 62,5 % de las muestras resultaron negativas y el 37.5 % de las muestras dieron positividad a BAAR confirmadas con baciloscopia a través de la técnica de coloración Ziehl Neelsen para el medio de cultivo Stonebrink.

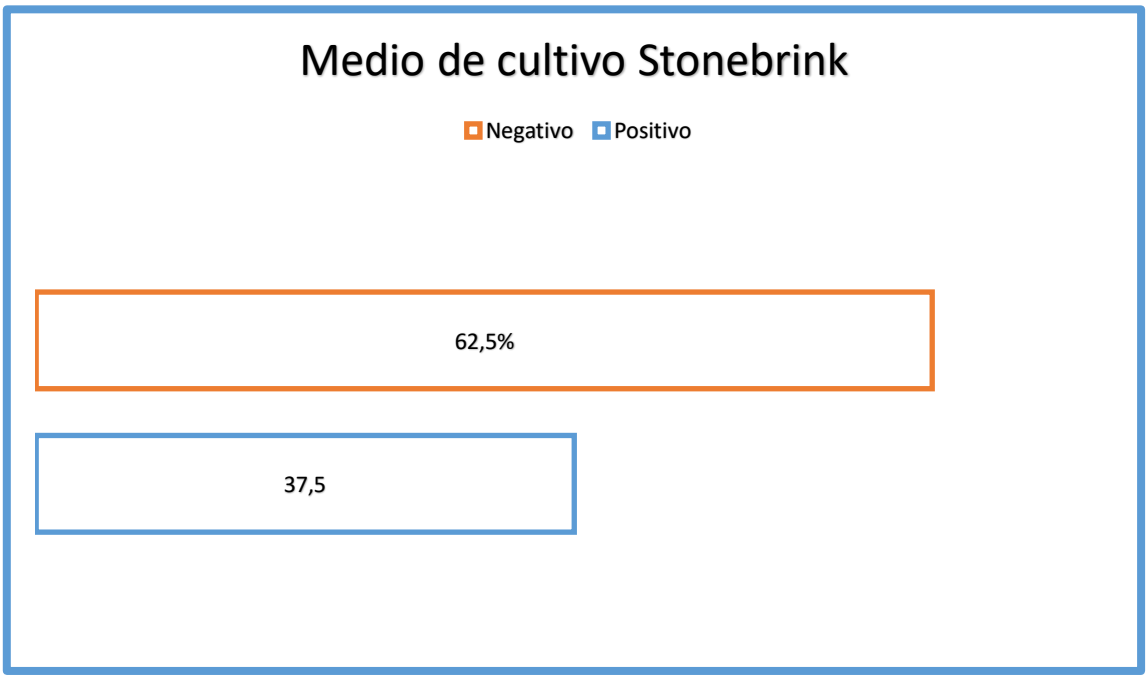


Grafico 4. Cantidad de muestras positivas y negativas a BAAR en el medio de cultivo Stonebrink

Fuente: Autor

3.5 Determinación de la Prevalencia de Tuberculosis bovina mediante la técnica PCR-LAMP

Tabla 3. 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 atípicas	5	73	6,40
M. Tuberculosis	-	-	0
M. bovis	-	-	0

En la tabla 3 refleja 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 cultico Ogawa Kudoh y Stonebrink, en donde se obtuvo el 6,41 % de positividad para micobacterias atípicas y el 0% tanto para M. tuberculosis y M bovis.

3.6 Asociación estadística

3.6.1 Variable Raza

Los datos que se presentan en la tabla 6 muestran que según la variable raza el 100% (16/16) de los animales muestrados con alteraciones en linfonodos todos son de raza mestiza datos analizados tanto en el estudio microbiológico confirmados con el estudio de PCR – LAMP.

Tabla 4. Prevalencia de Tuberculosis bovina de acuerdo a la raza

RAZA DE BOVINOS				
Raza	**Frecuencia**	**%**	**Resultados de PCR-LAMP**	
			Mycobacterium atípicas	***M bovis***
Mestiza	16	100	100%	0%
Total	16	100	100%	0%

No se han calculado medidas de asociación porque la variable raza es una constante.

3.6.2 Variable Edad

En cuanto a la variable edad los resultados obtenidos según la cantidad de muestras obtenidas se dice que, de 16 animales con alteraciones ganglionares compatibles con tuberculosis, el 18,75% (3/16) representa animales entre 2-4 años; el 43,75% (7/16) tenían de 4-6 años; el 31,25% (5/16) fueron de edad entre 6-8 años y el 6,25% (1/16) fue de entre 8-10 años. Esto se ve reflejado en el gráfico 6 y la tabla 6. Por lo que le rango de 4-6 años fueron los animales que presentan las alteraciones compatibles con la TBB.

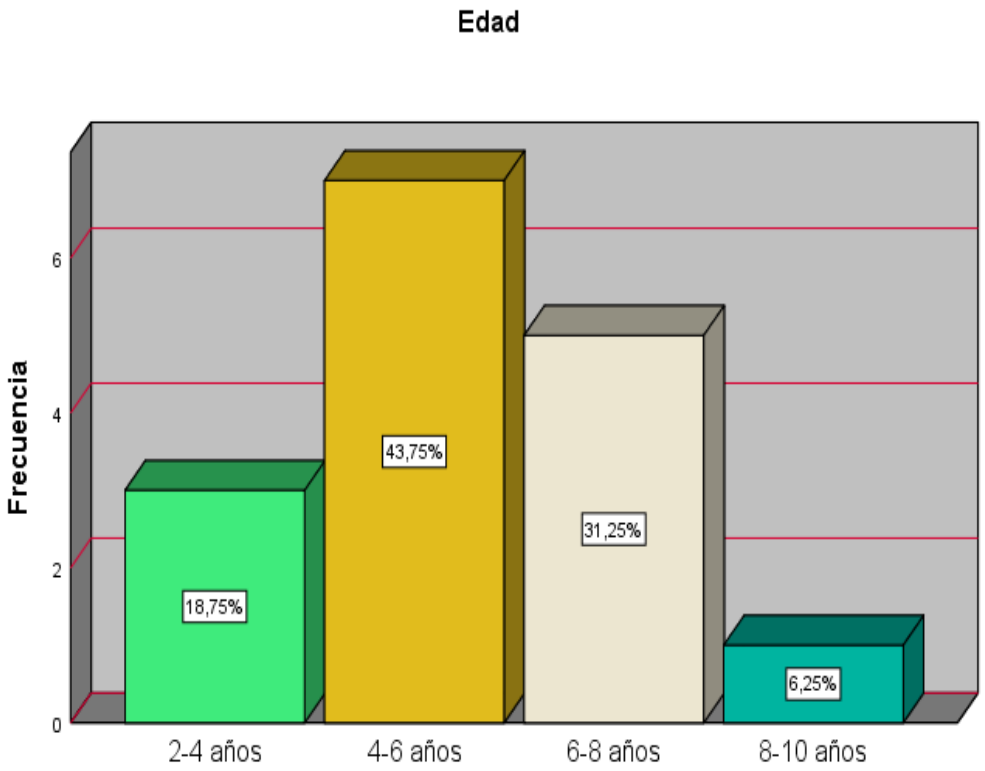


Grafico 5. Porcentaje de animales muestrados de acuerdo al rango de edad obtenidos en el estudio microbiológico.

Fuente: Autor

Tabla 5. Prevalencia de Tuberculosis bovina de acuerdo a la edad

RANGO ETARIO				
	Frecuencia	**%**	**Resultados de PCR-LAMP**	
			Mycobacterium atípicas	***M bovis***
2-4 años	3	18,75	0%	0%
4-6 años	7	43,75	3,84%	0%
6-8 años	5	31,25	2,56%	0%
8-10 años	1	6,25	0%	0%
TOTAL	16	100	6,40%	0%

Fuente: Autor

3.6.3 Variable sexo

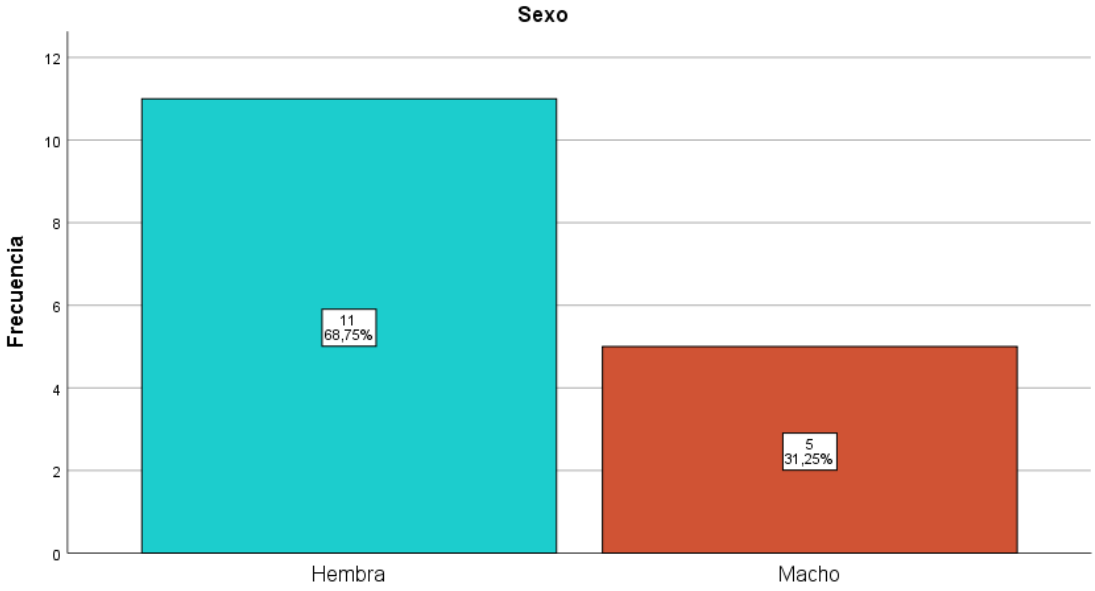
De los animales evaluados en el camal municipal del Cantón Arenillas provincia de El Oro, en función del sexo del animal, se estableció que, del total de 16 muestras con lesiones macroscópicas, 11 fueron de hembras con el 68,75% y el 31,25% responde a machos. Esto se puede observar en la tabla 8 y gráfico 8.

Tabla 6. Prevalencia de Tuberculosis bovina según el sexo

SEXO				
	Frecuencia	**%**	**Resultados de PCR-LAMP**	
			Mycobacterium atípicas	***M bovis***
Hembra	11	68,75	5,12%	0%
Macho	5	31,25	1,28%	0%
TOTAL	16	100	6,40%	0%

Fuente: Autor

Grafico 6. Frecuencia de animales muestreados con respecto al sexo



Fuente: Autor

3.6.4 Variable procedencia

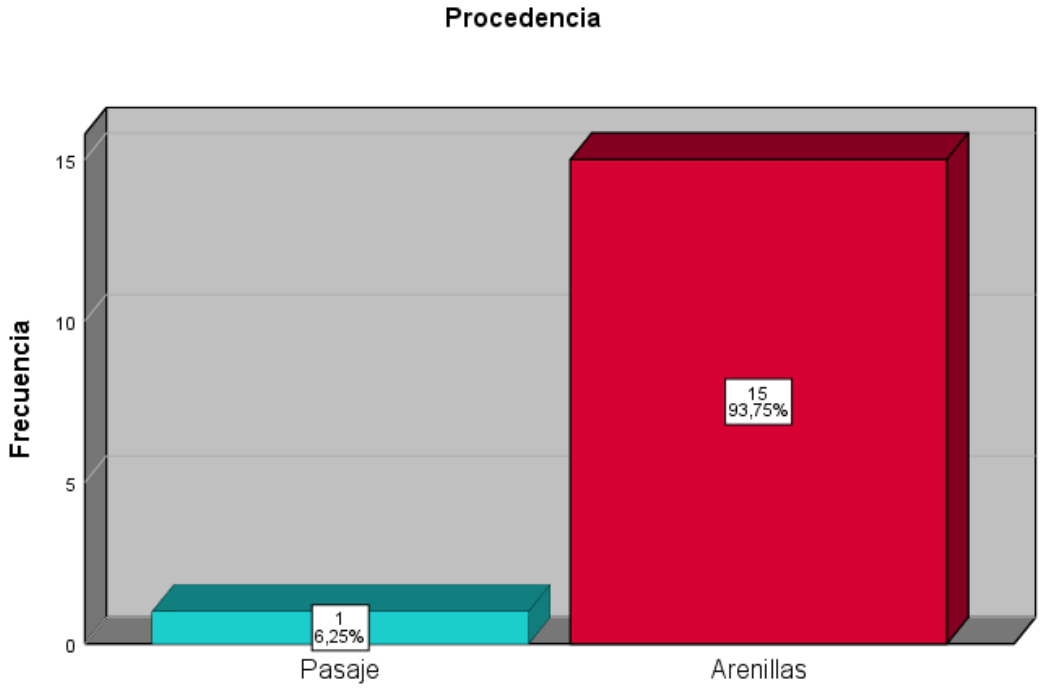
En el gráfico 8 se puede observar el lugar de procedencia y datos de frecuencia de los animales muestreados que presentaron alteraciones ganglionares compatibles con tuberculosis bovina. Con respecto a la tabla 11, es importante mencionar el 93,75% (15/16) provinieron del cantón Arenillas, recalcando que pueden ser de cualquier sitio del propio cantón y el 6,25% (1/16) del cantón Pasaje.

Tabla 7. Prevalencia de tuberculosis bovina según el lugar de procedencia

LUGAR DE PROCEDENCIA				
	Frecuencia	**%**	**Resultados de PCR-LAMP**	
			Mycobacterium atípicas	***M bovis***
Arenillas	15	93,75	6,40%	0%
Pasaje	1	6,25	0%	0%
TOTAL	16	100	6,40%	0%

Fuente: Autor

Grafico 7. Datos de frecuencia del lugar de procedencia de bovinos muestreados



Fuente: Autor

3. DISCUSIÓN

Según las estadísticas, se dice que la prevalencia de la tuberculosis bovina a nivel de Latinoamérica el 70% se encuentra en áreas donde las tasas de infección de *M bovis* son superiores al 1%, de un aproximado de 374 millones de bovinos (59). Según Ritacco y colaboradores (60) en el año 2006, menciona que el Ecuador se encuentra en una categoría superior al 1%. Por ende, si bien es cierto que en nuestro país se han venido haciendo investigaciones sobre la TBB, no se tiene un valor exacto de la prevalencia, recalcando que los métodos de diagnóstico que se han venido aplicando son variados.

La prevalencia de TBB de 7,69%, encontrado en este estudio investigativo a nivel ganglionar, dato adquirido del diagnóstico a través de los cultivos microbiológicos, son inferiores a los datos obtenidos por Muñoz (48), quien mediante la técnica de Baciloscopia con el método de tinción Ziehl Neelsen y la inspección macroscópica de los ganglios, encontró el 27,56% de prevalencia de TBB en el cantón Loja. Lo que se supone que el método que el aplico en su investigación sabiendo que se asemejan ambas investigaciones tiene más sensibilidad para detectar la presencia de M. bovis en los hatos ganaderos. Además de que según su investigación y comparada con esta, según los datos en el frotis directo hay más posibilidad de encontrar al bacilo.

El aislamiento de bacilos ácido alcohol resistente por medio de cultivo, comparado con el trabajo realizado por Dubarry y colaboradores (61) indica que, el mayor porcentaje de aislamiento se obtuvo en el medio de cultivo Stonebrink en relación al medio Lowenstein Jensen ya que el menciona que este medio es altamente específico para *M bovis* (cercano al 100%), por lo que Dubarry obtuvo un 71,15% de aislamientos positivos en el medio ST, mientras que en nuestro estudio se obtuvo un 7,69 % de aislamientos positivos a BAAR en el medio Stonebrink en relación al medio Ogawa Kudoh. En cambio en la investigación de Mora (62), que recolectaron 50 muestras de 2,178 animales faenados obteniendo 5 muestras positivas a *M. bovis*, las cuales tuvieron un crecimiento lento en el medio de cultivo St. A comparación de nuestra investigación donde recolectamos 16 muestras en una población de 78 animales de las cuales se obtuvo seis muestras positivas para el medio de cultivo St.

Considerando el tiempo de crecimiento de Mycobacterium en los medios de cultivo. Ikuta, y colaboradores (63) indican que su estudio consistió en evaluar el aislamiento de Mycobacterium según condiciones de incubación en medios de cultivo a base de huevo y agar, en él describe que a los 30 días (semana 4) obtuvo un aislamiento del 41% en el medio ST, mientras que en nuestro estudio la mayor proporción de las colonias de Mycobacterium en el mismo medio se obtuvo en la semana 3, habiendo una semana de diferencia en relación al tiempo de crecimiento.

En relación a las variables, los resultados positivos obtenidos en nuestro estudio en cuanto a sexo, coinciden con el trabajo de Cruz y Pozo (64) en que, la mayor proporción de aislamientos positivos a BAAR. fue superior en hembras, al igual que el nuestro que el aislamiento fue también superior en hembras en comparación a los machos. En relación a la edad, según Cruz y Pozo indican que la mayor proporción la obtuvieron en animales jóvenes (vaconas) con un 50%, mientras que en nuestro estudio no se asemejan ya que la mayor proporción se las encontró en animales con un rango de edad de 4 a 6 años.

En cuanto a la prevalencia de Tuberculosis bovina en el Cantón Arenillas no existen registros de investigaciones anteriores al 2017 en la que Ramos (5) realizo una investigación sobre la prevalencia de TBB utilizando como medio de diagnóstico la Prueba de la Tuberculina, lo realizo en la parte baja de la Provincia de el Oro, incluido Arenillas, donde obtuvo el 0 % de prevalencia de TBB.

4. CONCLUSIONES

La prevalencia de Tuberculosis Bovina en el cantón Arenillas a nivel de camal es del 0%. Sin embargo, existe la presencia del 6,40% de Mycobacterium atípicas.

- Mediante el análisis patológico macroscópico se determinó que el 20,51% 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 43,75% de positividad para bacilos ácidos alcohol-resistente (BAAR). Por lo que es la causa de las lesiones de los linfonodulos.

- 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 5,12% en hembras y el 1,28% en machos. En cuanto a la edad se obtuvieron los datos según rangos, donde el 3,84% en bovinos de 4-6 años de edad, seguido por el 2,56% 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 4 a 6 años. Con respecto a la procedencia todas las reses faenadas son del cantón Arenillas. 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.

5. RECOMENDACIONES

Como ya es conocimiento de todo el mundo la TBB es una enfermedad que puede ser adquirida por el humano, por ende, es necesario realizar todos los diagnósticos posibles para poder determinar la presencia o no de esta bacteria en los bovinos, es recomendable realizar el diagnóstico molecular a todas las colonias sometidas a la baciloscopia para poder determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas.

Realizar análisis comparativos en los animales que son sospechosos entrelazando métodos de diagnóstico como por ejemplo si hay animales que son reactores positivos o no a la prueba de Tuberculina seria primordial que aquellos animales sean analizados también con las pruebas microbiológicas para así caracterizar las lesiones compatibles y además identificar el grado de diagnóstico certero entre cada una de ellas.

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

Realizar estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad a humanos, siendo considerados los más vulnerables es decir los que mantengan una estrecha relación con animales como por ejemplos en explotaciones lecheras y mataderos, además de concientizar o emplear estrategias para dar a conocer el potencial y así tomar las prevenciones necesarias.

Recomendar a las autoridades del país encargadas de este tipo de enfermedades que es el Ministerio de Salud Pública y Agrocalidad que trabajen en forma coordinada y establecer responsabilidades tanto en salud humana y sanidad animal.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Proaño-pérez F, Benítez-ortiz W, Portaels F, Rigouts L. Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. Rev Panam en salud publica [Internet]. 2011;30(9):279–86. Available from: https://scielosp.org/article/rpsp/2011.v30n3/279-286/

2. 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

3. Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJM, Parsons SDC, et al. induced Tuberculosis in Humans. 2013;19(6):899–908. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816377/pdf/12-0543.pdf

4. Hawn TR, Day TA, Scriba TJ, Hatherill M, Hanekom WA, Evans TG, et al. Tuberculosis Vaccines and Prevention of Infection. 2014;78(4):650–71. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4248657/pdf/zmr650.pdf

5. Ramos N. Determinación de prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de hatos ganaderos en la parte baja de la provincia del Oro [Internet]. 2017. Available from: http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/11718

6. Aymerich CP, Domínguez J, Ausina V. Mycobacterium bovis. Control de Calidad para Laboratrorio, ejemplo. Control Calid SEIMC [Internet]. 2003; Available from: https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micobacterias/Mbovis.pdf

7. Pailacho yar. PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA EN LA PARROQUIA SANTA MARTHA DE CUBA DEL CANTÒN TULCÁN [Internet]. Universidad Politecnica Estatal del Carchi; 2015. Available from: http://repositorio.upec.edu.ec:8080/handle/123456789/468

8. Iturra L. Evaluación del impacto económico de la erradicación de tuberculosis

bovina en predios lecheros infectados [Internet]. Universidad de Chile; 2016. Available from: http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/140651

9. Giménez JF, Rivera PS, Deward J. Caracterización de la respuesta inmunitaria de bovinos infectados con mycobacterium bovis en condiciones de campo en el municipio colón, Estado Zulia, Venezuela. Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia [Internet]. 2009;19(5):475–85. Available from: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95911615007

10. Flores H. Prevalencia y pérdidas económicas provocadas por tuberculosis bovina (Mycobacterium bovis) en una planta faenadora de la Región de Los Lagos, 2006-2010 [Internet]. Vol. 14, Boletin Veterinario Oficial SAG. 2012. Available from: https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_15_I_semestre_2012/articulos_PDF/regiones/prevalencia_TB_tesis_HFlores.pdf

11. Buddle B, de Lisle G, Griffin J, Hutchings S. Epidemiology , diagnostics , and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. N Z Vet J [Internet]. 2015;63(Supplement 1):19–27. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566881/pdf/tnzv-63-019.pdf

12. Delgadillo J. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA EL AISLAMIENTO DE MYCOBACTERIUM BOVIS EN TEJIDOS BOVINOS [Internet]. Universidad Autonoma de Nuevo Leon; 2017. Available from: http://eprints.uanl.mx/14461/

13. Zelanda N, Riding N, Manitoba M De. Tuberculosis bovina Tuberculosis bovina. 2010;1–7. Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovine_tuberculosis-es.pdf

14. Cesar DD. TUBERCULOSIS BOVINA, NO DEBEMOS DESCUIDARLA. Bienestar y Salud Animal [Internet]. 2012;40–3. Available from: https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R141/R_141_40.pdf

15. Baron L. TUBERCULOSIS BOVINA - Monografias.com. 2012;224–8. Available from: http://www.monografias.com/trabajos11/tubo/tubo.shtml

16. Yahyaoui-Azami H, Aboukhassib H, Bouslikhane M, Berrada J, Rami S, Reinhard M, et al. Molecular characterization of bovine tuberculosis strains in two

slaughterhouses in Morocco. BMC Vet Res [Internet]. 2017 Dec 25;13(1):272. Available from: https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-017-1165-6

17. Good M, Duignan A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. Vet Med Int. 2011;2011.

18. 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://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28591268

19. Palmer M V., Thacker TC, Waters WR, Gortázar C, Corner LAL. Mycobacterium bovis: A model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. Vet Med Int [Internet]. 2012;2012. Available from: https://new.hindawi.com/journals/vmi/2012/236205/

20. Rodríguez De Marco. Tuberculosis [Internet]. Chla-Ep. p. 1–5. Available from: http://www.chlaep.org.uy/descargas/publicaciones/definicion-y-patogenia.pdf

21. Segarpa, Senasica. Procedimiento de inspección sanitaria de ganado vacuno para vigilancia de tuberculosis bovina [Internet]. 2016. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/265353/Procedimiento_de_inspecci_n_sanitaria_de_ganado_vacunoTB.pdf

22. Mom M. Tesis Doctoral Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica [Internet]. "Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar"; 2015. Available from: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5736_Mon.pdf

23. OIE. ¿Qué es la tuberculosis bovina? 2018;1–6. Available from: http://www.oie.int/doc/ged/D14008.PDF

24. Bezos J, Álvarez J, Romero B, Juan L De, Domínguez L. Bovine tuberculosis : Historical perspective. Res Vet Sci [Internet]. 2014;9–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.09.003

25. 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). 2014;81(4):363–7.

26. Garbaccio S, Barandiaran S, Fernandez A, Macias A, Magnano G, Vivot MM, et al. Ensayo interlaboratorio: Aislamiento de mycobacterium bovis a partir de lesions granulomatosas en bovinos. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2016;48(2):161–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.03.004

27. Klepp LI, Eirin ME, Garbaccio S, Soria M, Bigi F, Blanco FC. Identification of bovine tuberculosis biomarkers to detect tuberculin skin test and IFNγ release assay false negative cattle. Res Vet Sci [Internet]. 2019;122(October 2018):7–14. Available from: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.016

28. Lahuerta-Marin A, Gallagher M, McBride S, Skuce R, Menzies F, McNair J, et al. Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms. Vet Res [Internet]. 2015;46(1):1–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s13567-015-0242-8

29. Najar Céspedes AP. Protocolo De Laboratorio. Curso Microbiología [Internet]. 2017. 1–49 p. Available from: https://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/12774/1/151006-Protocolo de laboratorio-Curso Microbiología.pdf

30. García Cañete P, Balcells ME, Castillo C, Miranda C, Geoffroy E, Román JC, et al. Evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF para la detección de Mycobacterium tuberculosis complex en muestras extra-pulmonares. Rev Chil Infectol [Internet]. 2017;34(4):333–9. Available from: https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n4/0716-1018-rci-34-04-0333.pdf

31. 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: http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/39228

32. Lorente-Leal V, Liandris E, Castellanos E, Bezos J, Domínguez L, de Juan L, et al. Validation of a Real-Time PCR for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Members in Bovine Tissue Samples. Front Vet Sci [Internet]. 2019 Mar 4;6(MAR):1–9. Available from:

https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2019.00061/full

33. Organizacion Panamericana de la Salud. MANUAL PARA EL DIAGNOSTICO BACTERIOLOGIGO DE LA TUBERCULOSIS [Internet]. Vol. 2. 2008. Available from: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo[2].pdf

34. Sánchez E, Maritza N, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela R. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnostico clínico. Con-Ciencia [Internet]. 2014;2(1):125–38. Available from: http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rcfb/v2n1/v2n1_a14.pdf

35. Estrada-Chávez C, Díaz Otero F, Arriaga Díaz C, Villegas-Sepúlveda N, Pérez González R, González Salazar D. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet Méx [Internet]. 2004;35(3):225–36. Available from: http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2004/vm043f.pdf

36. Choreño-Parra JA, Martínez-Zúñiga N. Amplificación de ADN isotérmica mediada por horquillas para el diagnóstico de tuberculosis en el contexto mexicano. Med interna México. 2018;34(3):418–22.

37. Patricia Garrido. Técnica De Amplificación Isotérmica Mediada Por Bucle O Lamp. Ventajas En El Diagnóstico Sanitario. ECUADOR ES Calid - Rev Científica Ecuatoriana. 2016;3(1):11–4.

38. BROUGHAN JM, JUDGE J, ELY E, DELAHAY RJ, WILSON G, CLIFTON-HADLEY RS, et al. A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. Epidemiol Infect [Internet]. 2016 Oct 25;144(14):2899–926. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S095026881600131X/type/journal_article

39. Lomillos J, Gomez-Martinez C. Tuberculosis bovina: aspectos generales y problemática [Internet]. 2015 [cited 2020 Feb 16]. Available from: https://www.visavet.es/es/tuberculosis-bovina-aspectos-generales-y-problematica/12=470/

40. Paccha A. Diagnóstico de tuberculosis bovina, por medio de la prueba cervical

comparativa en hembras bovinas De la Hoya de Loja [Internet]. Universidad Ncional de Loja; 2012. Available from: https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5399/1/TESIS Darwin Aurelio Paccha Paccha diagnóstico de tuberculosis bovina%2c.pdf

41. Cushicóndor D. Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) mediante inspección post-mortem y cultivo bacteriológico en el matadero municipal del cantón Mejía (Pichincha) [Internet]. Universidad Central del Ecuador; 2014. Available from: http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6634/1/T-UCE-0014-010.pdf

42. Echeverría G. Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina (tbb) mediante la aplicación de nested-PCR en bovinos faenados en los camales municipales de los cantones Cayambe (Pichincha) y Pelileo (Tunguragua) [Internet]. Escuela Politécnica del Ejército; 2011. Available from: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4982/1/T-ESPE-033021.pdf

43. Herrera E. Diagnóstico de Tuberculosis Bovina, mediante la Prueba Intradérmica Cervical comparada en cinco hatos lecheros en la Ciudad de Otavalo, Provincia de Imbabura [Internet]. Universidad de las Américas; 2016. Available from: http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2808/8/UDLA-EC-TMVZ-2011-12.pdf

44. Quinatoa Iván, Chicaiza J. Análisis de factores de riesgo y determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina utilizando técnicas estadísticas bayesianas en las provincias de Cotopaxi, Carchi e Imbabura [Internet]. Universidad Central del Ecuador; 2013. Available from: http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1274/1/T-UCE-0014-34.pdf

45. 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

46. Román F, Chávez R. Prevalencia de enfermedades que afectan la reproducción en ganado Bovino Lechero del cantón Loja Prevalence of diseases that affect reproduction in dairy cattle. Rev la Dir Investig [Internet]. 2016;(August):83–90. Available from: http://192.188.49.30/index.php/cedamaz/article/view/65/64

47. Roa J. Estudio De La Prevalencia De Tuberculosis Bovina En Ganaderias Bovinas Del Canton Loja" [Internet]. 2015. p. 1–63. Available from: http://192.188.49.17/jspui/bitstream/123456789/11684/1/TESIS JUNIOR EDUARDO ROA ARMIJOS.pdf

48. Suquilanda R. Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB), en el cantón Loja mediante inspección post mortem en el camal frigorífico de Loja [Internet]. 2015. Available from: https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10242/1/TESIS- Rober Luciano Suquilanda Ludeña.pdf

49. Guamán M. Diagnostico De Tuberculosis Bovina Mediante Alerginización [Internet]. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo; 2012. Available from: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2126/1/17T1096.pdf

50. Vinueza S. Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina en la hacienda Pucate del cantón Chambo Provincia de Chimborazo [Internet]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2015. Available from: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/5215/1/17T1301.pdf

51. Zambrano M. Determinacion de tuberculosis (Mycobacterium bovis) con la prueba tuberculina en el area de influencia del cantón El Carmen [Internet]. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2013. Available from: http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/604/1/T-UTEQ-0096.pdf

52. Plúas L. "Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de Mycobacterium bovis en el Camal Municipal del cantón Buena Fe [Internet]. Universidad Estatal de Quevedo; 2019. Available from: http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3725/1/T-UTEQ-0035.pdf

53. Nuques C. Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) en 3 hatos ganaderos del cantón General Antonio Elizalde (Bucay). AUTOR [Internet]. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil; 2019. Available from: http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/12712/1/T-UCSG-PRE-TEC-CMV-65.pdf

54. Hurtado M. Diagnóstico de tuberculosis bovina mediante la prueba intradermica caudal (tuberculinas) en los cantones de Esmeraldas, Eloy Alfaro y Quininde de la

provincia de Esmeraldas [Internet]. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2015. Available from: http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1543/1/T-UTEQ-0178.pdf

55. Andrade D. Situación actual de la brucelosis y tuberculosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas [Internet]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2016. Available from: http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/5350/1/17T1383.pdf

56. Salazar S. Prevalencia de tuberculosis (mycrobacterium bovis) mediante la aplicación de la prueba de tuberculina en el sector sur-este de la provincia de Santa Elena [Internet]. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2017. Available from: http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2711/1/T-UTEQ-0077.pdf

57. Palacios C. Aplicación de la técnica de lamp en el estudio de (Mycobacterium bovis) en el camal municipal del cantón El Empalme, provincia del Guayas 2018 [Internet]. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2019. Available from: http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3723/1/T-UTEQ-0033.pdf

58. Mora J et al. Manual de Técnicas de Laboratorio para el Exámen Baciloscópico. Secretaria de Salud. 2003. 1–72 p.

59. De Kantor IN, Ritacco V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Vet Microbiol [Internet]. 2006 Feb 25 [cited 2020 Feb 25];112(2-4 SPEC. ISS.):111–8. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113505003858

60. Ritacco V, Sequeira M, Chapter IDK-, 2006 U. Human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis in Latin America and the Carribbean. In 2006 [cited 2020 Feb 25]. p. 13–7. Available from: http://the-eye.debloque.net/public/Books/BioMed/Mycobacterium bovis Infection in Animals%2C Humans 2nd ed. - C. Thoen %28Blackwell%2C 2006%29 WW.pdf#page=31

61. Dubarry JR, Alvarez AR, Errea AL, Hierro J, Medina A, Pechìn GH, et al. Tuberculosis bovina relación de proporciones entre los diagnósticos anatomopatológicos macroscópico y microscópico. Cienc Vet [Internet]. 2017;5(1):8–17. Available from:

https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1946/1895

62. Mora L. Determinación de micobacterias spp en bovinos faenados en el matadero municipal de la ciudad de Guayaquil. Universidad Agraria del Ecuador; 2018.

63. Ikuta CY, Morato F, De Souza GO, Heinemann MB, Amaku M, Neto JSF. Influence of the incubation conditions on culture media to optimize primary isolation of Mycobacterium bovis. Semin Agrar. 2016;37(5):3693–700.

64. 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: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39228/1/2019

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de reporte general de canales observadas

FICHA DE REPORTE CAMAL #1

Reporte General de Canales observadas

Datos Generales

Fecha: 8 de noviembre del 2019

Código del estudiante: CFARE

Nombre de Camal: camal de Arenillas

Descripción

Linea de Faenamiento: 1 ☑ 2 ☐

*marcar con un visto la linea de Faenamiento donde se reportan las canales

Canales sin lesiones compatibles:

*remarcar las lineas del número de canales sin lesiones compatibles

Canales con lesiones compatibles:

*remarcar las lineas del número de canales con lesiones compatibles

Comentarios y observaciones:

La procedencia de todos los animales faenados fueron del cantón arenillas. Fueron 12 los animales faenados

Firma del estudiante

firma del tutor

Anexo 2. Ficha sobre el reporte por canal con lesión compatible detectada

FICHA DE REPORTE CAMAL #1

Reporte por canal con lesión compatible detectada

Datos Generales

Fecha: 8 de noviembre del 2019

Código del estudiante: **CFARE-3**

Nombre de Camal: camal de Arenillas

Lesiones macroscópicas	
☐ Lesiones pulmonares	☐ •Lesiones de gran tamaño de apariencia caseificada y zonas de mineralización. ☐ •En superficies serosas, se observan nódulos firmes de 2-10 cm de diámetro. ☐ •Se aprecien nódulos firmes de aspecto granulomatoso. ☐ •Se encuentran abscesos generalizados en todo el parénquima pulmonar.
☐ Lesiones en Ganglios Cervicales y Retro faríngeos	☐ •Lesiones caseosas exclusivamente en ganglios cervicales anteriores, la vía de entrada pudo haber sido respiratoria o digestiva. ☐ •Lesiones caseosas en ganglios retro faríngeos, la vía de entrada mucosa nasal. ☐ •Nodos de color grisáceo o amarillento.
☑ Lesiones en Ganglios Mediastinos	☑ •Ganglios con aumento de tamaño y pequeños tubérculos de tipo caseoso.

- Marcar con un visto las lesiones con las que son compatibles el análisis macroscópico

Comentarios y observaciones

El ganglio presento una coloración oscura, y aumentada el tamaño, pero no exclusivamente con tubérculos caseosos. Arenillas

_____ _____

Firma del estudiante Firma del Tutor

Anexo 3. Seguimiento de las siembras de ganglios para la determinación de tuberculosis

CUADRO DEL SEGUIMIENTO DE LAS SIEMBRAS DE GANGLIOS PARA LA DETERMINACION DE TUBERCULOSIS BOVINA										BACILOSCOPIA	
FECHAS DE SIEMBRA DE LAS MUESTRAS	MUESTRAS	N° colonia	tubo con cultivo	primera lectura (18/nov/19)	seguna lectura (25/nov/19)	tercera lectura (2/dic/19)	cuarta lectura (10/dic/19)	quinta lectura (17/dic/19)	COLORACION Y FORMA	positivo	negativo
primera siembra (11 de noviembre del 2019)	muestra 1		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 2		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 3		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 4		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 5		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			

				primera lectura (25/nov/19)	seguna lectura (2/dic/19)	tercera lectura (10/dic/19)	cuarta lectura (17/dic/19	quinta lectura (24/dic/19)			
segunda siembra (18 de noviembra del 2019)	muestra 6		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
		1 colonia	ST2	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	crema rugosa	X	
	muestra 7		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 8		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
		1 colonia	ST1	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	naranja redonda lisa		X
			ST2	x	x	x	x	x			

				primera lectura (2/dic/19	seguna lectura (10/dic/19)	tercera lectura (17/dic/19)	cuarta lectura (24/dic/19)	quinta lectura (31/dic/19)			
tercera siembra (25 de noviembre del 2019)	muestra 9		OK1	x	x	x	x	x			
		1 colonia	OK2	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	crema rugosa seca		X
		1 colonia	ST1	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	crema rugosa brillante humeda		X
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 10		OK1	x	x	x	x	x			
		1 colonia	OK2	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	crema rugosa	X	
		1 colonia	ST1	x	x	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	crema rugosa brillante	X	
		1 colonia	ST2	x	x	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	crema lisa brillante	X	
	muestra 11	2 colonias	OK1	x	x	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	blanca lisa brillante	X	
				si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	naranja redonda lisa		X
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 12		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
		1 colonia	ST2	x	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	crema rugosa	X	

				primera lectura (10/dic/20)	seguna lectura (17/dic/19)	tercera lectura (24/dic/19)	cuarta lectura (31/dic/19)	quinta lectura (6/ero/20)			
cuata siembra (2 diciembre del 2019)	muestra 13	1 colonia	OK1	x	x	si hay creciemiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	crema lisa brillante		X
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
		1 colonia	ST2	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay creciemiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	crema rugosa seca polvosa	X	
	muestra 14		OK1	x	x	x	x	x			
			OK2	x	x	x	x	x			
			ST1	x	x	x	x	x			
			ST2	x	x	x	x	x			
	muestra 15	1 colonia	OK1	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimeinto	amarilla redonda lisa brilante	X	
			OK2	x	x	x	x	x			
		2 colonias	ST1	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	amarilla redonda lisa brilante	X	
				si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	naranja redonda lisa brillante		X
		2 colonias	ST2	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	amarilla decolorada extendida brillante		X
				x	x	si hay crecimiento	si hay crecieminto	si hay crecimiento	naranja peuqeña lisa brillante	X	
	muestra 16	2 colonias	OK1	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	crema lisa opaca	X	
				si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	naranja polvosa extendida rugosa		X
		3 colonias	OK2	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	blanca rugosa polvosa extendida	X	
				si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	crema rugosa pequeña plana	X	
				si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimiento	amarilla lisa brillante humeda		X
		1 colonia	ST1	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	si hay crecimiento	si hay crecimiento	si hay crecimeinto	blanca rugosa forma de flor grande	X	
			ST2	x	x	x	x	x			

Anexo 4. Inspección post-mortem de ganglios pulmonares

Anexo 5. Ganglios pulmonares con alteraciones en su color y tamaño

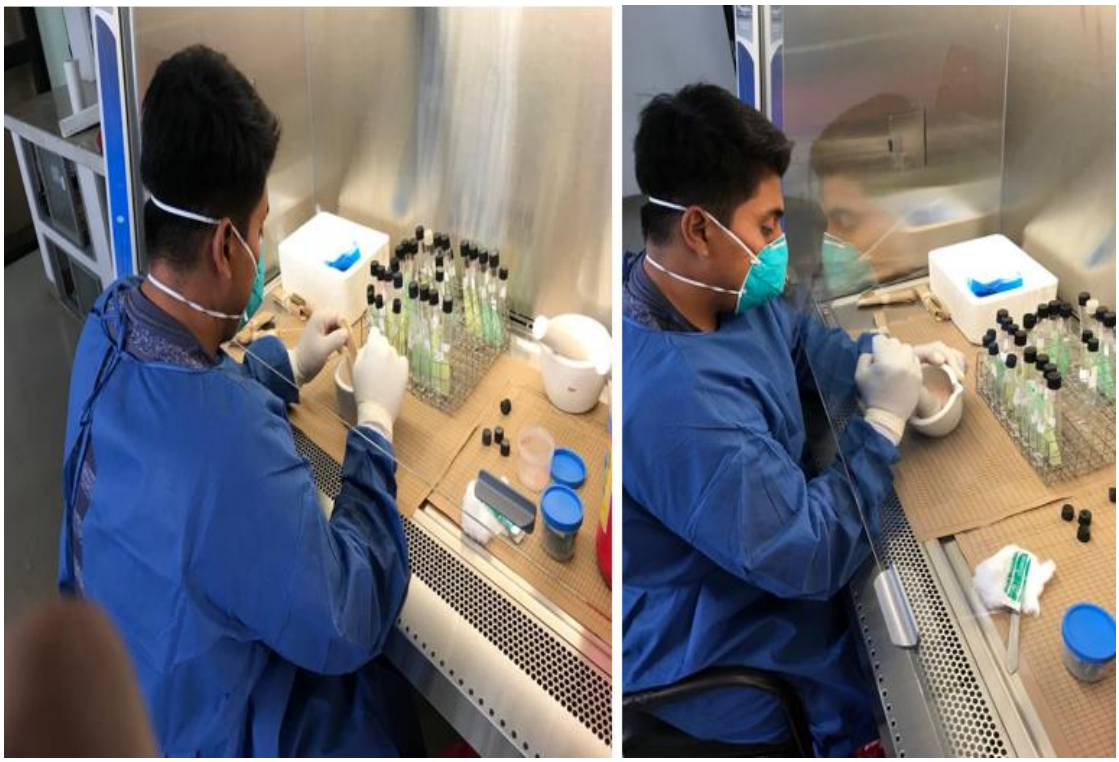
Anexo 6. Empaquetado de las muestras para ser llevados al laboratorio

Anexo 7. Medios de cultivo que se utilizaron para realizar las siembras de las muestras Ok y St

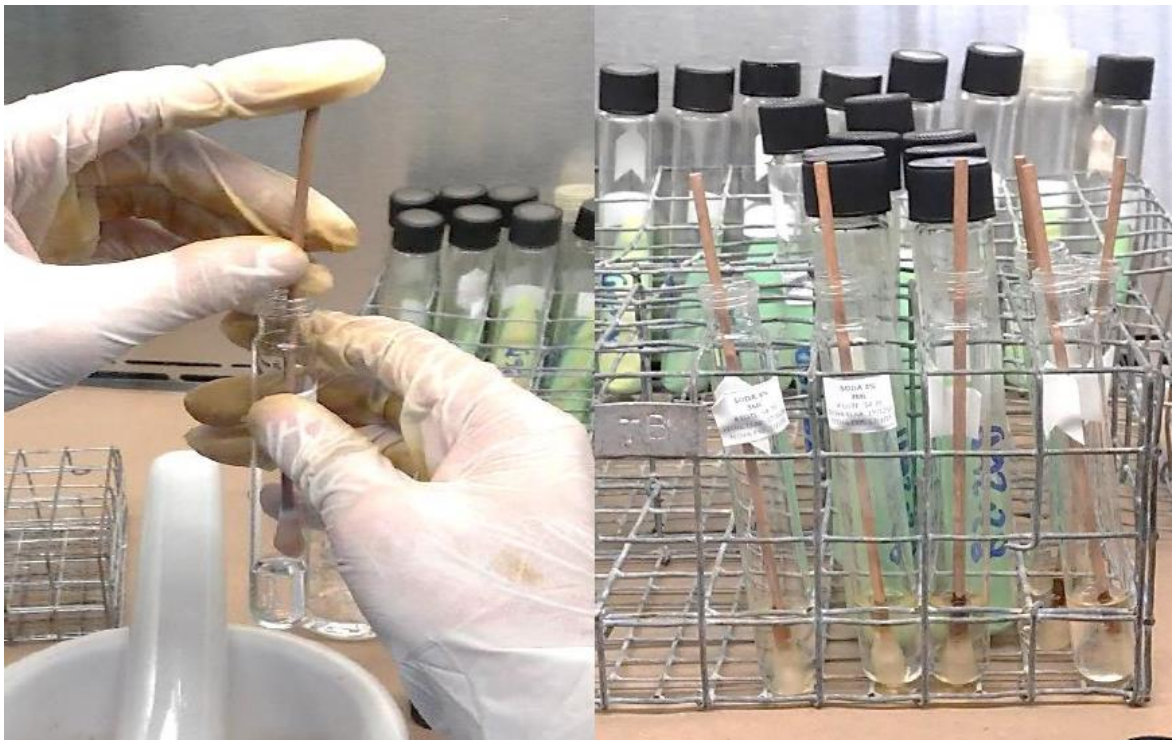
Anexo 8. Materiales utilizados para realizar todo el proceso de sembrado de las muestras

Anexo 9. Materiales dentro de la cabima de seguridad listos para realizar la siembra

Anexo 10. Selección de la muestra para posteriormente macerarla con agua destilada para que quede una mezcla homogénea para ser sembrada en los medios de cultivo

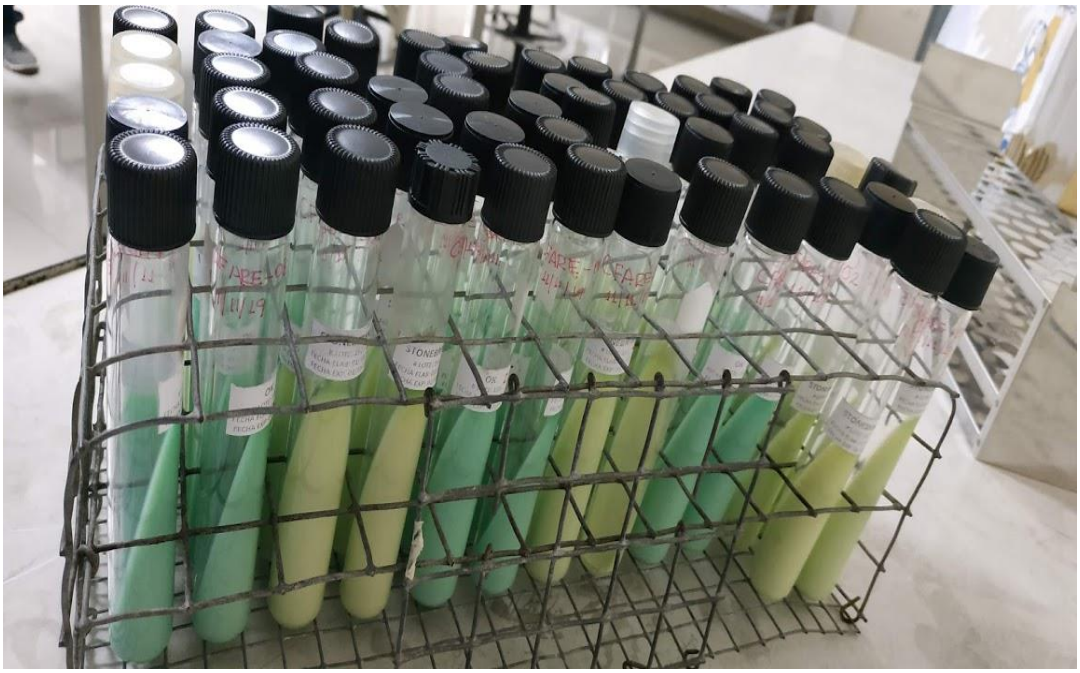


Anexo 11. Descontaminación del homogenizado con hidróxido de sodio al 4 % (soda)



Anexo 12. Siembra de muestra descontaminada en medio de cultivo con hisopo estéril

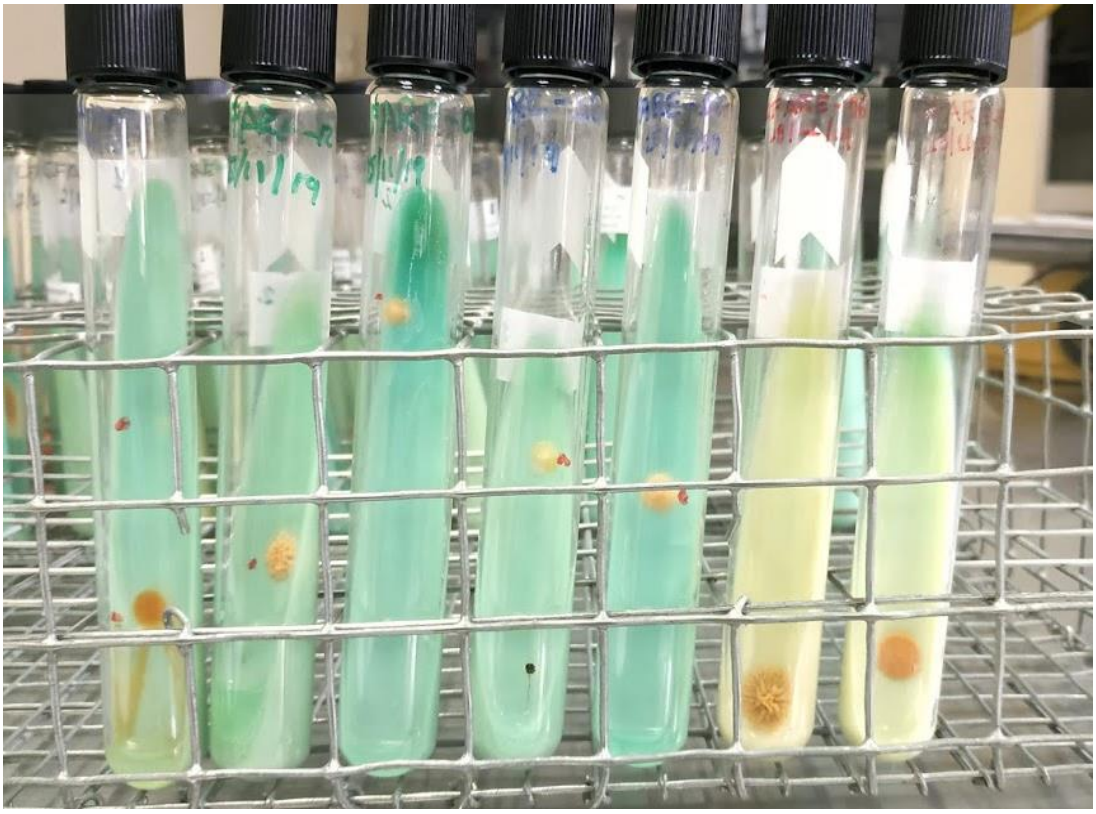
Anexo 13. Tubos con medios de cultivos sembrados con las diferentes muestras listos para ser incubados



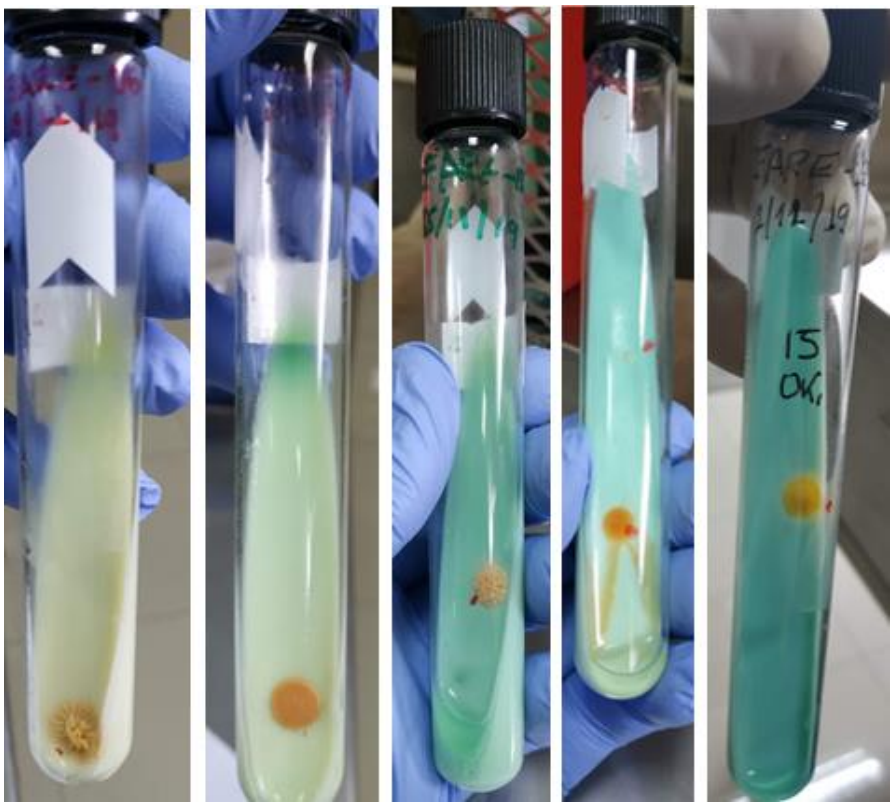
Anexo 14. Tubos con medios de cultivos en la incubadora a 37° C, incubación durante 6 semanas

Anexo 15. Lectura del crecimiento bacteriano

Anexo 16. Crecimiento de colonias bacterianas en los medios de cultivo



Anexo 17. Colonias en los diferentes medios de cultivo listo para ser aislados



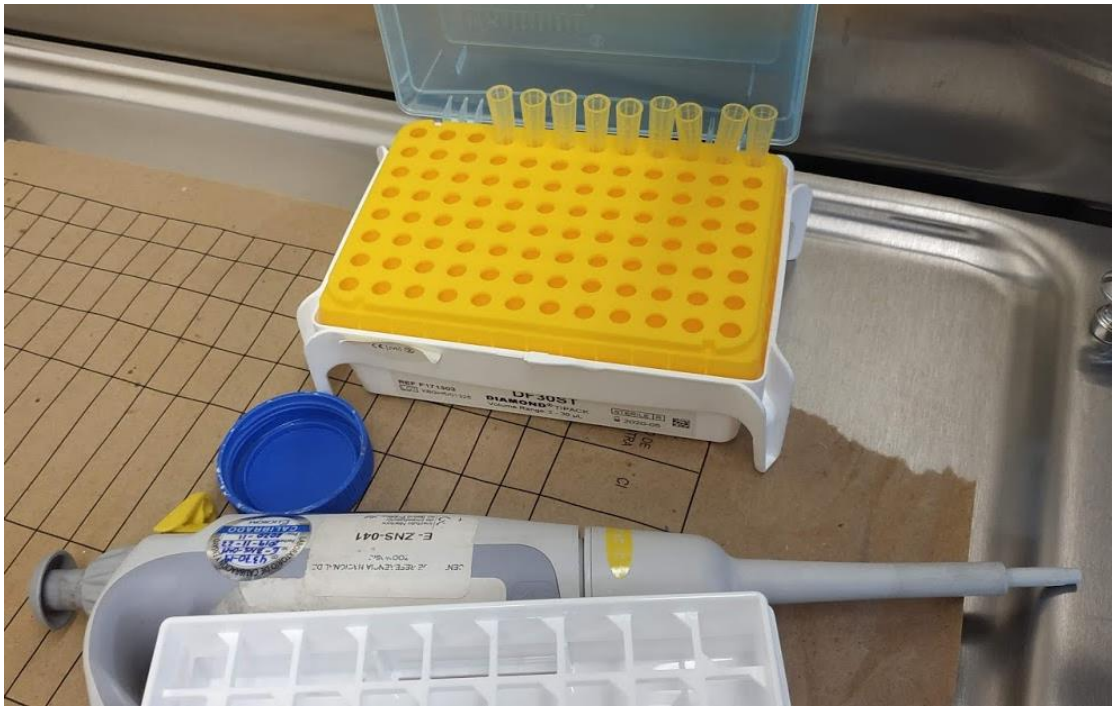
Anexo 18. Materiales listos para hacer la etapa del aislamiento de las colonias

Anexo 19. Aislando las colonias de los diferentes medios de cultivo, para luego ser llevado a congelación.

Anexo 20. Colonias bacterianas aisladas en los criotubos

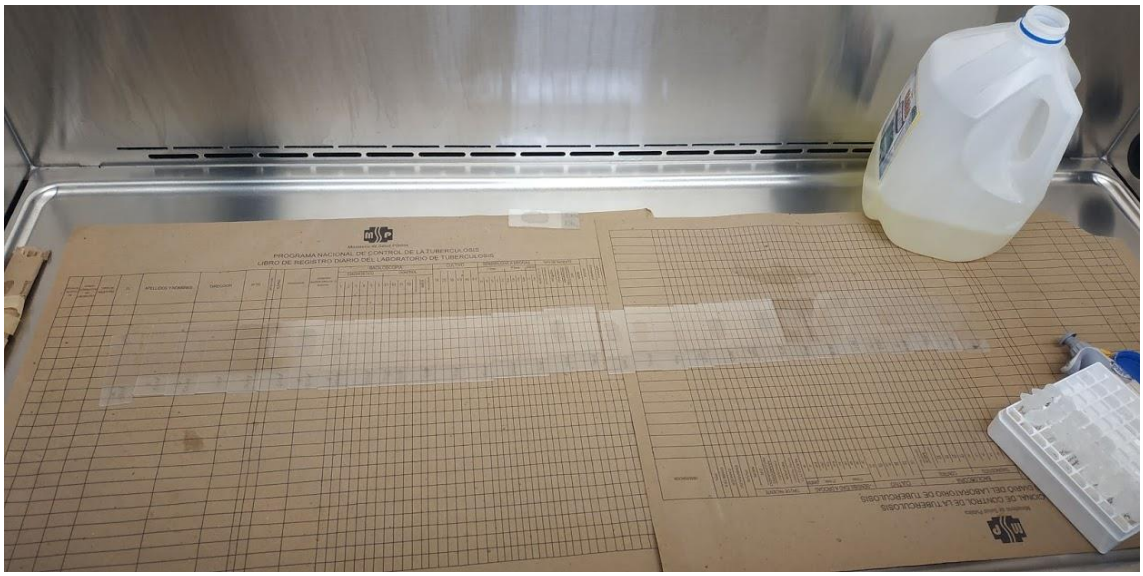
Anexo 21. Rotulación de las placas para realizar el extendido de las colonias

Anexo 22. Materiales utilizados para realizar los extendidos de las colonias

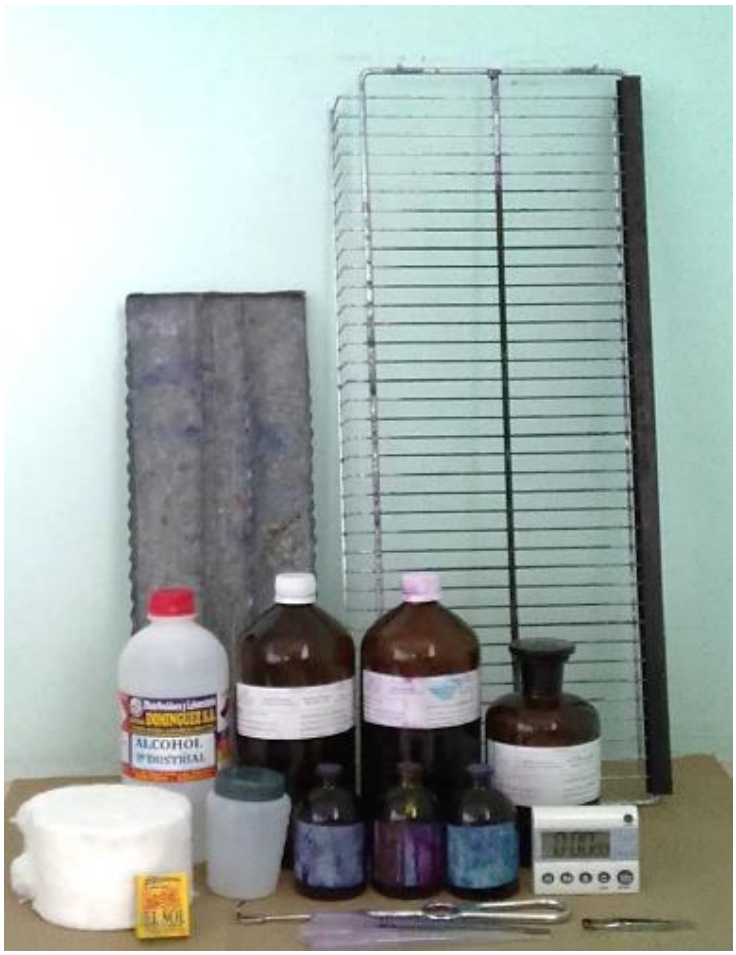


Anexo 23.Realizando el extendido de las muestras en las placas

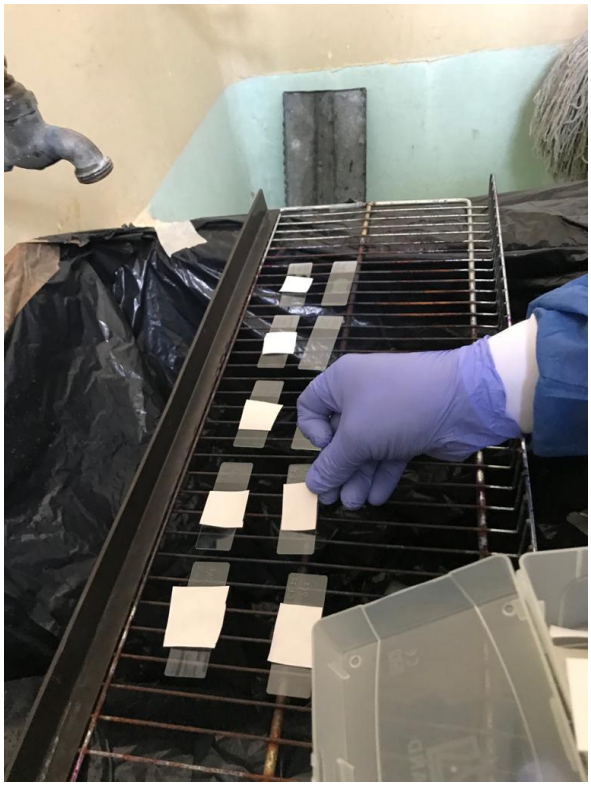
Anexo 24. Placas secándose con temperatura ambiente para aplicarles la tinción Ziehl Neelsen



Anexo 25. Materiales para realizar la Tinción de Ziehl Neelsen



Anexo 26. Placas portaobjetos con papel filtro sobre los extendidos

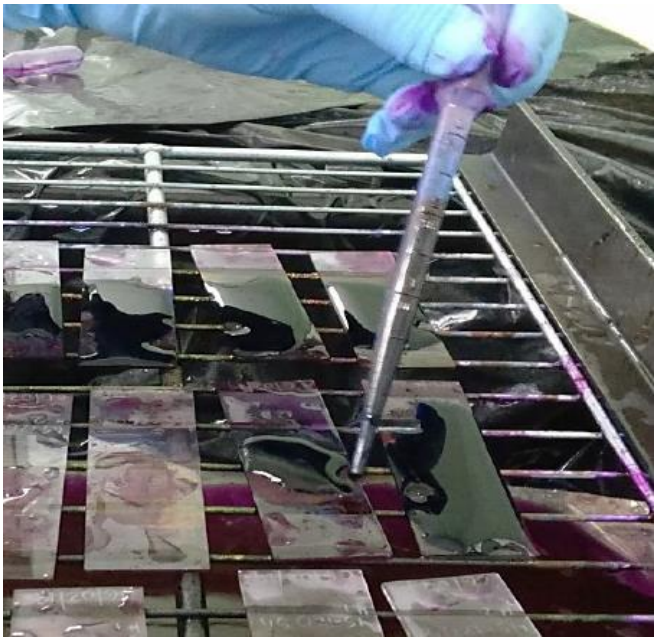


Anexo 27. Adición de Fucsina fenicada sobre los extendidos

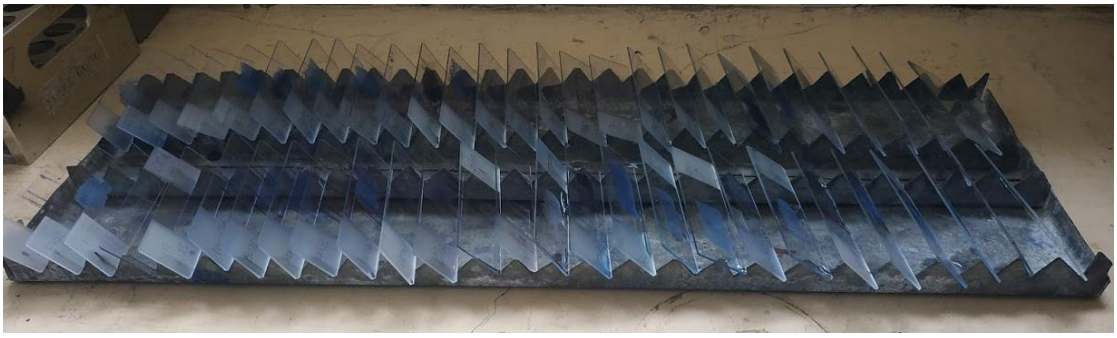
Anexo 28. Flameado de las placas hasta que se produzca 3 emisiones de vapor

Anexo 29. Aplicación del alcohol acido sobre la placa

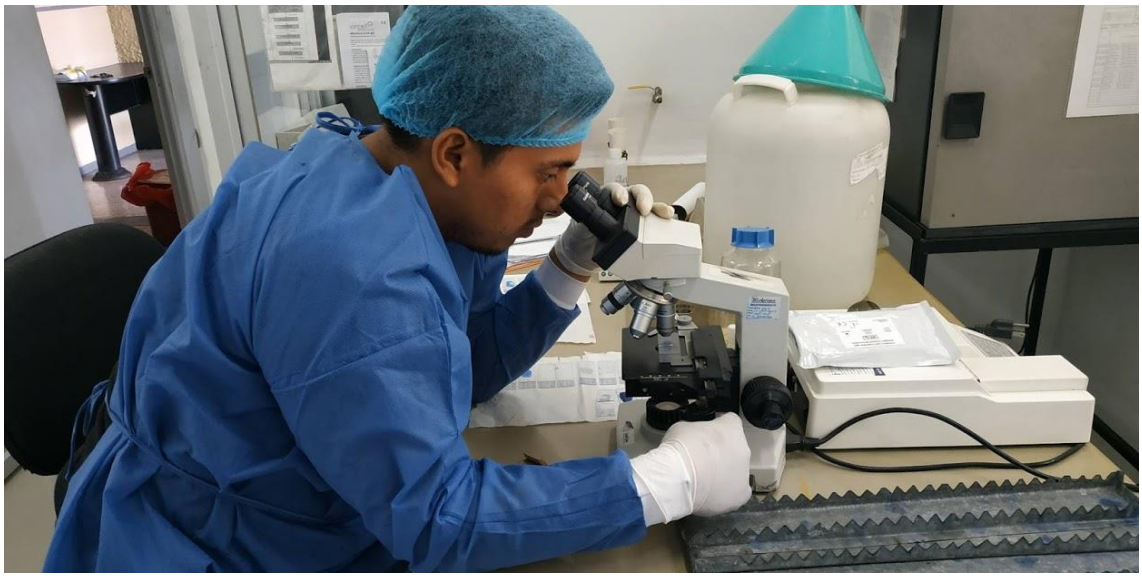
Anexo 30. Aplicación del alcohol acido sobre la placa



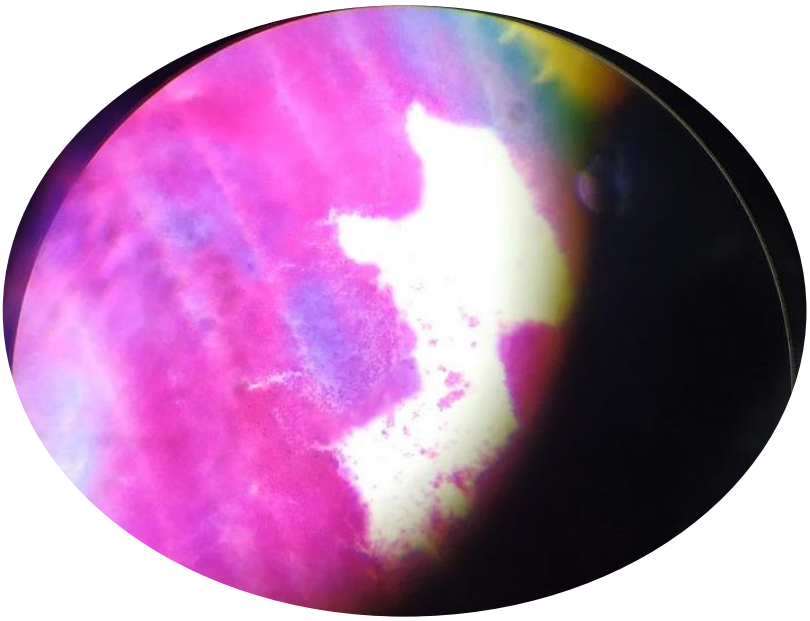
Anexo 31. Placas secándose a temperatura ambiente para realizar la baciloscopia



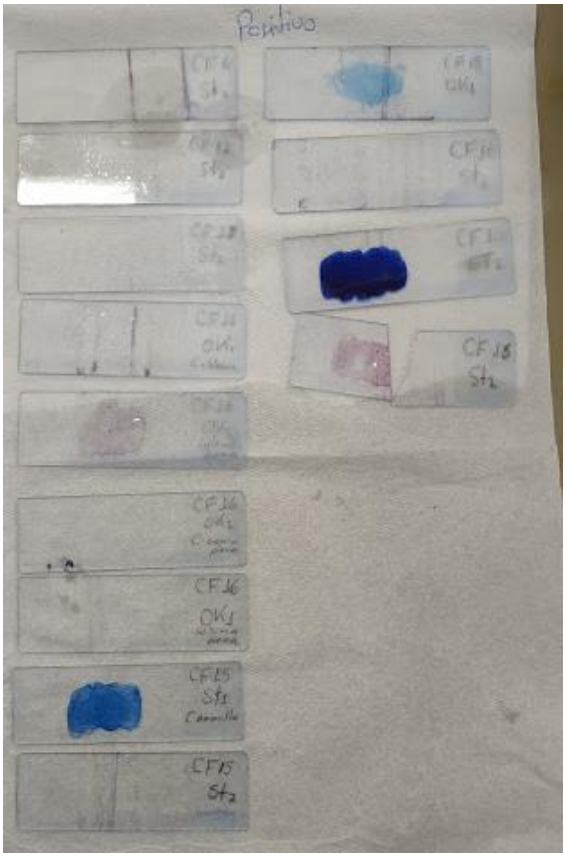
Anexo 32. Observación de placas mediante la baciloscopia



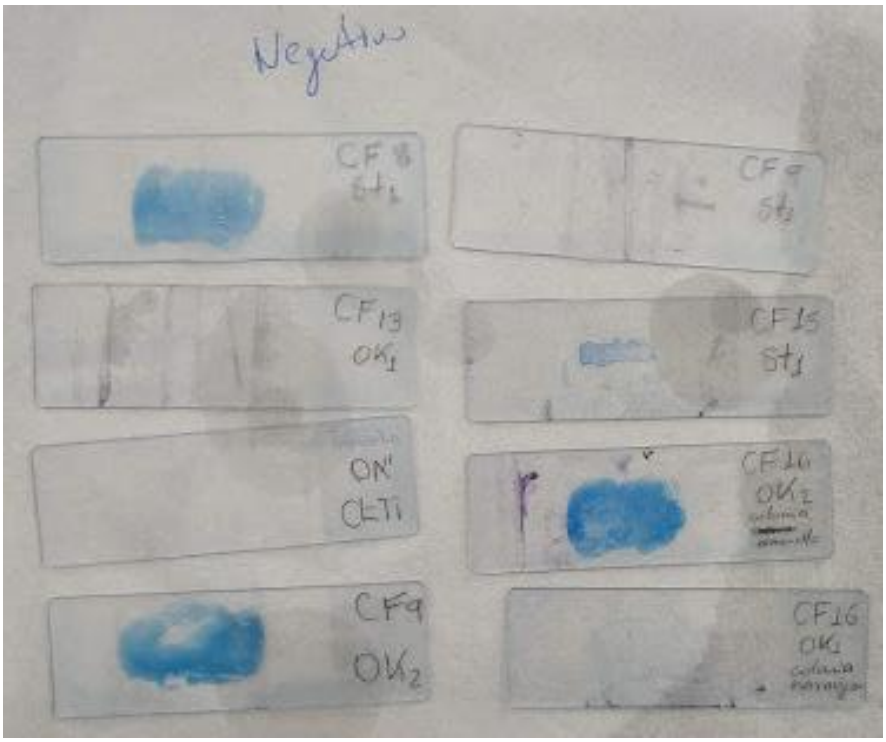
Anexo 33. Baciloscopia de bacilos acido – alcohol resistente (BAAR) positivos a mycobacterium



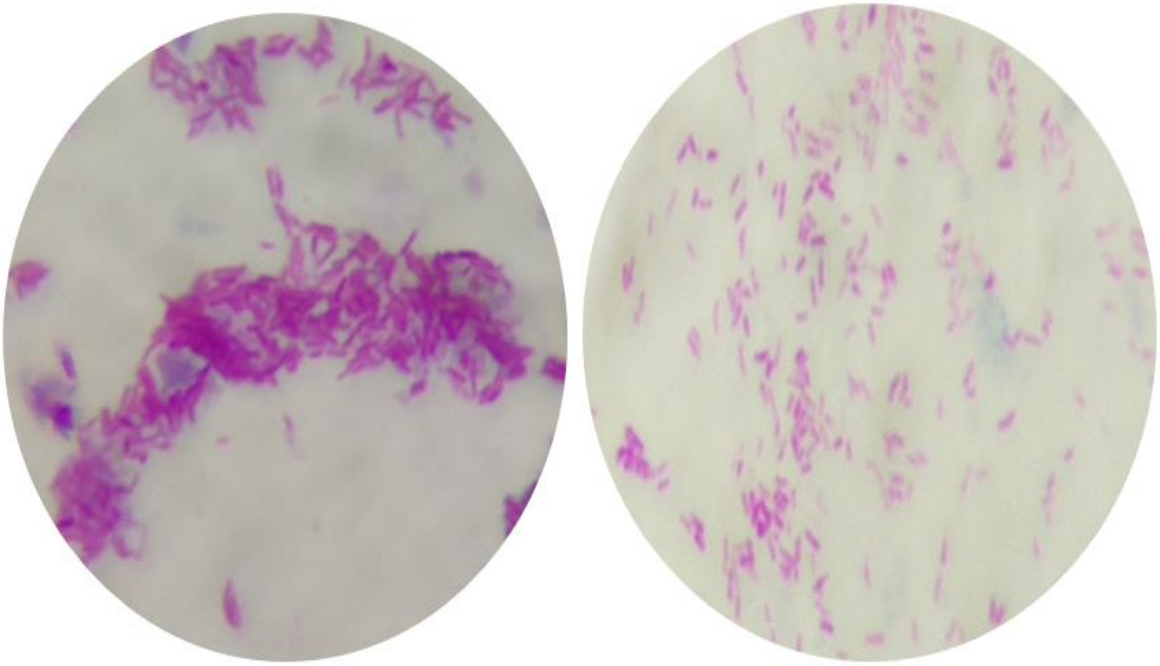
Anexo 34. Placas positivas a BAAR



Anexo 35. Placas negativas a BAAR

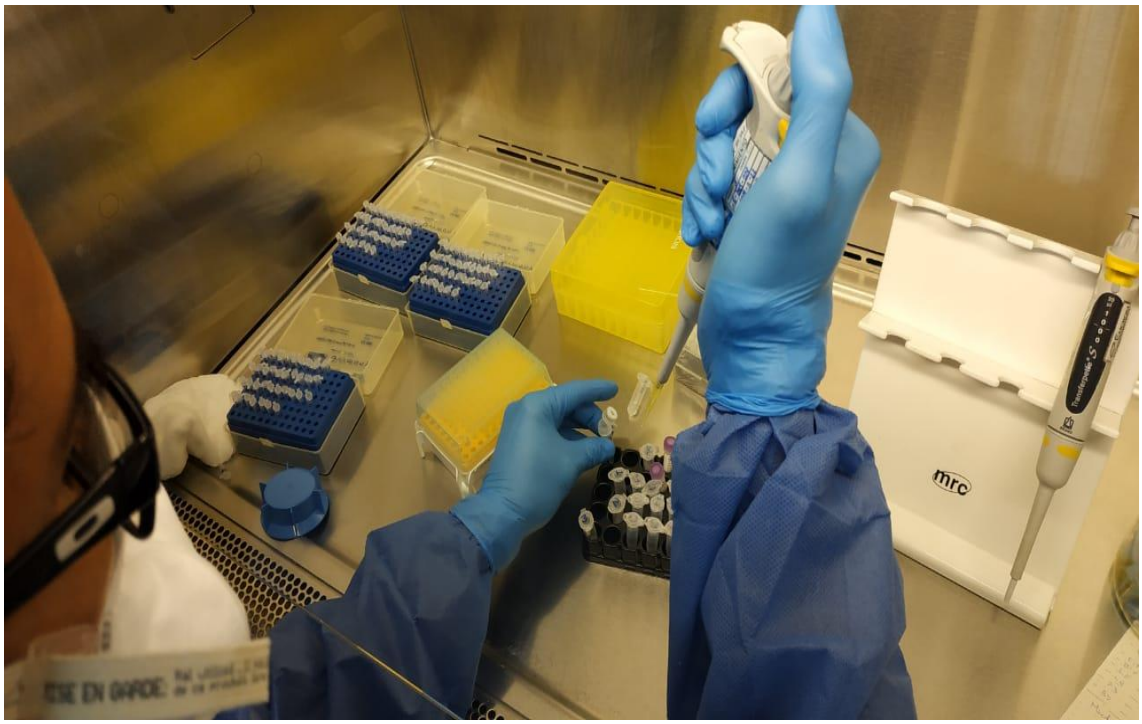


Anexo 36. Resultados de la Baciloscopia



PCR - LAMP

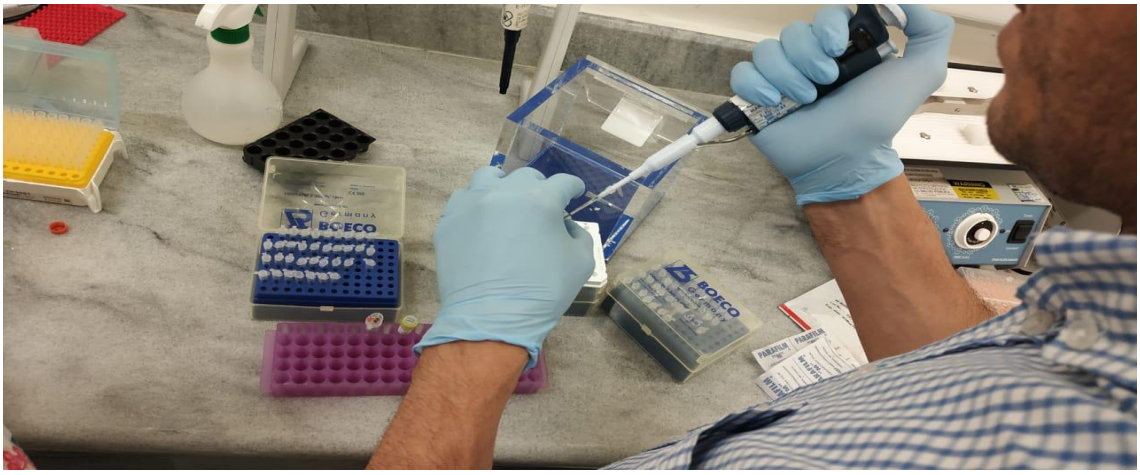
Anexo 37. Clasificación de la muestra en los tres primers



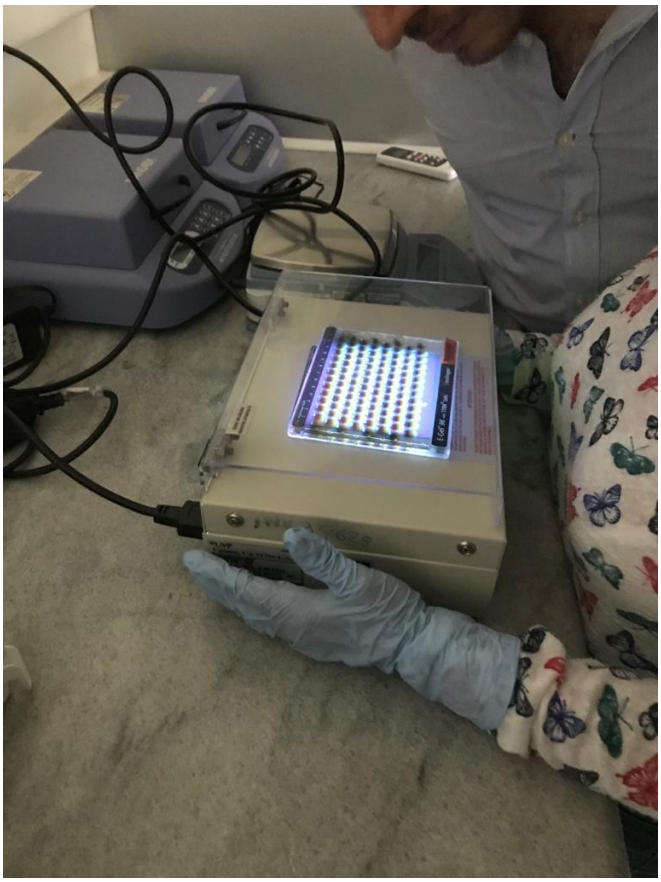
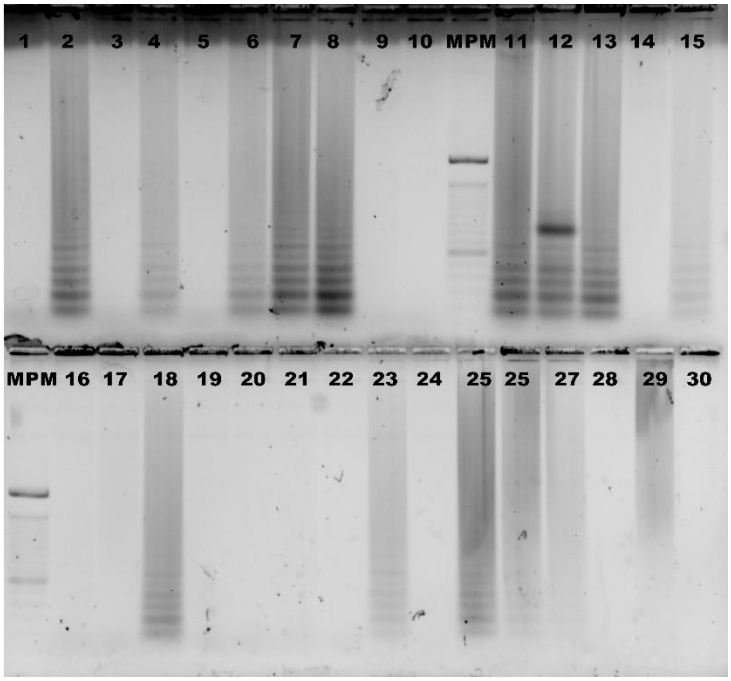
Anexo 38. Ubicación de los primers en el termociclador para que realice el proceso de desnaturalización

Anexo 39. Colocación de la Polimerasa en los diferentes primers

Anexo 40. Colocación del bromuro de etidio en las muestras para someterlos a la electroforesis



Anexo 41. Aplicando la electroforesis a las muestras



Anexo 42. Resultados de la electroforesis