



**UNL**

Universidad  
Nacional  
**de Loja**

Facultad  
**Agropecuaria y de Recursos  
Naturales Renovables**

Carrera de  
**Medicina  
Veterinaria y  
Zootecnia**

# TESIS DE GRADO

“USO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE TUBERCULOSIS BOVINA EN FINCAS DE LA PROVINCIA DE  
LOJA”

Trabajo de tesis previo a la obtención del Título de  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

## AUTORA

Celena Lizbeth Sánchez Cabrera

## DIRECTORA

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, MSc.

**LOJA – ECUADOR**

2021

*No todos ocupan los  
mejores puestos, sino  
los más preparados,  
aunque no sean genios.*

# CERTIFICACIÓN DE DIRECCIÓN DE TESIS

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, MSc.  
**DIRECTORA DE TESIS**

## CERTIFICO

Que he revisado la presente tesis titulada “**USO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN FINCAS DE LA PROVINCIA DE LOJA**” realizada por la Srta. Egresada **CELENA LIZBETH SÁNCHEZ CABRERA**, la misma que **CULMINÓ DENTRO DEL CRONOGRAMA APROBADO**, cumpliendo con todos los lineamientos impuestos por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, **AUTORIZO QUE SE CONTINÚE CON EL TRÁMITE DE GRADUACIÓN.**

Loja, 26 de agosto de 2020

Atentamente



Firmado electrónicamente por:

**JHULIANA  
KATHERINE LUNA  
HERRERA**

---

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, MSc.  
**Directora de Tesis**

# CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

En calidad de Tribunal Calificador de la Tesis de Grado titulada: **“USO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN FINCAS DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, de la autoría de la Señorita **Celena Lizbeth Sánchez Cabrera** egresada de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja, certificamos que ha incorporado todas las sugerencias y observaciones realizadas por los miembros del tribunal, y una vez revisada se ha procedido a la respectiva calificación.

Por lo tanto, autorizamos a la Señorita egresada, su publicación y difusión.

Loja, 01 de marzo del 2021

Atentamente

Dr. Segundo Germán Barragán Fierro, MSc.  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:  
**SEGUNDO GERMAN  
BARRAGAN FIERRO**

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, MSc.  
VOCAL DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:  
**MANUEL BENJAMIN  
QUEZADA PADILLA**

MVZ. Patricio David Carrera Játiva, MSc  
VOCAL DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:  
**PATRICIO DAVID  
CARRERA JATIVA**

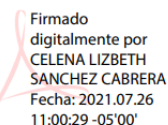
# AUTORÍA

Yo, **Celena Lizbeth Sánchez Cabrera**, declaro ser autora del presente trabajo de tesis que ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Los conceptos, ideas, resultados, conclusiones, y recomendaciones vertidas en el desarrollo del presente trabajo de investigación, son de absoluta responsabilidad de su autora.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

**FIRMA:** CELENA  
LIZBETH  
SANCHEZ  
CABRERA

A digital signature stamp with a red scribble. The text inside the stamp reads: "Firmado digitalmente por CELENA LIZBETH SANCHEZ CABRERA Fecha: 2021.07.26 11:00:29 -05'00"

**AUTORA:** Celena Lizbeth Sánchez Cabrera

**CÉDULA:** 1105679417

**FECHA:** 28 de julio de 2021

# CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **Celena Lizbeth Sánchez Cabrera**, declaro ser la autora de la tesis titulada “USO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN FINCAS DE LA PROVINCIA DE LOJA”, como requisito para obtener el título de: Médica Veterinaria Zootecnista, y autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera, en le Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de Información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, en la ciudad Loja, a los 28 días del mes de Julio del año 2021, firma la autora.

**FIRMA:** CELENA  
LIZBETH  
SANCHEZ  
CABRERA

Firmado  
digitalmente por  
CELENA LIZBETH  
SANCHEZ CABRERA  
Fecha: 2021.07.26  
11:00:29 -05'00'

**Autora:** Celena Lizbeth Sánchez Cabrera

**Cédula de identidad:** 1105679417

**Dirección:** Loja, San Pedro de Vilcabamba, Amala

**Correo electrónico:** clsanchezc@unl.edu.ec

**Celular:** 0986542181

## DATOS COMPLEMENTARIOS

### Directora de Tesis:

MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, MSc.

### Tribunal de Grado:

Dr. Segundo Germán Barragán Fierro MSc. (Presidente)

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, MSc. (Vocal)

MVZ. Patricio David Carrera Jávita, MSc. (Vocal)

## **AGRADECIMIENTO**

*Mediante estas líneas expreso mi más profundo y sincero agradecimiento a mi madre y hermanos por ser mi apoyo incondicional y por sus palabras de aliento en el desarrollo del presente proyecto.*

*A la Universidad Nacional de Loja, en especial a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme la oportunidad de instruirme y haber terminado mis estudios satisfactoriamente.*

*A mi tutora MVZ. Jhuliana Katherine Luna Herrera, MSc. por su asesoramiento, orientación, paciencia, y su compromiso con la salud pública, que ayudaron a la culminación de este trabajo de investigación.*

*También agradezco al Instituto de Investigación en Zoonosis-CIZ de la Universidad Central del Ecuador, en especial al Ing. Gustavo Echeverria, por su asesoramiento científico y su colaboración absoluta en el siguiente proyecto.*

*A mis amigos Bryan, Genessis y Rosita con un cariño muy especial a Pablo por su ayuda en el trabajo de campo.*

***Celena Lizbeth Sánchez Cabrera***

## **DEDICATORIA**

*A mi madre, María por compartir mi sueño y ayudarme a cumplirlo, con amor, confianza y sabiduría. A mi padre, por enseñarme a ser fuerte, con su partida.  
¡Gracias por todo!*

**Los AMO**

*A mis hermanos, Carmen, Samantha y Juan, por su compañía, su apoyo y por los momentos vividos que me hacen inmensamente feliz*

**Los QUIERO un mundo**

*A mis amigos y compañeros por su apoyo y su carisma que han hecho de este trabajo una aventura en lo desconocido*

**Los ESTIMO mucho**

**Celena Lizbeth Sánchez Cabrera**

# ÍNDICE GENERAL

|   |      |
|---|------|
| PORTADA .....                             | I    |
| CERTIFICACIÓN DE DIRECCIÓN DE TESIS ..... | II   |
| CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... | III  |
| AUTORÍA .....                             | IV   |
| CARTA DE AUTORIZACIÓN .....               | V    |
| AGRADECIMIENTO .....                      | VI   |
| DEDICATORIA .....                         | VII  |
| ÍNDICE GENERAL .....                      | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                    | X    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                   | XI   |
| TÍTULO .....                              | XII  |
| RESUMEN .....                             | XIII |
| ABSTRACT .....                            | XIV  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                     | 1    |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA .....           | 2    |
| 2.1 Definición .....                      | 2    |
| 2.2 Etiología .....                       | 2    |
| 2.2.1. Clasificación Taxonómica .....     | 2    |
| 2.2.2. <i>Mycobacterium bovis</i> .....   | 3    |
| 2.2.3. Estructura .....                   | 3    |
| 2.2.3.1. Membrana Plasmática .....        | 3    |
| 2.2.3.2. Pared Celular .....              | 3    |
| 2.2.3.3. Membrana Externa .....           | 4    |
| 2.2.3.4. Genoma .....                     | 4    |
| 2.2.4. Factores de virulencia .....       | 5    |
| 2.3 Hospedadores .....                    | 5    |
| 2.4 Transmisión .....                     | 5    |
| 2.5 Patogénesis .....                     | 6    |
| 2.6 Signos clínicos .....                 | 8    |
| 2.7 Lesiones anatomopatológicas .....     | 8    |
| 2.8 Diagnóstico .....                     | 9    |
| 2.8.1. Clínico .....                      | 9    |



|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.8.2.    | Inspección Veterinaria .....  | 9         |
| 2.8.3.    | Baciloscopía .....  | 9         |
| 2.8.4.    | Cultivo bacteriológico .....  | 10        |
| 2.8.5.    | Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....   | 10        |
| 2.8.6.    | Tuberculinización .....   | 11        |
| 2.8.7.    | Diagnóstico mediante $\gamma$ -IFN .....  | 12        |
| 2.9       | Diagnóstico Diferencial .....   | 12        |
| 2.10      | Control .....   | 12        |
| 2.11      | Epidemiología .....   | 13        |
| <b>3.</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>15</b> |
| 3.1       | Delimitación del área de estudio .....  | 15        |
| 3.2       | Diseño de la investigación .....  | 15        |
| 3.3       | Selección de animales para el estudio .....   | 16        |
| 3.4       | Toma y registro de datos .....  | 16        |
| 3.5       | Tuberculinización Cervical Simple (SITT) .....  | 16        |
| 3.6       | Toma de muestras sanguíneas y diagnóstico de tuberculosis bovina mediante $\gamma$ -IFN .....   | 17        |
| 3.7       | Sacrificio e inspección post mortem de animales con tuberculosis bovina diagnosticados mediante $\gamma$ -IFN .....                                       | 17        |
| 3.8       | Análisis Estadístico .....  | 17        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>18</b> |
| 4.1       | Características de los animales muestreados .....   | 18        |
| 4.2       | Identificación de reactores positivos a la tuberculinización .....  | 19        |
| 4.3       | Confirmación de tuberculosis bovina mediante $\gamma$ -IFN .....  | 20        |
| 4.4       | Identificación de lesiones compatibles con tuberculosis bovina mediante el sacrificio e inspección de los animales diagnosticados con $\gamma$ -IFN ..... | 20        |
| 4.5       | Análisis Estadístico .....  | 20        |
| <b>5.</b> | <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>21</b> |
| 5.1       | Identificación de reactores positivos a la tuberculinización .....  | 21        |
| 5.2       | Confirmación de tuberculosis bovina mediante $\gamma$ -IFN .....  | 21        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>7.</b> | <b>RECOMENDACIONES .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>8.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>9.</b> | <b>ANEXOS .....</b>   | <b>32</b> |

# ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Mycobacterium</i> .....                                 | 2  |
| <b>Tabla 2.</b> Clasificación de la Reacción de acuerdo al engrosamiento del pliegue cutáneo .....             | 16 |
| <b>Tabla 3.</b> Características de los animales muestreados .....  | 18 |
| <b>Tabla 4.</b> Resultados de la prueba cervical simple, clasificados de acuerdo a las variables tomadas ..... | 19 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estructura de la pared celular de Mycobacterium (Gradmann, 2006) .....   | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Vías de transmisión de la Tuberculosis Bovina (Babaahman, 2017).....   | 6  |
| <b>Figura 3.</b> Nódulo linfático mediastínico, con lesión compatible con tuberculosis bovina (Torres, y otros, 2012) .....     | 8  |
| <b>Figura 4.</b> Pulmón en proceso de caseificación diseminado por todo el órgano (Torres, y otros, 2012).....                  | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Mapa de distribución de Tuberculosis bovina (OIE, 2016) .....  | 14 |
| <b>Figura 6.</b> Dosificador de Tuberculina.....  | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Cutímetro para medir el grosor de la piel .....  | 34 |
| <b>Figura 8.</b> Depiladora.....  | 34 |
| <b>Figura 9.</b> Tubos con lithium heparin para las muestras de sangre.....   | 35 |
| <b>Figura 10.</b> Holder y agujas de toma múltiple .....  | 35 |
| <b>Figura 11.</b> Derivado proteico purificado de Mycobacterium bovis cepa AN-5, concentración 2 500 IU/0.1ml Intradérmico..... | 36 |
| <b>Figura 12.</b> Caja Culler para el transporte de la tuberculina.....   | 36 |
| <b>Figura 13.</b> Primera medición del pliegue cutáneo en la tabla del cuello.....  | 37 |
| <b>Figura 14.</b> Aplicación de Tuberculina .....   | 37 |
| <b>Figura 15.</b> Animal positivo a la Tuberculina.....   | 38 |
| <b>Figura 16.</b> Animal negativo a la Tuberculina.....   | 38 |
| <b>Figura 17.</b> Toma de muestras de Sangre .....  | 39 |
| <b>Figura 18.</b> Distribución de las muestras .....  | 39 |
| <b>Figura 19.</b> Obtención del plasma.....   | 40 |
| <b>Figura 20.</b> Kits ELISA (placa).....   | 40 |
| <b>Figura 21.</b> Kits ELISA (reactivos).....   | 40 |
| <b>Figura 22.</b> Resultados de la prueba de ELISA $\gamma$ -IFN.....   | 41 |
| <b>Figura 23.</b> Lectura ELISA $\gamma$ -IFN.....  | 41 |
| <b>Figura 24.</b> Resultados de la lectura de ELISA $\gamma$ -IFN.....  | 42 |
| <b>Figura 25.</b> Registro .....  | 42 |

**“USO DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN FINCAS DE LA  
PROVINCIA DE LOJA”**

## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBB) es causada por el *Mycobacterium bovis*; es una enfermedad zoonótica que afecta principalmente al ganado bovino y en menor proporción al ser humano, por lo que las entidades sanitarias buscan el control y la erradicación de la enfermedad mejorando las pruebas rutinarias de diagnóstico, incrementando pruebas moleculares e inmunoenzimáticas. El objetivo del presente trabajo fue usar técnicas inmunológicas para el diagnóstico de TBB en fincas de la provincia de Loja en los cantones Catamayo, Espíndola y Gonzanamá. La población fue integrada por 46 bovinos de cinco predios de los cantones antes mencionados que participaron voluntariamente (muestreo no probabilístico). Los animales incluidos en el estudio fueron hembras y machos con edades sobre los seis meses, hembras que no se encuentren en gestación y animales en general que no hayan sido sensibilizados con tuberculina por lo menos sesenta días antes del ensayo. El estudio dio inicio con la tuberculinización cervical Simple (SITT) empleando un derivado proteico purificado bovino (PPDb), administrado por vía intradérmica en la tabla del cuello. De los reactores positivos posteriormente se obtendría muestras de sangre entera para confirmación de diagnóstico mediante  $\gamma$ -IFN. Los resultados obtenidos en la SITT fueron 2 animales con induraciones superiores a 4mm. Los resultados de la prueba de  $\gamma$ -IFN fueron negativos en ambos casos. Las diferencias podrían deberse a la baja sensibilidad de SITT o a reacciones cruzadas ante agentes afines no patógenos para los bovinos, lo que genera al avanzar los programas de control y erradicación de la enfermedad un aumento de falsos positivos.

**Palabras claves:** Tuberculosis Bovina; Tuberculina;  $\gamma$ -IFN; Loja

## ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TBB) is caused by *Mycobacterium bovis*; It is a zoonotic disease that affects mainly cattle and to a lesser extent human, so health entities seek control and eradication of the disease by improving routine diagnostic tests, increasing molecular and immunoenzymatic tests. The objective of this work was to use immunological techniques for the diagnosis of TBB on farms in the province of Loja in the cantons of Catamayo, Espíndola and Gonzanamá. The population was made up of 46 cattle from five farms in the aforementioned cantons that participated voluntarily (non-probabilistic sampling). The animals included in the study were females and males aged over six months, females that were not in pregnancy and animals in general that had not been sensitized with tuberculin for at least sixty days before the test. The study began with Simple cervical tuberculinization (SITT) using a purified bovine protein derivative (PPDb), administered intradermally in the neck table. Whole blood samples would subsequently be obtained from positive reactors for diagnostic confirmation by  $\gamma$ -IFN. The results obtained in the SITT were 2 animals with indurations greater than 4 mm. The  $\gamma$ -IFN test results were negative in both cases. The differences could be due to the low sensitivity of SITT or to cross-reactions to related non-pathogenic agents for cattle, which generates an increase in false positives as the disease control and eradication programs advance.

**Key words:** Bovine tuberculosis; Tuberculin;  $\gamma$ -IFN; Loja

# 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad que se presenta de forma crónica, es causada por la bacteria *Mycobacterium bovis* y provoca un deterioro del estado de salud, que, a la larga, conlleva a la muerte (OIE, 2016). Su distribución es a escala mundial, ocasionando pérdidas en la economía del productor, comercio internacional e impactando de manera significativa en la salud del ser humano dado su potencial zoonótico (OMS, 2018).

La infección por *Mycobacterium bovis* es responsable de alrededor de 7000 casos nuevos de tuberculosis en seres humanos anualmente en el continente americano (Flores et al., 2005). Gran parte de la población habita en zonas periféricas y rurales que consumen productos lácteos no pasteurizados, lo que se convierte en una vía eficaz, quizás la más importante, de transmisión del patógeno hacia el ser humano (Albarracín et al., 2008).

La tasa de incidencia de tuberculosis humana en Ecuador el 2017 fue de 43 casos nuevos por 100000 habitantes (Silvia et al., 2019), aunque es difícil atribuirlos a *M. bovis* debido a la complejidad en las pruebas de laboratorio (Proaño et al., 2011) (Kantor, y otros, 2008). El país presenta condiciones necesarias para la transmisión de la micobacteria (Salazar et al, 2017), tales como el incremento de la población bovina en la región Sierra y el descuido del control de enfermedades zoonóticas al momento de la comercialización y movilización (Acebo & Nunez, 2016).

Es necesario que el control de la tuberculosis bovina se realice en concordancia al criterio “Una salud” enunciado por la FAO, el cual reconoce la estrecha relación entre salud humana, animal y el medio ambiente y cuyo primordial fin es garantizar seguridad de la población (Dean, y otros, 2018). Sin embargo, la prevención y control de la enfermedad se complica por la falta de voluntad de productores y propietarios para sacrificar o eliminar animales infectados (De Kantor & Ritacco, 2006); además de factores humanos como la falta de técnicos capacitados para realizar diagnóstico; y por resultados falsos positivos ocasionados probablemente por reacciones inespecíficas debido a bacterias patógenas y ambientales (*M. avium*) (De la Rúa Domenech, y otros, 2006).

Por lo antes indicado, los objetivos propuestos en la presente investigación fueron los siguientes:

- Identificar reactores positivos mediante tuberculinización de ganado vacuno de los cantones Espíndola, Gonzanamá y Catamayo de la provincia de Loja.
- Confirmar tuberculosis bovina en vacunos con reacciones positivas a la tuberculinización en los cantones Espíndola, Gonzanamá y Catamayo, utilizando  $\gamma$ -IFN
- Identificar lesiones compatibles con tuberculosis bovina mediante el sacrificio e inspección de los animales diagnosticados utilizando  $\gamma$ -IFN

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Definición

La tuberculosis bovina, es una enfermedad bacteriana crónica que afecta a diferentes especies de mamíferos (Spickler, 2009). Los animales afectados presentan lesiones granulomatosas, afectando principalmente al sistema respiratorio, tejido pulmonar y los nódulos linfáticos en el ganado (Echeverría, y otros, 2014). La TBB genera grandes pérdidas en la producción láctea y además es considerada como un potencial riesgo para la salud humana por su capacidad zoonótica (Proaño et al., 2011).

### 2.2 Etiología

#### 2.2.1. Clasificación Taxonómica

Según el Manual de Sistemática de Archaea y Bacterias (BMSAB), última edición amplia la taxonomía del género:

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del género *Mycobacterium*

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| Filo    | <i>Actinobacteria</i>    |
| Clase   | <i>Actinobacteria</i>    |
| Orden   | <i>Corynebacteriales</i> |
| Familia | <i>Mycobacteriaceae</i>  |
| Género  | <i>Mycobacterium</i>     |

(Bergey's & Wiley., 2018)

De acuerdo a la enfermedad que producen las micobacterias se agrupan de la siguiente manera:

- Lepra, enfermedad causada por el *Mycobacterium leprae*.
- Micobacteriosis, enfermedad producida por las micobacterias no tuberculosas (MNT), atípicas o ambientales. Su nomenclatura varía de acuerdo al poder patógeno para las distintas especies animales como *Mycobacterium simiae* o *M. avium*. Se encuentran libres en el ambiente, actúan como patógenas oportunista, cuando el animal está pasando por condiciones inmunosupresoras (Mancheco Valencia, y otros, 2016)
- Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. (CMTB), engloba al grupo de bacterias responsables de ocasionar la tuberculosis en humanos y animales. Difieren de las demás micobacterias, por la homología genética que comparten entre ellas, 99.9 % de similitud en su ADN (Pinera, Muñoz, & Martínez, 2014). Complejo formado por



*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii* (Mancheno Valencia, y otros, 2016).

### **2.2.2. *Mycobacterium bovis***

*Mycobacterium bovis*, el agente causal de tuberculosis bovina, habita por largos periodos fuera del huésped, en temperaturas como el frío, congelación y desecación, es sensible al calor, radiación y pasteurización (Quintero Rada, y otros, 2019)

Estos agentes, son micobacterias intracelulares, que usan a los macrófagos y monocitos como células diana, para viajar por todo el organismo. Existe un amplio rango de hospederos, afectando animales domésticos, silvestres y al ser humano (Bechini Bernad, 2017).

### **2.2.3. Estructura**

La envoltura del *M. bovis* es compleja, está formada de proteínas entrelazadas en una matriz de peptidoglicano, ácidos micólicos, arabinogalactano, lípidos y carbohidratos (Wolfe, y otros, 2010). Brindándole soporte, protección y mecanismos que permiten intercambiar sustancias con el medio ambiente (Palomino, y otros, 2007), también ayuda a que se desarrolle en medios hostiles como lo es el macrófago (Dinadayala, y otros, 2008).

Las micobacterias se componen de tres segmentos: membrana plasmática, pared celular y membrana externa (Kaur, y otros, 2009)

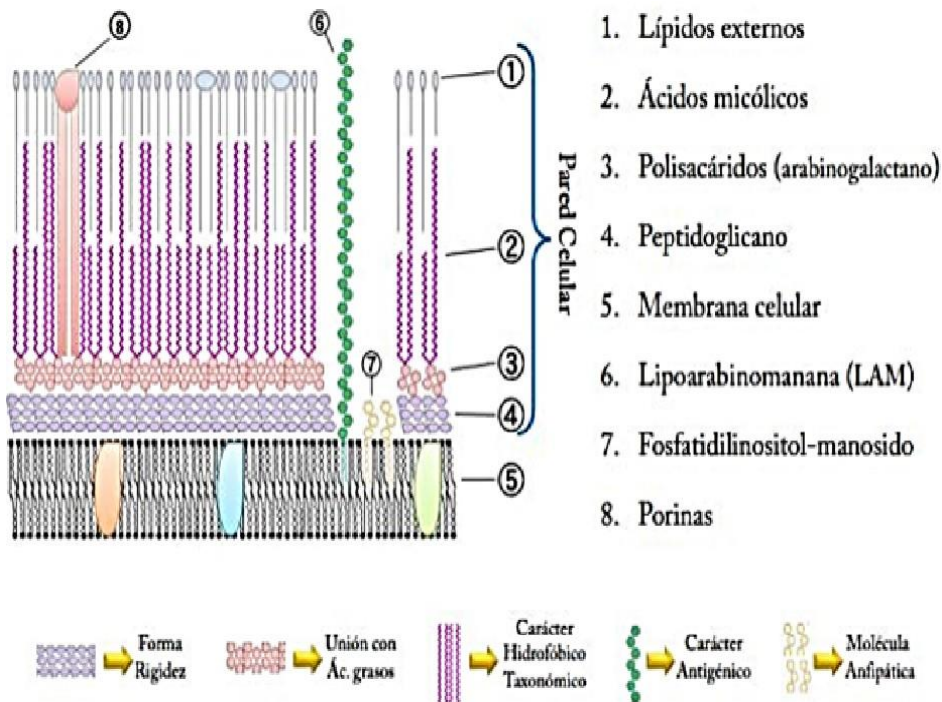
#### **2.2.3.1. Membrana Plasmática**

Le brinda protección osmótica y transporte de iones y moléculas a la micobacteria, se encuentra rodeada de carbohidratos, lípidos y proteínas vitales en los procesos patológicos (Rodríguez, 2006)

#### **2.2.3.2. Pared Celular**

Contiene una alta cantidad de lípidos responsables de la propiedad de acidorresistente, crecimiento lento, resistencia a detergentes y antibacterianos comunes y antigenicidad (Alejandra, y otros, 2002); proteínas que se encargan de la construcción de la pared; y otras proteínas llamadas porinas responsables del transporte de solutos a través de la capa de ácido micólico (Forrellad, y otros, 2013).

Glicolípidos altamente antigénicos, que se encuentran aferradas a la membrana plasmática y al exterior de la pared, importantes en serodiagnóstico de las infecciones micobacterianas (Lopez, y otros, 2006). El complejo peptidoglicano-ácido micólico-arabinogalactano o mycolyarabinogalac-peptidoglicano (POP) constituye el núcleo de la pared, mientras que el lipoarabinomanano (LAM) facilita la entrada de la bacteria al macrófago e inhibe la unión fago-lisosomal (fig. 1). El lipomanano (LM) y fosfatidilmiioinositol (PIM) están implicados en la respuesta inmune (Kaur, y otros, 2009).



**Figura 1.** Estructura de la pared celular de *Mycobacterium* (Gradmann, 2006)

### 2.2.3.3. Membrana Externa

Está conformada por los lípidos de la pared celular y una cantidad considerada de ácidos micólicos, fosfatidilinositol manosidasa (PIM), lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM), que se presentan en grandes cantidades (Pitarque, y otros, 2008).

Los ácidos micólicos o ácidos grasos son excepcionalmente largos, representan del 30-40% de la masa de la envoltura celular, esta característica distingue a las especies del género *Mycobacterium*, de otras procariontas (Niederweis, y otros, 2010).

### 2.2.3.4. Genoma

Existe una amplia similitud genómica entre el *M. bovis* y *M. tuberculosis*, aunque la supresión de genes ha conducido a una reducción del tamaño del genoma. *M. bovis*

AF2122/97 tiene 4345492 pb, DNA circular, 65% G-C, 4001 genes, 3918 proteínas codificantes, 50 RNAs estructurales, 33 pseudogenes (NCBI, 2011B). Además, no existen genes exclusivos de *M. bovis*, lo que implica que la expresión génica diferencial puede ser la clave de los tropismos del huésped de los bacilos humanos y bovinos (Garnier, y otros, 2003).

#### **2.2.4. Factores de virulencia**

Los factores de virulencia pueden ser proteínas o componentes de la pared celular como: el factor cordón que en micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* forma estructuras que se parecen a cuerdas con características de ejercer toxicidad por la alteración en la cadena respiratoria mitocondrial (Brennan, 2003); los sulfolípidos que inactivan al fagosoma de los macrófagos y la enzima superóxido dismutasa que actúa inhibiendo la apoptosis (Alvarez, y otros, 2009).

Las micobacterias también evitan la acidificación del fagosoma. Normalmente la ingesta de la bacteria por fagocitosis desencadena la acidificación del fagosoma, mediada por ATPasas de la membrana fagosomal, produciendo protones en el interior de la estructura, lo que reducirá el pH. Dicha acidificación inhibe el crecimiento de las bacterias y ayuda en la fusión lisosoma-fagosoma y en la activación de los factores bacterianos liberados durante la fusión. Las micobacterias contrarrestan la acidificación produciendo amoniaco para mantener las condiciones óptimas para el crecimiento dentro de las vesículas (Rivera & Giménez, 2010).

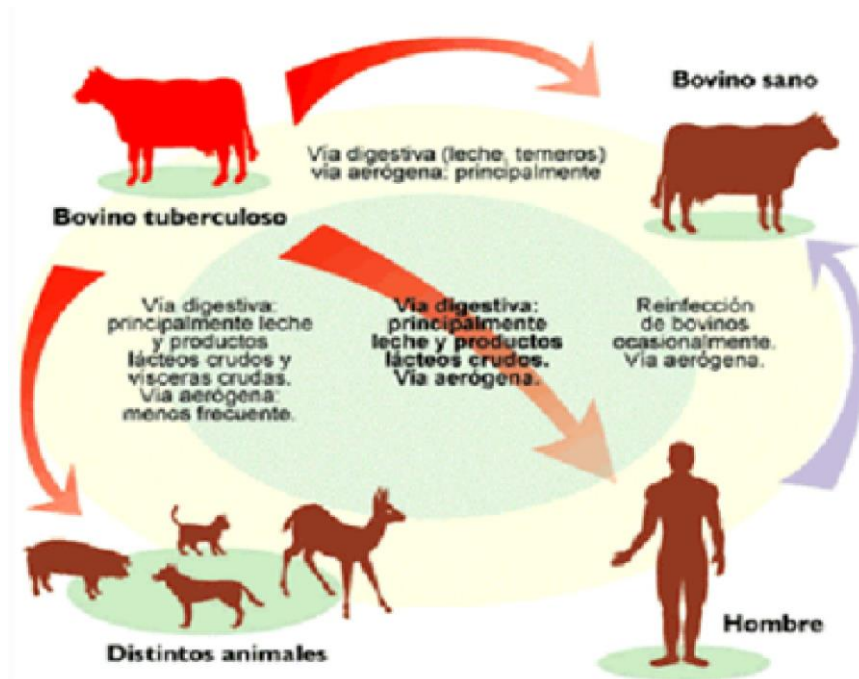
### **2.3 Hospedadores**

El *M. bovis*, tiene un sin número de hospedadores animales (ovejas, cabras, cerdos, asnos, caballos, perros, gatos, conejos, liebres, jabalíes, tejones, cobayas, camellos, cebras, jirafas, búfalos, etc.), primates no humanos y humanos (Spickler, 2009), también se encuentra en el medio ambiente, pueden sobrevivir varios días incluso semanas y hasta meses en cultivos de maíz, heno, tierra y agua en condiciones favorables para su desarrollo (Fine, y otros, 2011).

### **2.4 Transmisión**

La forma más frecuente de transmisión es por vía aerógena, por inhalación de aerosoles con bacilos tuberculosos afectando principalmente al sistema respiratorio y a los nódulos linfáticos más cercanos (Serrano, y otros, 2018). Los animales también pueden adquirir la enfermedad por vía digestiva al estar en contacto con secreciones y excreciones; al ingerir agua y alimentos contaminados con dichas secreciones, siendo los

terneros son los más predisponentes al ingerir la leche de la madre infectada (fig. 2) (Ojeda Gutierrez, 2017). El agente constituye un riesgo biológico para el humano, en vista que existe la posibilidad de transmitirse a través de la ingestión de productos lácteos no pasteurizados, carne cruda o mal cocida, también por aerosoles y heridas en la piel (Pinera, y otros, 2014).



**Figura 2.** Vías de transmisión de la Tuberculosis Bovina (Babaahman, 2017)

Otra vía de infección poco común es la congénita de la madre al feto por el paso de las bacterias por medio del cordón umbilical, constituye el 1% de los casos que se presentan (Ramos Morales, 2017).

## 2.5 Patogénesis

La patogénesis dependerá de la susceptibilidad del hospedador y la capacidad del patógeno en resistir la respuesta inmunológica (Garza Velasco, y otros, 2017). También de la cantidad de bacilos y la vía de transmisión; ya que al ingresar por vía aerógena es suficiente una mínima cantidad de micobacterias, al contrario de la vía digestiva que debe haber una mayor cantidad para provocar la infección (Ojeda Gutierrez, 2017).

- Primera Etapa

Al entrar las micobacterias por vía aerógena, las partículas más pequeñas llegan a las vías respiratorias inferiores, en los alveolos en donde son fagocitados por los macrófagos alveolares, si la respuesta inmune es eficaz, causará la eliminación del patógeno por acción fagocítica (Palomino, y otros, 2007).

De lo contrario, si el animal está pasando por un estado de inmunodepresión los mecanismos no serán eficaces, el agente infeccioso sobrevivirá en el pulmón. Ingresando al macrófago con la capacidad de replicarse, inhibiendo la acidificación al impedir la unión del fagosoma con el lisosoma (Murray, y otros, 2007), o puede fusionarse con otras vesículas intracelulares para facilitar el acceso a nutrientes y al proceso de replicación intravascular. Además el bacilo tiene la capacidad de impedir la activación de macrófagos por  $\gamma$ -IFN e IL 12, provocando que el huésped sea susceptible (Alcaís, y otros, 2005).

- Segunda Etapa

En los días siguientes se produce un crecimiento logarítmico de las bacterias dentro de los macrófagos, que son destruidos, liberando las micobacterias en el medio extracelular (Palmieri, 2001), en esta etapa se forma células gigantes multinucleadas a partir de macrófagos fusionados (Murray, y otros, 2007). Inicia el reclutamiento celular, al que acuden monocitos sanguíneos y otras células inmunitarias atraídos por la infección, ya que ellos pueden diferenciar a los macrófagos que no son capaces de destruir las micobacterias (Gillespie & Hawkey, 2006).

El crecimiento sin obstáculo, de las bacterias, finaliza cuando aparecen los macrófagos activados, resguardados por dos mecanismos inmunitarios: la inmunidad mediada por células (CMI) y la hipersensibilidad retardada (HR) (Palmieri, 2001).

Los macrófagos infectados producen quimiocinas inflamatorias y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-), los que van a reclutar células blancas de la sangre; linfocitos de dos líneas (los CD4 + relacionados con la CMI y los CD 8 ligados a la HR) los que eliminan los macrófagos no activados, lo que va a producir áreas necróticas caseosas, en las cuales los bacilos ya no pueden replicarse como pasaba en los macrófagos, pero pueden mantenerse en estado latente (Cataldi & Romano, 2007).

Las células que fueron reclutadas, son capaces de producir su complemento de quimiocinas y citoquinas ampliando el reclutamiento celular, lo que provoca una masa celular (tubérculo o granuloma), conformada desde su interior hacia su exterior; macrófagos infectados (núcleo), macrófagos espumosos, linfocitos rodeados de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (Palomino, y otros, 2007).

- Tercera Etapa

Se produce la inactivación de las células inmunes, ya que no pueden controlar la proliferación de micobacterias. La licuefacción de las áreas de necrosis caseosa puede generar posteriormente una infección primaria o un largo período de quiescencia. En el caseum hidrolizado se desarrollan mejor los bacilos, lo que producirá una proliferación extracelular intensa sin impedimento inmunitario (Palomino, y otros, 2007).

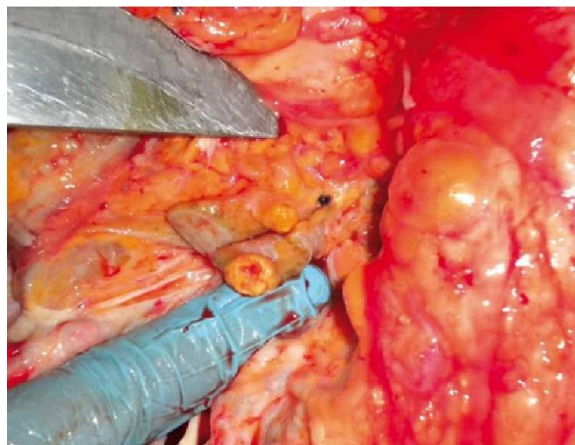
## 2.6 Signos clínicos

La TBB presenta signos en una etapa avanzada, aunque en la mayoría de los casos es asintomática, al no manifestarse signos clínicos evidentes, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad (Lomillos Perez, y otros, 2018).

Los signos varían en función a los órganos afectados pudiendo ser en forma generalizada fiebre fluctuante, inapetencia, decaimiento, emaciación, baja producción lechera aumentando progresivamente. También se pueden manifestar signos respiratorios como: tos seca con secreción mucosa de origen bronquial, taquipnea y disnea (Spickler, 2009)

## 2.7 Lesiones anatomopatológicas

Según Leghari, et al. (2020), la TBB se caracteriza por formar granulomas a nivel de nódulos linfáticos, por lo general son de color amarillento (Fig.3). Además, por ser una patología debilitante, puede afectar a cualquier parte del organismo, los pulmones, linfonódulos, tejido hepático, bazo, pleura y peritoneo. Las lecciones en algunas ocasiones aparecen en los genitales de la hembra, pero con menos presencia en los genitales del macho (Camacho, 2008).



**Figura 3.** Nódulo linfático mediastínico, con lesión compatible con tuberculosis bovina (Torres, y otros, 2012)

Las alteraciones pulmonares son de tamaño considerable, con presencia de caseificación (destrucción o muerte coagulativa de las células, en la que los tejidos destruidos forman una masa amorfa granular y friable de aspecto semejante al requesón) con zonas de mineralización (Fig. 4). En superficies serosas, así como en las cápsulas de los órganos se notan nódulos firmes de superficie lisa que van de los 2 a 10 cm de diámetro (Mantilla, y otros, 2009).



**Figura 4.** Pulmón en proceso de caseificación diseminado por todo el órgano (Torres, y otros, 2012)

Mediante el diagnóstico histopatológico, las lesiones encontradas son: granulomas múltiples de diversos diámetros en el parénquima. La parte central engrosada con abundante material caseoso, los bordes con numerosas células mononucleares y células gigantes multinucleadas de diversos tamaños (Mantilla, y otros, 2009).

## **2.8 Diagnóstico**

### **2.8.1. Clínico**

La enfermedad se puede presentar en forma subclínica y presentar signos clínicos en fases tardías, también puede seguir un curso rápidamente progresivo, el examen clínico proporciona pocos datos sugerentes a la enfermedad (Strain, McNair, y otros, 2011) (Salazar, y otros, 2007).

### **2.8.2. Inspección Veterinaria**

Este método diagnóstico tiene una sensibilidad del 28% y una especificidad de 99% (Biffa, y otros, 2010). Se lleva a cabo en animales faenados mediante una inspección *post mortem*, identificando lesiones macroscópicas de tipo granulomatoso, caseoso o mineralizado en tejido como nódulos linfáticos y órganos que pueden estar relacionado con las vías de ingreso del microorganismo.

Las lesiones encontradas pueden estar asociadas a otras patologías o causadas por distintos microorganismos; por lo que se debe confirmar el diagnóstico mediante pruebas de laboratorio complementarias (Milian Suazo, y otros, 2010).

### **2.8.3. Baciloscopia**

Se realiza mediante la técnica de Ziehl-Neelsen, consiste en colorear las bacterias con ácido alcohol resistentes (BAAR), se requiere el colorante primario, carbol fucsina que

penetre en la pared de la micobacteria, al estar teñida resiste la decoloración por el ácido alcohol, al observar en el microscopio los bacilos son rojos contrastando con un fondo de color azul por el colorante azul de metileno (medio de contraste) (Koneman & Allen, 2008).

Es considerada una técnica económica, práctica y con resultados rápidos. La sensibilidad y especificidad (comparación con el cultivo *in vitro*) está entre 43.5% y 94.4% respectivamente (Proaño, y otros, 2011).

#### **2.8.4. Cultivo bacteriológico**

Considerado como el método decisivo para diagnosticar la TBB, también permite la identificación de las especies de micobacterias comprometidas (Ettinger & Felman, 2007). Esta prueba es más utilizada para confirmar animales reactivos positivos a la tuberculina, se realiza a partir de tejidos (muestras) de pulmones y nódulos linfáticos (Medeiros, y otras, 2010), o para confirmar lesiones macroscópicas relacionadas a la enfermedad (Diguimbaye Djaibe, y otros, 2006).

El cultivo posee una sensibilidad y especificidad, 53% y 88% respectivamente (Rivera & Giménez, 2010). Las muestras obtenidas (esputo, leche, nódulos linfáticos y órganos), se centrifugan y el sedimento se inocula en medios como Stonebrink y Lowestein-Jensen (L-J) (Brooks, y otros, 2011). El crecimiento de las micobacterias es lento, puede tardar hasta 6 semanas y las colonias se observan lisas, redondeadas y de color beige (Spickler, 2009).

#### **2.8.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las técnicas de diagnóstico basadas en la amplificación de ADN de *M. bovis* por medio de reacción en cadena de polimerasa, pueden amplificar cantidades extremadamente pequeñas de ADN, y hacerlas detectables por medios convencionales (Milian Suazo, y otros, 2010). Esta prueba es considerada una de las más rápidas y confiables a diferencia de los otros métodos de diagnóstico. Las muestras se obtienen de tejido de nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio (traqueo bronquiales, mediastínicos o retrofaríngeos) (Estrada, y otros, 2004).

La PCR que tiene como blanco la secuencia IS6110, presente en las bacterias del complejo *M. tuberculosis*, sirve para el análisis molecular junto al gen de la proteína MPB70, usados para el diagnóstico de tuberculosis en bovinos, que permite confirmar la infección en tejidos fijados en parafina. Puede proporcionar resultados falsos negativos, al estar por un largo tiempo los tejidos expuestos a formol (Milian Suazo, y otros, 2010).

En estudios realizados en campo en muestras de lesiones compatibles con TBB, se establece que la sensibilidad y la especificidad de la prueba PCR anidada es de 100% y



77%, respectivamente (Estrada, y otros, 2004).

### 2.8.6. Tuberculinización

Las pruebas de tuberculina son consideradas como instrumentos valiosos en el control y la erradicación de TBB, consiste en un procedimiento básico para reconocer a los animales infectados. Su sensibilidad puede verse afectada por diversos factores entre ellos: la potencia y la dosis de tuberculina utilizada, intervalo post infección, la desensibilización, la inmunosupresión postparto, la variación de la medición por el observador y el contacto con micobacterias no tuberculosas (ambientales) (Proaño, y otros, 2011) (De Ward, 2005).

Su aplicación es por vía intradérmica. Las pruebas tuberculínicas son tres:

- AC: Prueba ano-caudal de rutina (con DPP bovino)
- CS: Prueba cervical simple de saneamiento (con DPP bovino)
- CC: Prueba cervical comparativa (con DPP bovino y con DPP aviar)

Las pruebas comúnmente usadas son las AC y CS, mientras que la última prueba CC, se aplica en situaciones especiales, cuando el criterio epidemiológico así lo aconseja, ya que su función es clarificar si la presencia de la enfermedad es debida a una infección por *M. bovis* (Torres, y otros, 2012). Cuando se necesita mayor sensibilidad, como en zonas de alta prevalencia, se aplica en el pliegue caudal y para el caso de requerir mayor especificidad (baja prevalencia), se utiliza la doble comparativa en el cuello (CC) (Estrada, y otros, 2004).

Las tuberculinas que se pueden utilizar en el diagnóstico son un derivado proteico purificado de tuberculina bovina (DPP), elaborada con *M. bovis* (cepa AN5) de 1mg/ml de concentración y la DPP aviar, elaborada con una cepa de *M. avium* (cepa D4) de 0,5 mg/ml de concentración. Se entiende por Derivado Proteico Purificado de tuberculina (DPP) o (PPD) a una preparación obtenida a partir de productos solubles sometidos a tratamiento térmico del cultivo y la lisis de bacilos tuberculosos (*M. bovis*) capaz de poner de manifiesto la hipersensibilidad tardía en un animal sensibilizado por microorganismos de la misma especie (Torres, y otros, 2012).

La prueba de tuberculina puede alcanzar en forma general una sensibilidad de 77% al 95% y especificidad de 75% al 99,9% (De Ward, 2005). La lectura de la prueba de tuberculina se realiza 72 horas posteriores a la inyección intradérmica. En lo que se puede clasificar en:

- **Reacción Negativa:** Aumento máximo de 2 mm del espesor en la región de inoculación con ausencia de signos clínicos (exudado, necrosis, dolor a la palpación)

- o reacción inflamatoria de los ganglios regionales)
- **Reacción Dudosa:** Aumento del espesor del pliegue superior a 2mm e inferior a 4 mm con ausencia de signos clínicos.
  - **Reacción Positiva:** Aumento del espesor del pliegue de más de 4mm o presencia de signos clínicos (OIE, 2016).

Debido a los casos falsos positivos que se presentan por las micobacterias ambientales, se realizan pruebas comerciales complementaria a la prueba de tuberculina, que miden el  $\gamma$ -IFN (De Ward, 2005).

### 2.8.7. Diagnóstico mediante $\gamma$ -IFN

El Interferón gamma ( $\gamma$ -IFN), es una citoquina producida por los linfocitos T CD4+, CD8+ y por células Natural Killer (NK), que se libera en respuesta a un estímulo inmune o de carácter inflamatorio (Miller, y otros, 2009).

Esta prueba se realiza posterior a la aplicación de tuberculina; ya que los animales infectados por *M. bovis*, tienen linfocitos circulantes sensibilizados a los antígenos micobacterianos, los que liberarán interferón gamma, el cual es detectado a través de un sistema de ELISA sándwich; donde encontramos anticuerpos antigamma interferón unidos a una placa (96 con pozos) que capturara el gamma interferón bovino. La reacción que se detecta es un cambio de color provocado por la adición de un anticuerpo específico antigamma interferón conjugado a una peroxidasa (Razaghi, y otros, 2016) (Clegg, y otros, 2019).

De acuerdo a estudios realizados recientemente en diferentes países, se estima que la sensibilidad de la prueba es de 67% y la especificidad del 98%. Sin embargo, para optimizar los resultados las muestras deben ser procesadas en un tiempo máximo de 8 horas después de la recolección (Clegg, y otros, 2019).

## 2.9 Diagnóstico Diferencial

Deben considerarse patologías como pleuroneumonía contagiosa bovina, neumonía por *Pasteurella* o *Corynebacterium pyogenes*, neumonía por aspiración, pericarditis traumática, linfadenitis caseosa o melioidosis en rumiantes pequeños e infección crónica atípica por fasciola hepática (OIE, 2008).

## 2.10 Control

La medida de control más práctica es la prueba y posterior sacrificio si el animal es positivo a TBB, debido a que afecta la salud del bovino con consecuencias graves en la economía ganadera y por tener repercusión en la salud humana. Por lo que países en desarrollo o en vías de desarrollo han adoptado programas nacionales con estas

consideraciones para erradicar la enfermedad (Orloski, y otros, 2018).

En Ecuador, el control de la tuberculosis bovina está a cargo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD); así pues, los predios que deseen pueden estar certificados como libres de la enfermedad, para lo cual se realiza el diagnóstico mediante la aplicación de dos pruebas de tuberculina: se aplica en el pliegue ano caudal, en bovinos mayores a los 6 meses de edad con un intervalo de 120 a 180 días bajo supervisión del médico veterinario oficial (Agrocalidad, 2017).

En el caso que solo una muestra resulte positiva, se realiza la prueba cervical comparativa para la confirmación del caso sospechoso. Si el animal resulta positivo se activa el sistema de vigilancia pasiva de control sanitario de la enfermedad y proceden al sacrificio de los mismos. Al ser de carácter voluntario no se cumplen con los objetivos del programa sanitario, por ende, no se lleva a cabo el control total de la enfermedad (Agrocalidad, 2017).

La aplicación de la vacuna BCG (Bacilo De Calmette-Guérin), está actualmente prohibida por la Unión Europea, debido a que interviene en el diagnóstico veraz de la enfermedad en las pruebas oficiales de control como la intradermotuberculinización (IDTB), además están basadas en antígenos enteros vivos o atenuados con un bajo nivel de protección por lo que los animales podrían infectarse, a esto se suma la baja sensibilidad y especificidad de las pruebas de tuberculina para segregar entre animales verdaderamente positivos y verdaderamente negativos por lo que detectan como positivos tanto animales infectados como los sensibilizados por la vacuna (Arrieta Villegas, y otros, 2018).

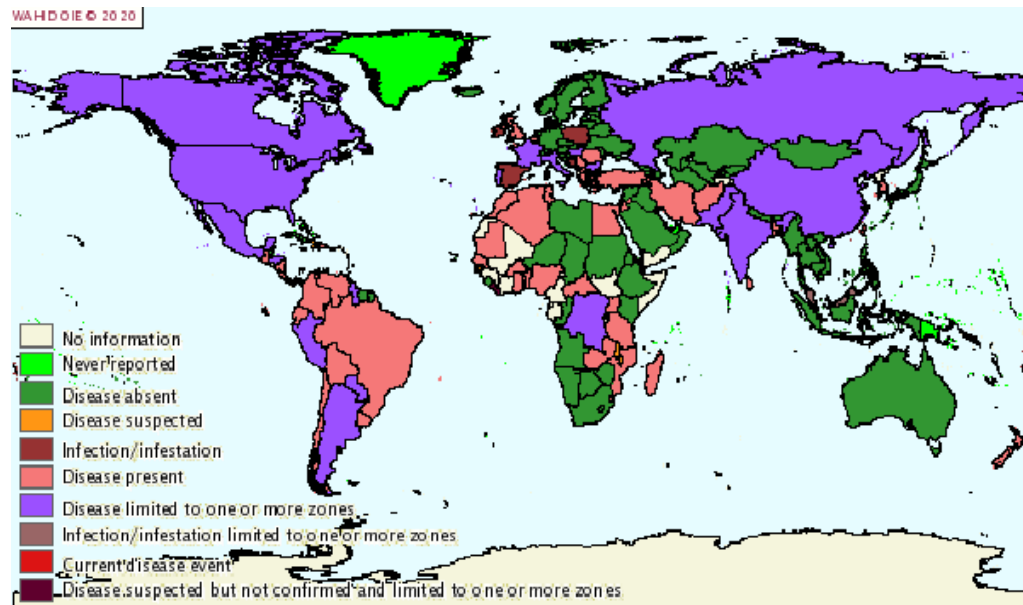
## **2.11 Epidemiología**

La tuberculosis bovina constituye una importante zoonosis, ya que puede alcanzar una prevalencia del 15% en zonas donde la leche no pasa por el proceso de pasteurización, provocando una tuberculosis extrapulmonar en la mayoría de los casos (Ameni, y otros, 2010). Otra forma de contagio es mediante la inhalación de aerosoles o por medio de la manipulación de la carne contaminada en los mataderos (Spickler, 2009).

En 2016, a nivel mundial se reportó 147000 casos de TBB en seres humanos, África fue el continente con mayor número de casos 72700 seguido de Asia con 46700 y América con 822 casos (OIE, 2016).

Aunque en algunos países del mundo como Australia, Islandia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Austria, Suiza, Luxemburgo, Letonia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, Republica Checa, Canadá, Singapur, Jamaica, Barbados e Israel la TBB ha sido erradicada mediante los programas de control de la enfermedad (Fig. 5) (Spickler, 2009)

(Thoen, y otros, 2006).



**Figura 5.** Mapa de distribución de Tuberculosis bovina (OIE, 2016)

La industria ganadera se ve afectada con importantes pérdidas económicas, así por ejemplo en la leche por lactancia las pérdidas van desde los 120 kg hasta 537 kg en vacas que han sido reactivos positivos a las pruebas de IDTB (SITT) en relación con las que no tuvieron reacción (Boland, y otros, 2010).

En América Latina y el Caribe, la TBB está distribuida en el ganado lechero. Sin embargo, en algunos países como Cuba, Costa Rica, Panamá y Uruguay están en etapa de erradicación de la enfermedad esto debido a los programas de control y vigilancia epidemiológica (De Kantor, y otros, 2008).

En Ecuador, según datos del Ministerio de Salud Pública de 2010, se reportaron los datos totales de TB, por provincia. Sin embargo por falta de estudios y de identificación del patógeno se estima que la incidencia se encuentra relacionada con el resto del país de acuerdo a la zona. Preponderando que en los años 1998-2005, se asiló dos cepas de *M. bovis*, en dos niños de TB extrapulmonar, sospechando que la ruta de ingreso del microorganismo fue por ingestión (Stanchi, y otros, 2007).

La prevalencia de TBB, es desconocida, pero se lo ha reportado como un país con alta prevalencia, entre América Latina (De Kantor & Ritacco, 2006). Existe un estudio realizado en el cantón Mejía donde se ha encontrado una prevalencia de 8,63% y 8,43% en hatos grandes, y una incidencia de 1,70% (Proano Perez, y otros, 2009). A nivel de mataderos se identificó en la misma zona 2,3% y 2,4% de prevalencia entre 2007 y 2008, respectivamente (Proaño, y otros, 2011).

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Delimitación del área de estudio**

La presente investigación se realizó en cinco ganaderías de los cantones Espíndola, Gonzanamá y Catamayo de la provincia de Loja.

El cantón Espíndola se encuentra ubicado 173km de distancia de la cabecera provincial, sus coordenadas geográficas son: latitud sur 4°26'20" 4°37'20", longitud 79°29'12"79°18'37". Se ubica en la zona subtropical, su temperatura fluctúa entre los 17 y 36°C, con un promedio de 24°C. La altura es de 1400 a 3400 msnm y cuenta con una superficie de 5124, 22 km<sup>2</sup>. Limita al norte: con los cantones Quilanga y Calvas, al Sur: con la republica del Perú, al Este: con el cantón Chinchipe en la provincia de Zamora Chinchipe, al Oeste: con la republica del Perú y el cantón Calvas (Espíndola, 2017)

El cantón Catamayo se encuentra ubicado a 33,5km de la cabecera provincial, entre las coordenadas 3°59 S y 79°21 O. Su clima es cálido la mayor parte del año, con temperaturas que oscilan entre 15 a 32°C, cuenta con una altitud promedio 1000 msnm y una superficie total de 651,89 km<sup>2</sup>. Limita al Norte: provincia del Oro y al cantón Loja, al Sur: con los cantones Gonzanamá y Loja, al Este: con el cantón Loja y al Oeste: con los cantones Chaguarpamba y Olmedo. Por sus características es una zona óptima para ganadería tipo carne (Catamayo, 2019).

El cantón Gonzanamá, se encuentra ubicado a 82km de la cabecera provincial, se localiza geográficamente a una altitud sur 4°11" y 4°22", longitud 79°17 y 79°35". Posee un clima cálido y templado, su temperatura media anual es de 17,3°C. Su altura fluctúa entre 1000y 2800 msnm y cuenta con una superficie total de 1104 km<sup>2</sup>. Limita al Norte con Catamayo, al Sur con Quilanga, al Este con Loja y Catamayo y al Oeste con Calvas y Paltas (Gonzanamá, 2019).

El procesamiento de muestras sanguíneas se realizó en los laboratorios del Centro de Biotecnología ubicado en la Ciudad Universitaria "Guillermo Falconí" de la Universidad Nacional de Loja.

### **3.2 Diseño de la investigación**

Se realizó un estudio de corte transversal, en dos fases: a) La de campo, en la que se procedió a la tuberculinización bovina, toma de muestras de sangre; y, además se contempló el sacrificio y la inspección de animales con tuberculosis bovina confirmado mediante  $\gamma$ -IFN; y, b) La de laboratorio, durante la cual tuvo lugar el procesamiento de muestras sanguíneas y diagnóstico de tuberculosis mediante  $\gamma$ -IFN.

### 3.3 Selección de animales para el estudio

Para el presente estudio se consideraron 46 bovinos de cinco predios, cuyos propietarios participaron voluntariamente (muestreo no probabilístico, por conveniencia) luego de haber socializado la metodología de trabajo. Los animales tuberculinizados cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: hembras y machos con edades sobre los seis meses, hembras no gestantes y animales en general que no hayan sido sensibilizados con tuberculina previamente, por lo menos sesenta días antes del estudio.

### 3.4 Toma y registro de datos

En campo, se llevó registros para ordenar la información general de la explotación y de los animales muestreados (procedencia, tipo de explotación, edad, raza y sexo); así mismo, se anotaron los datos obtenidos de las mediciones de la piel antes y después de la aplicación de tuberculina, para su posterior interpretación. En laboratorio, se llevaron registros que permitan manejar la información de los resultados del test  $\gamma$ -IFN, que finalmente permitirían establecer los criterios para el sacrificio y la inspección post mortem.

### 3.5 Tuberculinización Cervical Simple (SITT)

En cada animal, antes de la aplicación de la tuberculina, se limpió y depiló una zona de aproximadamente 5cm de longitud y se midió el grosor de la piel a nivel de la tabla del cuello mediante el uso de un cutímetro. La tuberculinización se realizó empleando derivado proteico purificado bovino (PPDb), la misma que fue aplicada por vía intradérmica en la zona previamente preparada. Luego de 72 horas de la aplicación de PPDb, se realizó la lectura del grosor de la piel en el sitio de la inoculación previa, para evaluar la intradermorreacción. Tomando en cuenta la siguiente tabla de medidas:

**Tabla 2.** Clasificación de la Reacción de acuerdo al engrosamiento del pliegue cutáneo

|                   |   |
|-------------------|---|
| Reacción Negativa | Aquellos animales con induraciones menores o iguales a 2mm. |
| Reacción Positiva | Aquellos animales con induraciones superiores a 4 mm        |

(OIE, 2016)

Los animales con reacciones positivas fueron seleccionados para tomar muestras de sangre que posteriormente se analizaron mediante ELISA  $\gamma$ -IFN.

### **3.6 Toma de muestras sanguíneas y diagnóstico de tuberculosis bovina mediante $\gamma$ -IFN**

Las muestras de sangre para confirmar el diagnóstico de tuberculosis se tomaron por punción de la arteria o vena sacra media ubicada en la región coccígea, dichas muestras fueron recogidas en tubos con lithium heparin en cantidad aproximada de 5ml. Las muestras fueron llevadas a una temperatura de 16 a 22°C no más de 16 horas posteriores a la recolección a los laboratorios del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, en donde fueron procesadas.

El procesamiento de las muestras y el diagnóstico mediante la técnica de  $\gamma$ -IFN, se realizó de acuerdo a lo sugerido por la casa comercial IDvet (Test Elisa ID Screen ® Ruminant IFNg) (Anexos 8.1)

### **3.7 Sacrificio e inspección post mortem de animales con tuberculosis bovina diagnosticados mediante $\gamma$ -IFN**

Se considero que los animales positivos al diagnóstico en laboratorio mediante  $\gamma$ -IFN, sean destinados al sacrificio para la posterior inspección de órganos como pulmones, hígado, bazo, riñón y la glándula mamaria, mediante palpación cuidadosa y revisión externa e interna en busca de pequeños tubérculos (lesiones granulomatosas) para posteriormente confirmar el diagnóstico por cultivo, microscopía y PCR.

### **3.8 Análisis Estadístico**

En hojas de cálculo Excel 2016, se ordenó la información obtenida a partir de los registros de campo considerando las siguientes variables: procedencia, tipo de explotación tamaño de la explotación, raza, sexo y edad; para esta última variable se hizo una clasificación de los animales en grupos etarios, de la siguiente manera jóvenes (entre seis meses y a dos años), adultos (2-6 años), viejos (más de 6 años).

Se planteó que los resultados positivos confirmados en forma definitiva serían empleados para realizar análisis de asociación con las variables previamente registradas, mediante pruebas de bondad como chi cuadrado o test de Fisher, tomando en cuenta valores de p menores a 0,05 como estadísticamente significativos; se empleó el programa estadístico R 3.6.2

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características de los animales muestreados

Las características de los animales muestreados se detallan en la tabla siguiente:

**Tabla 3.** Características de los animales muestreados

| Variables    | Catamayo  |             | Espíndola |             | Gonzanamá |             | Total     |            |
|--------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|------------|
|              | N.º       | %           | N.º       | %           | N.º       | %           | N.º       | %          |
| <b>Edad</b>  |           |             |           |             |           |             |           |            |
| Adulto       | 7         | 15,2        | 2         | 4,3         | 7         | 15,2        | 16        | 34,7       |
| Joven        | 11        | 23,9        | 7         | 15,2        | 11        | 23,9        | 29        | 63         |
| Viejo        | 1         | 2,1         | 0         | 0           | 0         | 0           | 1         | 2,1        |
| <b>Raza</b>  |           |             |           |             |           |             |           |            |
| Brahman      | 0         | 0           | 1         | 2,2         | 1         | 2,2         | 2         | 4,3        |
| Brown Swiss  | 0         | 0           | 1         | 2,2         | 1         | 2,2         | 2         | 4,3        |
| Gyr          | 0         | 0           | 0         | 0           | 1         | 2,2         | 1         | 2,1        |
| Holstein     | 15        | 32,6        | 3         | 6,5         | 9         | 19,6        | 27        | 58,7       |
| Jersey       | 0         | 0           | 2         | 4,3         | 3         | 6,5         | 5         | 10,8       |
| Mestiza      | 4         | 8,7         | 2         | 4,3         | 3         | 6,5         | 9         | 19,5       |
| <b>Sexo</b>  |           |             |           |             |           |             |           |            |
| Hembra       | 12        | 26,0        | 5         | 10,9        | 14        | 30,4        | 31        | 67,3       |
| Macho        | 7         | 15,2        | 4         | 8,7         | 4         | 8,7         | 15        | 32,6       |
| <b>Total</b> | <b>19</b> | <b>41,3</b> | <b>9</b>  | <b>19,5</b> | <b>18</b> | <b>39,2</b> | <b>46</b> | <b>100</b> |



## 4.2 Identificación de reactores positivos a la tuberculinización

Se obtuvieron 2 animales con reacciones positivas a la intradermorreacción de un total de 46 bovinos muestreados, obteniendo así una frecuencia del 4% (Tabla 4). Siendo estos positivos clasificados de la siguiente manera:

**Tabla 4.** Resultados de la prueba cervical simple, clasificados de acuerdo a las variables tomadas

| Variables     | Negativos |           | Positivos |          | Total     |            |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|
|               | N         | %         | N         | %        | N         | %          |
| <b>Raza</b>   |           |           |           |          |           |            |
| Brahman       | 2         | 4         | 0         | 0        | 2         | 4          |
| Brown Swiss   | 2         | 4         | 0         | 0        | 2         | 4          |
| Gyr           | 1         | 2         | 0         | 0        | 1         | 2          |
| Holstein      | 25        | 54        | 2         | 4        | 27        | 59         |
| Jersey        | 5         | 11        | 0         | 0        | 5         | 11         |
| Mestiza       | 9         | 20        | 0         | 0        | 9         | 20         |
| <b>Edad</b>   |           |           |           |          |           |            |
| Adulto        | 14        | 30        | 2         | 4        | 16        | 35         |
| Joven         | 29        | 63        | 0         | 0        | 29        | 63         |
| Viejo         | 1         | 2         | 0         | 0        | 1         | 2          |
| <b>Sexo</b>   |           |           |           |          |           |            |
| Hembra        | 29        | 63        | 2         | 4        | 31        | 67         |
| Macho         | 15        | 33        | 0         | 0        | 15        | 33         |
| <b>Cantón</b> |           |           |           |          |           |            |
| Catamayo      | 19        | 41        | 0         | 0        | 19        | 41         |
| Espíndola     | 9         | 20        | 0         | 0        | 9         | 20         |
| Gonzanamá     | 16        | 35        | 2         | 4        | 18        | 39         |
| <b>Total</b>  | <b>44</b> | <b>96</b> | <b>2</b>  | <b>4</b> | <b>46</b> | <b>100</b> |

### **4.3 Confirmación de tuberculosis bovina mediante $\gamma$ -IFN**

Luego de identificar las reacciones intradérmicas positivas se tomó muestras sanguíneas de los 2 animales, para realizar la prueba de ELISA sándwich para la detección de interferón gamma ( $\gamma$ -IFN) bovino. Los resultados obtenidos en la prueba fueron negativos a TBB, en ambos animales. Para la interpretación y lectura de los resultados se utilizó los protocolos proporcionados por la guía de la prueba (Anexos 8.1)

### **4.4 Identificación de lesiones compatibles con tuberculosis bovina mediante el sacrificio e inspección de los animales diagnosticados con $\gamma$ -IFN.**

No se logró confirmar ningún animal con TBB mediante ELISA  $\gamma$ -IFN por lo que tampoco se realizó el sacrificio de los animales positivos a la tuberculinización. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación fueron comunicados a la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD), de forma oportuna para que se realice seguimiento de las fincas de acuerdo a los protocolos manejados por esa institución.

### **4.5 Análisis Estadístico**

Al no haber confirmado ningún caso positivo de tuberculosis bovina de forma definitiva, no fue posible realizar el análisis estadístico previamente contemplado; por lo que se expresan los resultados de la tuberculinización en forma de porcentajes solamente.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Identificación de reactores positivos a la tuberculización

La prueba de tuberculina es considerada la herramienta oficial para el diagnóstico en los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina, nos permite conocer si el animal fue infectado por el agente que origina la enfermedad (Cousins & Florisson, 2005)

Los resultados obtenidos en este estudio mediante la prueba de tuberculina cervical simple (SITT), fueron de 2/46 animales positivos, arrojando un 4% del total de la población muestreada. Resultados, que se relacionan con el estudio de Herrera Cifuentes (2011) hecho en la ciudad de Otavalo, mediante la aplicación de la prueba cervical comparativa en la cual obtuvo 5/66 bovinos positivos a la tuberculina aplicada; ambos estudios trabajan con metodologías parecidas tomando en cuenta los criterios internacionales para el diagnóstico y hatos que participan de manera voluntaria.

De igual manera Saltos Cabezas (2020), en el cantón El Empalme provincia del Guayas, por medio de la prueba ano-caudal en 370 animales reportó 335 negativos a tuberculosis (90,55 %), 15 (4,05 %) positivos y 20 (5,40 %) sospechosos; estos resultados se deben al mayor tamaño de muestra en la que trabaja el autor ya que el estudio busca determinar la prevalencia de TBB en el cantón.

Por otro lado, mediante el estudio realizado por Chávez et al. (2001), en el cual mediante el sacrificio y posterior inspección post mortem de los animales positivos a la prueba de tuberculina ano-caudal; confirmó la presencia de la enfermedad en un grupo de 23 animales; 21 son positivos a la tuberculización en ellos encuentran lesiones compatibles con tuberculosis. Confirmó el diagnóstico mediante histopatología de las lesiones, aisló *M. bovis* de 14 animales del grupo positivo a tuberculina. Por lo que el autor reconoce la importancia de las pruebas de campo como la tuberculización y que se debe aplicar pruebas serológicas para confirmar la presencia de la enfermedad.

### 5.2 Confirmación de tuberculosis bovina mediante $\gamma$ -IFN

En este estudio investigativo mediante la prueba de ELISA  $\gamma$ -IFN no se obtuvieron resultados positivos, en ninguno de los dos animales con reacciones positivas a la prueba cervical simple; De Ward (2005) menciona que la diferencia en los resultados puede ser ocasionada por la presencia de micobacterias ambientales (atípicas no patógenas) diferentes al *M. bovis*, pero con antígenos comunes entre ellos, lo que provocaría la inflamación en el lugar donde se realizó la tuberculización.

Según Garbaccio (2006), menciona que la técnica diagnóstica mediante  $\gamma$ -IFN, tiene el objetivo de establecer un diagnóstico confiable, económico y de fácil automatización.

En relación con lo mencionado por Soto Requena (2007), señala que una ventaja de la prueba de  $\gamma$ -IFN se basa en la estimulación de clones de linfocitos circulantes con tuberculina PPD bovina y aviar, pero que previamente se han sensibilizados con antígenos de *M. bovis* o *M. avium*, ante esta estimulación los linfocitos segregan  $\gamma$ -IFN como parte de los mecanismos de defensa celular adquirida. Los linfocitos de los bovinos que no están infectados por *M. bovis* al ser estimulados con PPD bovino no producen  $\gamma$ -IFN específico a esta micobacteria, en caso contrario los linfocitos de los animales infectados si secretan  $\gamma$ -IFN específico para *M. bovis*.

Por otro lado, la prueba de tuberculinización se complementa mediante la técnica de  $\gamma$ -IFN para aumentar la sensibilidad (Arcelles y otros, 2005). También no se debe descartar futuras investigaciones, ya que las mismas ayudaran a establecer el estado sanitario de la enfermedad y por ende proponer sistemas de control. Ya que de acuerdo al estudio realizado por Román Cárdenas (2016) en las ganaderías lecheras y en bovinos faenados del cantón Loja, obtuvo el 6,20 % de reactores positivos de una población de 357 muestras mediante el test intradérmico simple (ano-caudal); mientras a nivel del canal estudio 411 bovinos faenados, en el 17,31 % identifico el bacilo tuberculoso mediante baciloscopia con tinción de Zielh Neelsen.

## 6. CONCLUSIONES

- Mediante la prueba cervical simple de tuberculosis se obtuvieron 2 animales con induraciones superiores a 4mm en el cantón de Gonzanamá, lo que representa un 4 % de la población muestreada.
- Mediante la prueba de ELISA  $\gamma$ -IFN, no se confirmó el diagnóstico de tuberculosis en los animales con resultados positivos en la tuberculinización, lo que podría sugerir que dichas induraciones son atribuibles a micobacterias ambientales.
- No se realizó el sacrificio e inspección *post mortem* de los animales para identificar lesiones compatibles con tuberculosis bovina, debido a que no se confirmó la presencia de la enfermedad mediante los diagnósticos por interferón gamma

## 7. RECOMENDACIONES

Una vez concluido el trabajo de investigación se puede tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Manejar un mayor número de muestras, para tener más diversidad en los resultados. Tomando en cuenta que al depender de los ganaderos y su predisposición a colaborar en el estudio la información es limitada.
- Utilizar pruebas de diagnóstico combinadas (prueba de tuberculinización y ELISA  $\gamma$ -IFN.) permite obtener resultados más seguros y conocer nuevos datos sobre la presencia de la enfermedad en los hatos ganaderos.
- Considerar el lugar de aplicación de la tuberculina; ya que al ser aplicada en las tablas del cuello hay una mayor sensibilidad, menor contaminación y mayor facilidad para realizar la lectura del grosor del pliegue cutáneo

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo, M., & Núñez, A. (2016). Estudios industriales orientación estratégica para la toma de decisiones. Industria de ganadería de carne., Guayaquil: ESPA-E SPOL.
- Agrocalidad. (2017). Instructivo para los procesos de certificación y recertificación de predios libres de Brucelosis y Tuberculosis Bovina .
- Albarracín, Y., Poutou, R., & Carrascal, A. (2008). *Listeria* spp., y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra. *Revista MVZ Córdoba*, 1326-1332.
- Alcaís, A., Fieschi, C., Abel, L., & Casanova, J. L. (2005). Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *The Journal of experimental medicine*, 1617.
- Alejandra, R. R., Elvia, C. R., Armando, M. P., & José, A. B. (2002). *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kda. *Revista médica de la Universidad Veracruzana*, 39-43.
- Álvarez, N., Borrero, R., Reyes, F., Camacho, F., Mohd, N., Sarmiento, M. E., & Acosta, A. (2009). Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *Vaccinmonitor*, 18-25.
- Ameni, G., Desta, F., & Firdessa, R. (2010). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated from tuberculosis lesions of cattle in north eastern ethiopia. *Veterinary Record*, 138-141.
- Arcelles, M., Delgado, A., Alzamora, C., & Manchego, A. (2005). Prevalencia de tuberculosis bovina en el distrito de Vegueta, Huaura. *Revista de Investigaciones veterinarias del Perú*, 154-157.
- Arrieta Villegas, C., Peralvarez, T., Vidal, E., Puighibet, Z., Moll, X., Canturri, A., & otros. (2018). Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PloSone*, 13 (5).
- Babaahman, E. (2017). La tuberculosis animal. *Rev Vet Argentina*.
- Bechini Bernad, J. (2017). Estudio de la tuberculosis pulmonar mediante tomografía computarizada multidetector en un modelo experimental de minipig.
- Bergey's, M. T., & Wiley. (2018). *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Obtenido de Wiley Online Library.
- Biffa, D., Bogale, A., & Skjerve, E. (2010). Eficiencia diagnóstica del servicio de inspección de carne de matadero en Etiopía para detectar canales infectadas con

- Mycobacterium bovis*: Implicaciones para la salud pública. *BMC Public Health*, 1-12.
- Boland, F., Kelly, G., Good, M., & More, S. (2010). Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 153-161.
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 91-97.
- Brooks, G. F., Jawetz, E., Blengio Pinto, J. R., & cols. (2011). Jawetz, melnick y adelberg. *Microbiología médica* (n.º 616.9041 616.9041 J3 JAW4E4).
- Camacho, C. (2008). *Sanidad animal y enfermedades*. ESPOCH.
- Cataldi, A., & Romano, M. (2007). Tuberculosis caused by other members of the *M.tuberculosis* complex. *Tuberculosis*, 283-314.
- Catamayo, G. M. (2019). Cantón Catamayo. Obtenido de <https://espindola.gob.ec/>.
- Chávez, C. E., Mancilla, R., Díaz, C. A., González, R., & Otero, F. D. (2001). Determination of anti-ppd antibodies in dairy herds with different prevalences of bovine tuberculosis in Mexico. *Veterinaria México*, 207-211.
- Clegg, T. A., Doyle, M., Ryan, E., More, S. J., & Gormley, E. (2019). Characteristics of *Mycobacterium bovis* infected herds tested with the interferon-gamma assay. *Preventive veterinary medicine*, 168, 52–59.
- Cousins, D., & Florisson, N. (2005). A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 1039-1059.
- De Kantor, I. N., & Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmes in latin american and caribbean countries. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), 111-118.
- De Kantor, I., Paolicchi, F., Bernardelli, A., Torres, P., Canal, A., Lobo, J., & otros. (2008). La tuberculosis bovina en América latina. Situación actual y recomendaciones. En congreso latino americano de zoonosis, OIE, Buenos aires, Argentina.
- De la Rua Domenech, R., Goodchild, A., Vordermeier, H., Hewinson, R., Christiansen, K., & Clifton-Hadley, R. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in veterinary science*, 190-210.
- De Ward, J. H. (2005). Tuberculosis bovina. Manual de ganadería doble proposito. En:



- Gonzalez Stagnaro, C. y Soto Belloso, E. (Eds). Ediciones Astro Data, SA, Maracaibo, Venezuela, 364-369.
- Dean, A. S., Forcella, S., Olea-Popelka, F., Idrissi, A. E., Glaziou, P., & Benyahia, A. (2018). A roadmap for zoonotic tuberculosis: a one health approach to ending tuberculosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 137.
- Diguimbaye Djaibe, C., Hilty, M., Ngandolo, R., Mahamat, H. H., Pfyffer, G. E., Baggi, F., & Schelling, E. (2006). Mycobacterium bovis isolates from tuberculous lesions in chadian zebu carcasses. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 769.
- Dinadayala, P., Sambou, T., Daffe, M., & Lemassu, A. (2008). Comparative structural analyses of the  $\alpha$ -glucan and glycogen from Mycobacterium bovis. *Glycobiology*, 502-508.
- Echeverria, G., Ron, L., Leon, A., Espinoza, W., Benítez, W., & Proano, F. (2014). Prevalence of bovine tuberculosis in slaughtered cattle identified by nested-pcr in abattoirs from two dairy areas of Ecuador. *Tropical animal health and production*, 1015-1022.
- Espíndola, G. M. (2017). Cantón Espíndola. Obtenido de <https://espindola.gob.ec/>.
- Estrada, C., Otero, F., Díaz, C., Villegas, N., Gonzalez, R., & Salazar, D. (2004). Concordance of pcr and all routines for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinaria México*, 225-236.
- Ettinger, S. J., & Felman, E. C. (2007). *Tratado de medicina interna veterinaria*.
- Fine, A. E., Bolin, C. A., Gardiner, J. C., & Kaneene, J. B. (2011). A study of the persistence of Mycobacterium bovis in the environment under natural weather conditions in michigan, USA. *Veterinary medicine international*.
- Flores, F., Delgado, A., González, A., & Rivera, H. (2005). Determinación de la presencia de tuberculosis bovina en la provincia de Canta, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 65-70.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffre, A., Sabio Garcia, J., Morbidoni, H. R., Santangelo, M. D., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*, 3-66.
- Garbaccio, M. V. (2006). Diagnóstico in vivo e in vitro de la tuberculosis bovina. *Temas de zoonosis III (Asociacion Argentina de Zoonosis)*, 222-226.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., & Others. (2003). The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 7877-7882.

- Garza Velasco, R., Avila de Jesús, J., & Perea Mejía, L. M. (2017). Tuberculosis pulmonar: la epidemia mundial continúa y la enseñanza de este tema resulta crucial y compleja. *Educación Química*, 38-43.
- Gillespie, S., & Hawkey, P. M. (2006). *Principles and practice of clinical bacteriology*. John Wiley & Sons.
- Gonzanamá, G. M. (2019). Cantón Gonzanamá. Obtenido de <https://gonzanama.gob.ec/>.
- Gradmann, C. (2006). Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes and infection*, 294-301.
- Herrera Cifuentes, E. W. (2011). Diagnóstico de tuberculosis bovina, mediante la prueba intradérmica cervical comparada en cinco hatos lecheros en la ciudad de Otavalo, provincia de Imbabura. Quito: Universidad de las Américas.
- Kantor, I., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Da Silva Telles, M., & Osorio Ribeiro, M. (2008). Infección por *Mycobacterium bovis* en humanos en diez países de América latina. *Rev Panam Salud Publica*, 1970-2007.
- Kaur, D., Guerin, M. E., Skovierova, H., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2009). Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in applied microbiology*, 23-78.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color*. Ed. médica panamericana. .
- Leghari, A., Kamboh, A. A., Lakho, S. A., Khand, F. M., Malhi, K. K., B., C., & Shah, J. M. (2020). Prevalence and risk factors associated with bovine tuberculosis in cattle in Hyderabad and Tando Allahyar districts, Sindh, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 207.
- Lomillos Perez, J. M., Fernández, J., Alonso De La Varga, M. E., & cols. (2018). Abordaje multidisciplinar de la infección de tuberculosis en una explotación de ganado de Lidia. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 15-25.
- Lopez, L. M., Marín Otero, F. D., Maza, J. V., Solís, H. E., & Pabello, J. G. (2006). Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev Latinoam Microbiol*, 173-178.
- Mancheno Valencia, M. A., Arenas Guzmán, R., Carrillo Casas, E. M., Fernández Martínez, R., Toussaint Caire, S., Hernández Castro, R., & Hajar Serviansky, T. (2016). La infección por micobacterias no tuberculosas, una visión desde la perspectiva dermatológica. *Medicina Cutánea Ibero Latino Americana*, 6-13.
- Mantilla, G., Ortiz, M., Acosta, A., Acosta, G., & Sousa, Z. (2009). Diagnóstico de

- tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o histopatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina. *MV Rev. de Cien. Vet.*, 7-9.
- Medeiros, L. d., Marassi, C. D., Figueiredo, E. E., & Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 531-541.
- Milian Suazo, F., Harris, B., Arriaga Díaz, C., Thomsen, B., Stuber, T., Gonzalez Suárez, D., & Estrada Chávez, C. (2010). Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 403-415.
- Miller, C. H., Maher, S. G., & Young, H. A. (2009). Clinical use of interferon- $\gamma$ . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1182, 69.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2007). *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press.
- Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C., & Engelhardt, H. (2010). Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends in microbiology*, 109-116.
- OIE. (2008). *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)*. Organización Mundial de Sanidad Animal.
- OIE. (2016). *Código sanitario para los animales terrestres. Armonización de los programas nacionales de vigilancia y seguimiento de la resistencia a los agentes antimicrobianos*.
- Ojeda Gutiérrez, F. V. (2017). *Prevalencia de tuberculosis bovina en hatos lecheros del distrito de Taraco*.
- OMS. (2018). *Preparación para la reunión de alto nivel de la asamblea general sobre el fin de la tuberculosis: informe del director general*. Organización Mundial de la Salud.
- Orloski, K., Robbe Austerman, S., Stuber, T., Hench, B., & Schoenbaum, M. (2018). Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* isolated from livestock in the united states, 1989–2018. *Frontiers in veterinary science*, 5, 253.
- Palmieri, O. J. (2001). *Enfermedades infecciosas*. McGraw-Hill Interamericana.
- Palomino, J. C., Leao, S. C., & Ritacco, V. (2007). *Tuberculosis 2007; from basic science to patient care*.
- Pinera, S., Muñoz, J., & Martínez, L. (2014). *Identificación de especies del complejo mycobacterium tuberculosis mediante patrones de restricción*. Universidad

Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, México.

- Pitarque, S., Larrouy Maumus, G., Payre, B., Jackson, M., Puzo, G., & Nigou, J. (2008). The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis*, 560-565.
- Proano Perez, F., Benitez Ortiz, W., Celi Erazo, M., Ron Garrido, L., Benitez Capistros, R., Portaels, F., & Linden, A. (2009). Comparative intradermal tuberculin test in dairy cattle in the north of ecuador and risk factors associated with bovine tuberculosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(6), 1103-1109.
- Proaño, F., Benítez, W., Portaels, F., Rigouts, L., & Linden, A. (2011). Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 279-286.
- Quintero Rada, K., Montoya Posada, J. P., & Bonilla Aldana, D. K. (2019). Tuberculosis bovina por *Mycobacterium bovis* en fincas ganaderas de Colombia. *Revista Panamericana de Enfermedades Infecciosas*, 29-30.
- Ramos Morales, N. E. (2017). Determinación de prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de hatos ganaderos en la parte baja de la provincia del Oro. (B.S. thesis) Machala: Universidad Tecnica de Machala.
- Razaghi, A., Owens, L., & Heimann, K. (2016). Review of the recombinant human interferon gamma as an immu-notherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of biotechnology*, 240, 48–60.
- Rivera, S., & Giménez, J. F. (2010). La tuberculosis bovina en venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el disgnóstico. . REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 1-27.
- Rodríguez, G. (2006). Mycobacterias. *Temas de bacteriología y virología médica*, 381-399.
- Román Cárdenas, F., & Chávez Valdivieso, R. (2016). Prospección de Tuberculosis en ganaderías lecheras y en bovinos faenados del Cantón Loja. Engormix.
- Salazar, D. G., Otero, F. D., Meza, L. J., Flores M., A. S., García, R. E., & Arriaga, C. D. (2007). Deteccion y descripción anatomopatológica de tuberculosis en una colonia de ankole-watusi. *Tecnica Pecuaria en México*, 101-109.
- Salazar, D., Cuichan, M., Ballesteros, C., Márquez, J., & Orbe, D. (2017). Encuesta de superficie y produccion agropecuaria continua. Obtenido de Recuperado de [http://www.aebe.com.ec/wpcontent/uploads/2018/06/ESTUDIO AGROPECUARIO INEC 2017. pdf](http://www.aebe.com.ec/wpcontent/uploads/2018/06/ESTUDIO_AGROPECUARIO_INEC_2017.pdf)

- Saltos Cabezas, E. A. (2020). Incidencia de la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) mediante la prueba intradérmica caudal (tuberculina) en el cantón el Empalme . Quevedo: UTEQ.
- Serrano, M., Sevilla, I. A., Fuertes, M., Geijo, M., Risalde, M., Ruiz Fons, J. F., & others. (2018). Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: implications for diagnosis. *Veterinary research*, 1-10.
- Silvia, G., Pérez, F., & Marín, D. (2019). Tuberculosis en niños y adolescentes en Ecuador: Análisis de la notificación, las características de la enfermedad y el resultado del tratamiento. *Revista Panamericana de Salud Pública* , 43.
- Soto Requena, L. R. (2007). Test de gamma interferón como prueba confirmatoria para el diagnóstico de la tuberculosis bovina .
- Spickler, A. R. (2009). Tuberculosis bovina.
- Stanchi, N. O., Martino, P. E., Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., Leardini, N., & cols. (2007). *Microbiología veterinaria*. Buenos Aires: Inter-Médica .
- Strain, S. A., McNair, J., McDowell, S. W., & Branch, B. (2011). Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. *gri-Food and Biosciences Institute*.
- Thoen, C., LoBue, P., & De Kantor, I. (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), 339-345.
- Torres, P., Kistermann, J., Bernasconi, G., Lacunza, J., Hasenbalg, A., Navarro, R., & Canal, A. M. (2012). *Manual ilustrado en tuberculosis*. SENASA.
- Wolfe, L. M., Mahaffey, S. B., Kruh, N. A., & Dobos, K. M. (2010). Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of proteome research*, 5816-5826.

## 9. ANEXOS

### Protocolo gamma interferón ( $\gamma$ -IFN)

El procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo de la casa comercial IDvetInnovative Diagnostics. Para determinar la presencia o ausencia de la enfermedad, en los bovinos sospechosos previamente tuberculinizados.

**Generalidades:** La prueba de  $\gamma$ -IFN consta de ELISA Sandwich, la cual detecta el gamma interferón nativo en plasma bovino, caprino y ovino o sobrenadante de cultivo. Se basa en la utilización de dos anticuerpos monoclonales dirigidos para detectar el  $\gamma$ -IFN de rumiante, y asimismo de un control/estándar liofilizado ( $\gamma$ -IFN nativo de rumiante).

Los resultados son expresados respetando un control positivo de referencia incluido en el kit, liofilizado y estandarizado. Esta expresión relativa de la calidad medida de  $\gamma$ -IFN garantiza la estandarización de resultados.

**Descripción y principio:** Los pocillos son sensibilizados con anticuerpos monoclonales (AcM) anti-IFN-g. Las muestras a analizar y los controles son añadidos a los pocillos. Si el  $\gamma$ -IFN está presente, formara un complejo AcM-antígeno. Después del lavado para la eliminación del conjugado en exceso, se añade la solución de revelación (TMB).

La coloración que resulta está ligada a la cantidad de IFN-g específicos presentes en las muestras a analizar.

- En presencia de IFN-g en las muestras, aparece una coloración azul que se convierte en amarilla luego de añadir la solución de parada.
- En ausencia de IFN-g en las muestras, no aparece ninguna coloración.

La lectura es realizada a una longitud de onda de 450 nm.

**Preparación de la muestra:** Se prepara la placa de 96 pocillos conteniendo las muestras y los controles, seguidamente se transfiere a la micro placa ELISA usando una pipeta multicanal; evitando de esta manera una diferencia en los tiempos de incubación entre cada muestra.

**Preparación de la solución de lavado:** La solución de lavado concentrada es equilibrada (20X a temperatura ambiente  $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ), agitando correctamente para la disolución de los cristales. La preparación de la solución de lavado (1X) se realizó mediante la dilución de 1:20 solución de lavado (20X) en agua destilada.

**Preparación de los reactivos:** Antes de utilizar los reactivos deben estar a temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) y se homogenizan por vortex.

El control positivo se reconstituyo con el solvente de reconstitución del kit. Se dejan pasar 5 minutos aproximadamente y se mezcla hasta obtener la disolución completa.

**Activación celular específica:** Las muestras se inoculan paralelamente, usando la

muestra que está en contacto con el antígeno específico (PPD bovis), usando la muestra puesta en contacto con un antígeno de control (PPD avium).

**Procedimiento:**

- Se distribuyo 25 l del diluyente 1 en cada pocillo, 25ul del control negativo a los pocillos A1 y B1, 25ul del control positivo a los pocillos C1 y D1 y 25ul de cada muestra al resto de los pocillos.
- Se agita la placa durante 2 min (1 min) a 21°C
- Incubar durante 1 hora a 37°C
- Vaciar los pocillos: lavarlos a cada uno, seis veces con 300ul de la solución de lavado 1X. Sin que se resequen.
- Preparar el conjugado 1X diluyendo el conjugado 10X a 1:10 con el diluyente 1.
- Añadir 100ul del conjugado 1X a cada pocillo.
- Incubar durante 1 hora a 37°C
- Vaciar los pocillos, para nuevamente lavarlos a cada uno, seis veces con 300ul de la solución de lavado, evitando que se resequen.
- Añadir 100ul de la solución de revelación a cada pocillo
- Incubar durante 15 min a 21°C en la oscuridad
- Añadir 100ul de la solución de parada a cada pocillo para detener la reacción
- Se leyó e interpretó la muestra

**Validación:** El test es válido si:

- La densidad óptica media del control positivo (DOCP) es superior a 0.500  
DOCP >0.500
- El cociente entre la media del control positivo (DOCN) es superior a 3.  
DOCP / DOCN >3

**Interpretación**

Para cada muestra, calcular el S/P, expresando el nivel de interferón producido en porcentaje del Control Positivo:

$$\frac{S}{P} = \frac{(DO_{muestraactivada(ex. P P Dbovis)} - DO_{muestracontrol(ex. P P Davium)})}{(DOCP - DOCN)} \times 100$$

**Protocolo 2**

Las muestras con un valor de S/P %

- Inferior a 35% son consideradas negativas (no hay producción del IFN-g inducida por el antígeno analizado)
- Superior o igual a 35% son consideradas positivas (la producción del IFN-g es inducida por el antígeno analizado)

| Resultado    | Producción INF-g | Estatus  |
|--------------|------------------|----------|
| S/P% < 35%   | NO               | Negativo |
| S/P% % ≥ 35% | SI               | Positivo |

## Materiales



**Figura 6.** Dosificador de Tuberculina



**Figura 7.** Cutímetro para medir el grosor de la piel



**Figura 8.** Depiladora





**Figura 9.** Tubos con lithium heparin para las muestras de sangre



**Figura 10.** Holder y agujas de toma múltiple

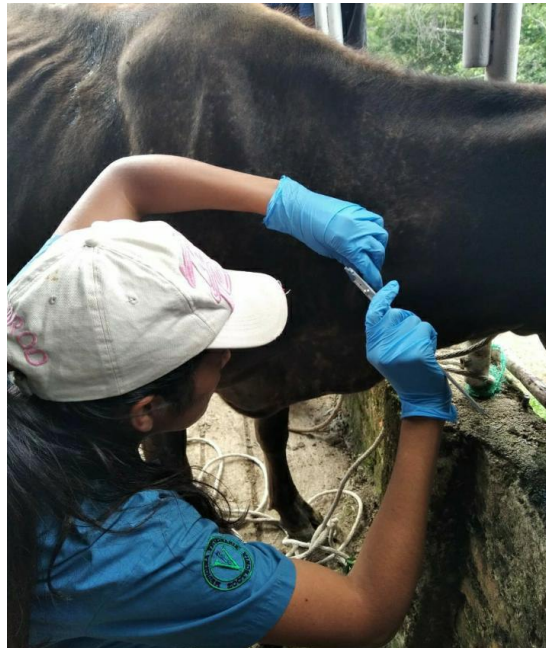


**Figura 11.** Derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* cepa AN-5, concentración 2 500 IU/0.1ml Intradérmico



**Figura 12.** Caja Culler para el transporte de la tuberculina

## Tuberculinización cervical simple



**Figura 13.** Primero medición del pliegue cutáneo en la tabla del cuello



**Figura 14.** Aplicación de Tuberculina



**Figura 15.** Animal positivo a Tuberculina



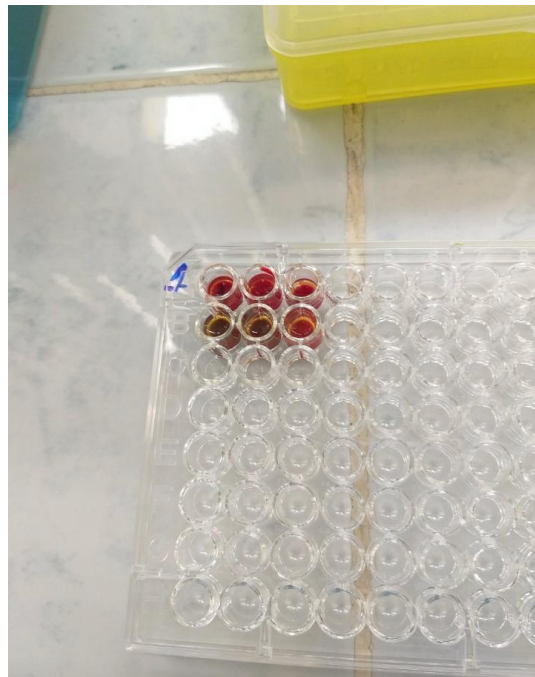
**Figura 16.** Animal negativo a la Tuberculina



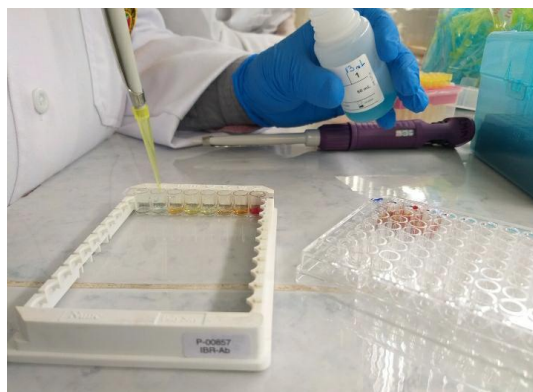
## ELISA $\gamma$ -IFN



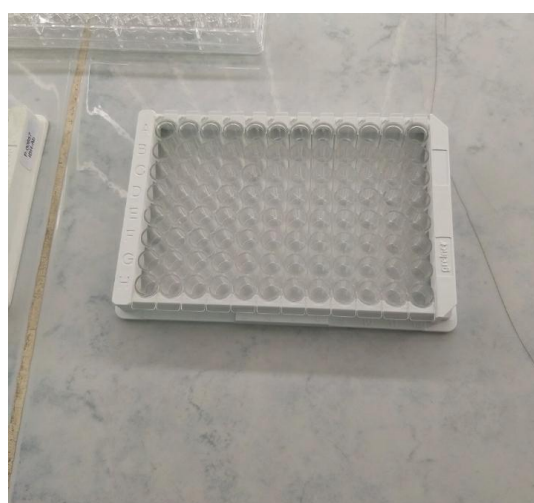
**Figura 17.** Toma de muestras de Sangre



**Figura 18.** Distribución de las muestras



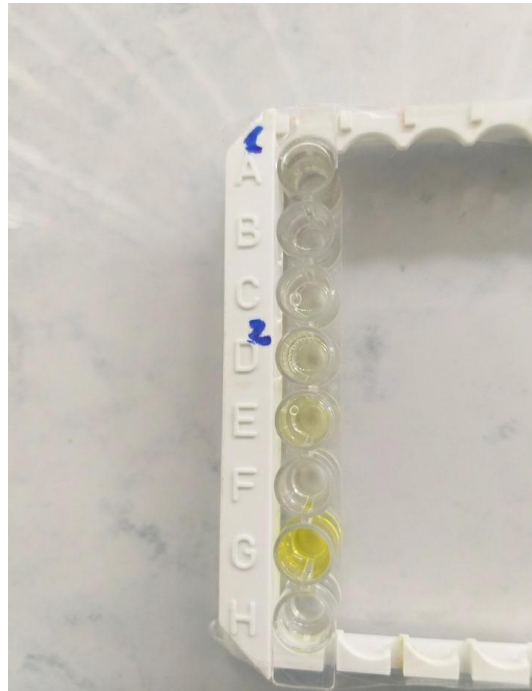
**Figura 19.** Obtención del plasma



**Figura 20.** Kits ELISA (placa)



**Figura 21.** Kits ELISA (reactivos)




**Figura 22.** Resultados de la prueba de ELISA  $\gamma$ -IFN



**Figura 23.** Lectura ELISA  $\gamma$ -IFN

| <b>Results</b> |           |              |                |          |
|----------------|-----------|--------------|----------------|----------|
|                |           | 1            |                |          |
| Madona         | A         | 0,238        | PPDb           | 1,508916 |
|                | B         | 0,227        | PPDa           | 23,73114 |
|                | C         | 0,054        |                |          |
| Diana          | D         | 1,007        | PPDb           | 15,08916 |
|                | E         | 0,897        | PPDa           | 114,1289 |
|                | F         | 0,065        |                |          |
|                | G         | 0,788        |                |          |
|                | H         | 0,059        |                |          |
|                | <b>CP</b> | <b>0,78</b>  | <b>&gt;0,5</b> |          |
|                | <b>CN</b> | <b>13,36</b> | <b>&gt;3</b>   |          |

**Figura 24.** Resultados de la lectura de ELISA  $\gamma$ -IFN

|  <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> | <b>FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES</b><br><b>CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA</b>                |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|---|--|-------------------|----------------------------|------|------------------|------------------|------------|-----------|-------------------|
|   | <b>TRABAJO DE TESIS</b><br>"Uso de técnicas inmunológicas para diagnóstico y control de tuberculosis bovina en la provincia de Loja" |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
| Fecha de incubación:  |  | Fecha de lectura: | Tipo de Explotación: Mixta |      |                  |                  |            |           |                   |
| Nombre de la Finca:   |  | Propietario:      | Cordenadas:                |      |                  |                  |            |           |                   |
| Tamaño de la explotación:   |  | N° de animales:   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
| Cantón  |  | Parroquia         |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
| Codigo  | Identificación del animal  | Sexo              | Edad                       | Raza | Primera medición | Segunda medición | Diferencia | Resultado | Muestra Sanguinea |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |
|   |  |                   |                            |      |                  |                  |            |           |                   |

**Figura 25.** Registro