



---

---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS**  
**NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**

**“ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE  
TUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERIAS  
BOVINAS DEL CANTON LOJA”**

Tesis de grado previa a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista.

**AUTOR:**

*Junior Eduardo Roa Armijos*

**DIRECTOR:**

*Dr. Dubal Antonio Jumbo Jimbo, Mg. Sc*

**LOJA – ECUADOR**

**2015**

## CERTIFICACIÓN

**Dr. DUBAL ANTONIO JUMBO JIMBO Mg. Sc.**  
**DIRECTOR DE TESIS**

### C E R T I F I C A:

Que se ha **CONCLUIDO DENTRO DEL CRONOGRAMA APROBADO** el Trabajo de investigación en la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia titulado "ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS BOVINAS DEL CANTÓN LOJA" del señor egresado JUNIOR EDUARDO ROA ARMIJOS.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Loja, 15 de junio del 2015

Atentamente,



**Dr. Dubal Antonio Jumbo Jimbo Mg Sc.**  
**DIRECTOR DE TESIS**

**“ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS BOVINAS DEL CANTÓN LOJA”.**

Tesis presentada al Tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**APROBADA:**

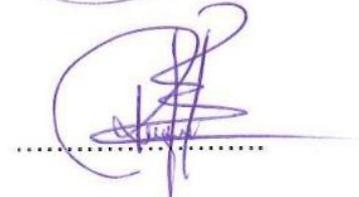
Dr. Germán Barragán Fierro Mg, Sc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Dr. Héctor Castillo Castillo Mg, Sc.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Dra. Rocío Herrera Herrera Mg, Sc  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

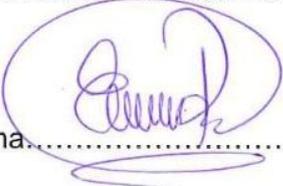


## AUTORÍA

Yo, Junior Eduardo Roa Armijos, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

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

Autor: Junior Eduardo Roa Armijos

Firma.....  


Cedula: 1900614460

Fecha: Loja, 17 de Julio de 2015

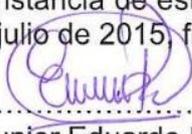
## **CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Yo, Junior Eduardo Roa Armijos, declaro ser el autor, de la tesis titulada **“ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS BOVINAS DEL CANTÓN LOJA”** como requisito para optar el grado de: Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Digital Institucional 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 de Loja, a los 17 días del mes de julio de 2015, firma el autor.

Firma:.....

Autor: Junior Eduardo Roa Armijos

Cedula: 1900614460

Dirección: Loja - Ecuador

Correo Electrónico: juneduroa@hotmail.com

Teléfono: 0993881511

### **DATOS COMPLEMENTARIOS**

Director de Tesis: Dr. Dubal Antonio Jumbo Jimbo Mg, Sc.

**Tribunal de Grado:** Dr. Germán Barragán Fierro, Mg. Sc.

Dr. Héctor Castillo Castillo, Mg. Sc.

Dra. Rocío Herrera Herrera, Mg. Sc.

## AGRADECIMIENTO

Al finalizar el presente trabajo, agradezco a Dios por acompañarme siempre y por haberme concedido fortaleza y sabiduría para seguir adelante.

A mis queridos Padres, por los valores que me han inculcado, y por haberme brindado su apoyo incondicional y una excelente educación en el transcurso de mi vida.

El agradecimiento sincero y profundo a la Universidad Nacional de Loja, a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en ella a sus distinguidos docentes quienes supieron guiarme con sabiduría y paciencia para formarme como un profesional y un hombre de bien, en especial al Dr. Dubal Jumbo Director de mi Tesis, y Coordinador de la Carrera.

Al Centro de Biotecnología, de la UNL, en especial al Ph.D Rómulo Chávez por permitirme contribuir y formar parte de su gran proyecto investigativo, a sus técnicos Vanessa Herrera y Loidy Zamora, quienes con sus valiosos conocimientos me orientaron para la realización de este trabajo investigativo, mi gratitud sincera.

A mis amigos y compañeros de aula, por su cariño y confianza hacia mi persona y por haber sido mis acompañantes en el sueño de ser profesional.

*Junior Eduardo*

## DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente trabajo con infinito cariño y afecto a los seres más importantes de mi vida, mis queridos padres María Soledad y Victor Manuel, seres que con abnegación, amor y esfuerzo han dedicado su vida a labrar mi futuro. A mi querida tía Elena María quien supo brindarme su cariño y sus consejos, que me han permitido crecer como persona, a mis queridos hermanos mi gratitud infinita por brindarme siempre su cariño, apoyo y comprensión durante toda mi vida

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

*Junior Eduardo*

## ÍNDICE GENERAL

<b>Contenidos</b>	<b>Pág.</b>
PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
APROBACIÓN.....	iii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
TÍTULO.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Definición.....	3
2.2 Antecedentes.....	3
2.3 Etiología.....	5
2.4. El género Mycobacterium.....	6
2.5 Mycobacterium Tuberculoso Complex.....	6
2.6 Mycobacterium Bovis.....	7
2.6.1 Taxonomía.....	8
2.6.2 Hospedador de Mycobacterium bovis.....	8
2.6.3 Morfología, Estructura y Composición.....	9
2.7 Epidemiología.....	10

2.7.1 Tuberculosis Bovina en Seres Humanos a nivel mundial...	10
2.7.2 Para América Latina.....	11
2.7.3 En Ecuador.....	12
2.7.4 Tuberculosis en Ganado Bovino a nivel mundial.....	13
2.7.5 Para América Latina.....	14
2.7.6 En Ecuador.....	15
2.8 Factores de Susceptibilidad.....	17
2.8.1 Factores Internos.....	17
2.8.2 Factores Externos.....	18
2.8.3 Patogenia.....	19
2.8.4 Mecanismo de Infección del <i>Mycobacterium bovis</i> .....	20
2.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	22
2.10 Trabajos Relacionados.....	23
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 MATERIALES.....	24
3.1.1 De Campo.....	24
3.1.2 De Oficina.....	24
3.1.3 Equipos y Materiales de Laboratorio.....	24
3.1.4 Reactivos.....	25
3.2 MÉTODOS.....	25
3.2.1 Descripción del Área de Estudio.....	25
3.2.2 Delimitación del Área de Estudio.....	26
3.2.3 Tamaño y Selección de la Muestra.....	26
3.2.4 Distribución de la población en la diferentes Parroquias.....	28
3.2.5 Variables.....	36
3.3 Recopilación de información.....	37
3.3.1 Recolección de Muestras.....	37

3.3.2	Análisis de Laboratorio.....	37
3.3.2.1	Extracción de ADN.....	37
3.3.2.2	Técnica de PCR convencional.....	38
3.3.2.3	Electroforesis.....	40
3.4	Procesamiento de la Información.....	40
3.4.1	Tabulación de Resultados.....	40
3.4.2	Análisis e Interpretación de Resultados.....	40
3.4.3	Presentación de Resultados.....	41
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1	Prevalencia de acuerdo a las parroquias.....	42
4.2	Prevalencia de acuerdo a la raza.....	44
4.3	Prevalencia de acuerdo a la edad.....	46
4.4	Prevalencia de acuerdo a los casos positivos.....	47
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
5.1	Prevalencia de acuerdo a las parroquias.....	49
5.2	Prevalencia de acuerdo a la raza.....	49
5.3	Prevalencia de acuerdo a la edad.....	50
5.4	Prevalencia de acuerdo a los casos positivos.....	51
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADROS:</b>	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación científica del <i>Mycobacterium bovis</i>	8
<b>Cuadro 2.</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) en ganado Lechero	17
<b>Cuadro 3.</b> Secuencias Nucleotídicas de los Cebadores	39
<b>Cuadro 4</b> Reactivos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	39
<b>Cuadro 5</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a las parroquias	42
<b>Cuadro 6</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a la raza.	45
<b>Cuadro 7</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a la edad.	46
<b>Cuadro 8</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a los casos positivos.	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURAS:</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Tasa de Incidencia estimada de Tuberculosis 2011(OMS2011).	11
<b>Figura 2.</b> Tasa de incidencia de tuberculosis total y baciloscopía positiva por provincia del Ecuador	13
<b>Figura 3.</b> Mapa de distribución de la TB (OIE, 2011).	14
<b>Figura 4.</b> Estimación de la prevalencia de la tuberculosis bovina en Latino América.	14
<b>Figura 5.</b> a) Mapa de distribución de la enfermedad de la TBB (OIE, 2011) y b) Estudios llevados a cabo mediante prueba de tuberculina e inspecciones veterinarias	16
<b>Figura 6.</b> Ubicación geográfica del cantón Loja.	26
<b>Figura 7.</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a las parroquias	44
<b>Figura 8.</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a la raza	45
<b>Figura 9.</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a la edad	47
<b>Figura 10.</b> Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a los casos positivos	48

**“ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS  
BOVINA EN GANADERIAS BOVINAS DEL CANTON LOJA”**

## RESUMEN

La Tuberculosis Bovina (TBB) es una “zoonosis” que representa un riesgo para la Salud Pública y para la economía de los productores ganaderos es por ello que el propósito de este estudio fue la determinación de la prevalencia de Tuberculosis bovina (*Mycobacterium spp.*) en las ganaderías lecheras el cantón Loja. Para lo cual se realizaron extracciones de ADN a partir de muestras de leche de hembras bovinas provenientes de las parroquias del cantón Loja y cuyas edades oscilaban entre 3-12 años de edad. Se efectuaron 102 extracciones de ADN con el Kit Pure Link Genomic DNA miniKit, (Invitrogen) de la casa comercial Life Technologic. Posteriormente se realizó la Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR), para la cual se utilizaron tres cebadores: RD4intF 5'-ACACGCGGCGAAGTATAGC-3', RD4flankR 5'-AAGGCGAACAGATTCAGCAT-3', RD4falnkF 5'-CTCGTCGAAGGCCACTAAAG-3', y la enzima (*Platinum Taq Polymerase*, Invitrogen). Fueron empleados dos controles positivos: la cepa de *Mycobacterium bovis*, proveniente de la vacuna BCG y una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, proveniente de colonias de orina de humanos infectados. Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%, dando como resultado que el 43.13 % (44/102) de las muestras resultaron positivas a *Mycobacterium spp.* A través de estos resultados se demuestra que la prevalencia de tuberculosis bovina es elevada en el cantón Loja, lo que resulta alarmante, debido a que muchos de los subproductos de la leche van destinados al consumo humano sin la debida pasteurización.

**Palabras claves:** Zoonosis, *Mycobacterium spp*, RCP, ADN, RD4

## ABSTRACT

Bovine Tuberculosis (TBB) is a "zoonosis" that poses a risk to public health and the economy of livestock producers is why the purpose of this study was to determine the prevalence of bovine tuberculosis (*Mycobacterium* spp.) in dairy farms Canton Loja. For which DNA extractions were performed from bovine milk samples from females from the parishes of the canton Loja and aged between 3-12 years old. 102 DNA extractions were performed with the Pure Kit MINIKIT Link Genomic DNA (Invitrogen) of the commercial Life Tecnologic. Subsequently, the reaction was carried out in the polymerase chain (PCR), to which three primers were used: 5'-ACACGCGGCGAAGTATAGC RD4intF-3', 5'-AAGGCGAACAGATTCAGCAT RD4flankR-3', 5'RD4falnkF CTCGTCTGAAGGCCACTAAAG-3', and the enzyme (Platinum Taq Polymerase, Invitrogen). Two positive controls were used: the strain of *Mycobacterium bovis* BCG from and *Mycobacterium tuberculosis* strain, colonies from human infected urine. PCR products were visualized in agarose gels containing 1.5%, resulting that 43.13% (44/102) of samples were positive for *Mycobacterium* spp. Through these results it shows that the prevalence of bovine tuberculosis is high in the canton Loja, which is alarming, because many milk products are destined for human consumption without proper pasteurization.

**Key word:** Zoonosis, *Mycobacterium* spp, PCR, DNA, RD4.

# 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades más contagiosas que se conoce a nivel mundial y una importante zoonosis, por lo tanto la posibilidad de infección humana con *Mycobacterium bovis* no puede ser ignorada.

En la salud animal genera pérdidas económicas considerables en la producción de leche, carne y en la comercialización, ya que países libres de tuberculosis importan solamente ganado bovino de aquellos países cuya prevalencia de la enfermedad no representa riesgo sanitario.

En Sudamérica se estima que el número de bovinos con infección tuberculosa podrían superar los 4 millones de cabezas de ganado, del cual *Mycobacterium bovis* es causante del 90% de esta infección, además que provoca entre el 2 al 8% de infecciones en los humanos.

Se estima que en América Latina y el Caribe se producen unos 340.000 casos nuevos de tuberculosis por año, por lo tanto unos 7000 de ellos podían ser debido al *M. bovis* (Cotrina, 1987; Blood *et al.*, 1982).

En Ecuador, al igual que en países de América Latina, el deterioro de las condiciones socioeconómicas ha favorecido al incremento de esta enfermedad y los factores de riesgo están relacionados con la transmisión de ésta, provocando hasta la muerte. La tuberculosis bovina es un problema que afecta al productor y al consumidor, es por ello, que en la constante lucha por controlar y erradicar la enfermedad. El médico veterinario juega un papel fundamental en el diagnóstico de animales que presenten algún síntoma, así como el desarrollo de metodologías de diagnóstico que permitan detectar la enfermedad de manera más sensible

y rápida de tal manera que permita tomar medidas de control y manejo para dicha enfermedad.

Por lo indicado previamente y considerando la importancia socioeconómica de la producción lechera en la provincia Loja, especialmente de las parroquias del cantón Loja. Se han planteado realizar los siguientes objetivos:

- Determinar la Prevalencia de Tuberculosis bovina, mediante la aplicación de PCR convencional en las ganaderías bovinas del cantón Loja.
- Detectar tuberculosis en ganado bovino mediante la aplicación de PCR Convencional en muestras de leche.
- Calcular la prevalencia aparente de TBB en las ganaderías bovinas del cantón Loja.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. DEFINICIÓN**

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad crónica de los animales provocada por una bacteria llamada *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), que guarda estrecha relación con las bacterias causantes de las tuberculosis humana y aviar. Puede afectar a prácticamente todos los mamíferos, en los que provoca un deterioro del estado general de salud, muy a menudo tos y, a la larga, la muerte.

El nombre de “tuberculosis” proviene de los nódulos, llamados “tubérculos”, que se forman en los ganglios linfáticos del animal afectado (OIE, 2012). Los órganos bovinos más afectados son el tracto digestivo, las ubres y los pulmones (Blowey y Weaver, 2006).

### **2.2. ANTECEDENTES**

La tuberculosis fue descrita en el año 2000 a.c. y a través de su historia ha sido la causa de grandes sufrimientos entre la población humana y de grandes pérdidas económicas en la ganadería (Garbaccio *et al.*, 2012).

Robert Koch (1834-1910) mostró sus estudios sobre la tuberculosis y en 1882 anunció que había aislado el bacilo responsable de esta enfermedad. En 1905 le otorgaron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina.

Las reacciones de hipersensibilidad retardada fueron descritas por Koch en 1891. Roberto Koch, en 1890, expuso los efectos de la tuberculina aplicada por vía intradérmica en pacientes con tuberculosis. Tiempo después, hizo referencia de una reacción local en el sitio de aplicación, a lo que llamó “reacción a la puntura”.

Fue en 1908 cuando Charles Mantoux indujo esa reacción ensayando con diferentes diluciones de tuberculina. Pero en 1934 Florence Seibert

obtuvo una proteína purificada de la “old tuberculina” (antigua), la que se designó como PPD (derivado proteínico purificado) (Biet *et al.*, 2005). En 1951 fue denominada PPD-S y adoptada por la Organización Mundial de la Salud como tuberculina estándar, la cual se comercializó en Estados Unidos. En 1958 la OMS aprobó un nuevo derivado proteínico, el PPD RT-23, que se utiliza en el resto del mundo.

En 1903, Nicolas Arthus describió un fenómeno que consistía en induración y necrosis local después de la aplicación intradérmica repetida de una sustancia extraña, que se debe a la formación y depósito de inmuno complejos con activación del complemento.

La prueba cutánea Mantoux de la tuberculina se emplea para uso diagnóstico en pacientes infectados con micobacterias de tuberculosis. Además, en algunos países se recomienda la prueba de tuberculina en relación con la vacunación con BCG, bien para asegurar que sólo las personas con respuesta negativa a la tuberculina son vacunadas o bien como prueba pos-vacunación (Barquero 2009).

Durante el año 1955 se practicó en el Ecuador la prueba tuberculínica en 11258 bovinos de algunas provincias de las Sierra y se encontraron 460 (4,08%) reactores positivos y 434 (3,85%) sospechosos. En la provincia del Guayas se realizaron 28 534 tuberculinizaciones, de 1947 a 1958, resultando 509 (1,78%) con reacciones positivas.

En la actualidad una legislación nacional respecto al control de la tuberculosis bovina está en trámite. La tuberculización de los animales que proveen de leche a Guayaquil es obligatoria, con sacrificio de los animales positivos. Respecto a la infección tuberculosa en otras especies animales, los datos son escasos. En el matadero de Guayaquil se decomisaron 15 (0,04%) cerdos de un total de 36 500 sacrificados (García *et al.*, 1963).

### 2.3. ETIOLOGÍA

Según (Pedro N. Acha y Boris Szyfres 2001) los agentes etiológicos de la tuberculosis de los mamíferos son *Mycobacterium tuberculosis* (el principal causante de tuberculosis humana), *Mycobacterium bovis* (tuberculosis bovina) y *Mycobacterium africanum* (tuberculosis humana en África Tropical). Esta última especie tiene características intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. A estos agentes se debe agregar el *M. microti*, que causa la tuberculosis de los roedores, aunque no es de interés zoonótico.

El agente principal de la tuberculosis zoonótica es *M. bovis*; el del hombre y otros primates es *M. tuberculosis*, que es la especie tipo del género. Las micobacterias tuberculosas son bacilos alcohol-acidorresistentes, gram positivos, no esporógenos. Estas micobacterias son resistentes a muchos desinfectantes, a la desecación y a otros factores adversos del medio, debido a que su pared tiene un alto contenido de lípidos.

En la investigación epidemiológica de *M. tuberculosis* se ha empleado la fagotipificación, que mediante el sistema API-ZIM divide el género en siete biovaras (Casal y Linares, 1985; Humble *et al.*, 1977). La fagotipificación se difundió poco y prácticamente cayó en desuso; se ha reemplazado por la técnica de hibridación de ADN.

Tanto para *M. tuberculosis* como para *M. bovis* se ha encontrado útil el análisis de fragmentos de ADN obtenidos por la acción digestiva de una o varias endonucleasas de restricción. (Collins y De Lisle, 1985, Shoemaker *et al.*, 1986). Numerosos autores prefieren referirse a una sola especie (*M. tuberculosis*) y tipos humanos y bovino.

La distribución de *M. bovis* y *M. tuberculosis* es mundial. *M. africanum* prevalece en África, pero también se ha aislado en Alemania e Inglaterra. Las cepas de *M. africanum* relacionadas fenotípicamente con *M. tuberculosis* son nitrasa positivas y se encuentran en África occidental; las

que se asemejan a *M. bovis* son nitrasa negativas y se aíslan más al oriente de África (Grange y Yates, 1989).

## **2.4. EL GÉNERO MYCOBACTERIUM**

El género *Mycobacterium* comprende más de 120 especies reconocidas, la mayoría oportunistas y patógenas (Tortoli, 2006), responsables de enfermedades como tuberculosis, lepra y úlcera de Buruli, en diferentes hospederos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Durnez *et al.*, 2008).

Varias son las micobacterias que tienen fundamental importancia en la salud animal: *Mycobacterium bovis*, cuyo hospedero primario es el ganado bovino; *M. avium* (*M. avium subsp. avium*) causante de tuberculosis en aves y patógena de ciertos mamíferos; *M. johnei* (*M. avium subsp. paratuberculosis*), agente etiológico de la paratuberculosis (Kantor, 2007) y *M. caprae* responsable de la TB en cabras (Aranaz *et al.*, 2003).

*M. caprae*, *M. bovis* y *M. avium complex* (MAC) son patógenos importantes para humanos y animales debido a sus características zoonóticas, además que pueden ser transmitidas por el medio ambiente y la vida silvestre, representando en todo el mundo un importante problema de salud pública (Biet *et al.*, 2005; Aimé *et al.*, 2011).

## **2.5. Mycobacterium Tuberculosis Complex (MTC)**

Las bacterias que compone el MTC se encuentran dentro del género *Mycobacterium*, que es el único dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales* (Barrera, 2007; NCBI, 2011 a). Los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* están presentan un 99,9% de similitud genética en las secuencias del gen ARN 16S ribosomal. Los polimorfismos en genes estructurales, sugieren que el organismo se ha difundida a niveles mundial hace relativamente poco tiempo (en términos

evolutivos) (Sreevatsan *et al.*, 1997), pero difieren ampliamente en cuanto a su tropismo de anfitrión, fenotipos patogenicidad (Bosch *et al.*, 2002).

Todas las bacterias del MTC pueden causar TB en diferentes especies (Good y Duignan, 2011) Varios de los patógenos de este grupo predomina en los seres humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. Canetti*) o infecta roedores (*M. Microti*), mientras que otros tienen un amplio rango de hospedador (*M. bovis*, *M. caprae*) (Brosch *et al.*, 2002; Buchrieser *et al.*, 2005)

La cepa ancestral de *M. tuberculosis* se caracteriza por la formación de lesiones macroscópicas conocidos como tubérculos, causa infecciones crónica y debilitante, pero en ocasiones pueden ser agudas y de rápido desarrollo. Las infecciones tempranas suelen ser asintomáticas. Cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos de la zona torácica (Ashford *et al.*, 2006), Pulmones, intestinos, hígado, bazo y pírneo (OIE; 2004).

## **2.6. Mycobacterium bovis**

La TBB fue reconocida por primera vez en animales domésticos. *Mycobacterium bovis* es causante de TB en animales de sangre caliente (Murray *et al.*, 2007b), aunque su radio de acción es amplio incluye la mayoría de las especies de mamíferos (Schmitt *et al.*, 2002).

A nivel de genoma, *M. bovis* comparte el 99,95% de identidad con *M. tuberculosis* (Garnier *et al.*, 2003), esto se puede observar en diferentes características como crecimiento, composición química y potencial de virulencia. Las enfermedades causadas por las dos microbacterias se tratan de manera diferente ya que la pirazinamida es ineficiente por la resistencia de la mayoría de las cepas de *M. bovis* (Scorpio y Zhang, 1996).

Debido a que es normalmente un patógeno de ganado vacuno las infecciones en seres humanos son el resultado de la ingestión de leche o

productos lácteos no pasteurizados (Harris *et al.*, 2007), en este caso no suele infectar los pulmones si no que produce lesiones principalmente en la medula ósea de la cadera, rodillas, vertebras y ganglios linfáticos cervicales. Pero existen otras rutas de infección como la vía a erógena ganado-humano y humano-humano (Biet *et al.*, 2005).

*M. bovis* también fue el progenitor de la cepa de *M. bovis* bacilo de Calmette-Guerin vacuna, la vacuna más ampliamente más utilizada en humanos (BCG) (Marti *et al.*, 2007)

### 2.6.1. Taxonomía

**Cuadro 1.** Clasificación científica del *M. bovis*

Reino:	Bacteria
Filo:	<i>Actinobacteria</i>
Orden:	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia:	<i>Mycobacteriaceae</i>
Género:	<i>Mycobacterium</i>
Especie:	<b><i>M. bovis</i></b>

**Fuente:** (Wikipedia, 2014).

### 2.6.2. Hospedador de *M. bovis*

Aunque se considera que el ganado vacuno es el hospedador principal de *M. bovis*, se ha descrito esta especie en muchos animales doméstico y silvestres (OIE, 2004). Este agente infeccioso tiene una de las más

amplias gamas de hospedero de todos los patógenos conocidos y ha sido diagnosticado en todo el mundo (Good y Duignan, 2011)

La capacidad de infectar se puede atribuir a las diferentes vías de trasmisión (Kaneene y Pfeiffer, 2006). La susceptibilidad de diferentes especies al complejo *M. tuberculosis* varía en función de la vía de exposición, dosis y virulencia (Lobue *et al.*, 2010). Los seres humanos, primates no humanos y conejillos de indias son muy susceptibles a *M. bovis*. (Schmitt *et al.*, 2006).

O'Reilly y Daborn (1995) han citado que tienen reportes de la enfermedad en el ganado doméstico y silvestre, cabras, cerdos, oveja, caballos, gatos, perros, ciervos, bisontes búfalos, tejones, comadrejas, hurones liebre, jabalíes antílopes, camellos, llamas, alpacas, elefantes, primates no humanos.

Los carnívoros y carroñeros: soro, coyote, lobo, tigre, leopardo, guepardo, leopardo de las nieves, lince ibérico, gato montés, pueden adquirir TBB en condiciones naturales a través del consumo de cadáveres infectados (Kaneene *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2008 Thoen *et al.*, 2009). Además de jabalíes alces, coyotes, suricatos, rinocerontes negros (Michel *et al.*, 2009) entre otros.

### **2.6.3. Morfología, Estructura y Composición**

*M. bovis* es un bacilo aerobio intracelular obligado, pero se ha demostrado que sobreviven en el medio ambiente fuera del hospedero por largas periodos de tiempo bajo condiciones favorables (Fine *et al.*, 2013; Williams y Hoy, 1930). Generalmente se representan rectos, pero a veces se doblan en forma de club cuando se tiñen a menudo aparecen cuentas de aspecto granular (Volk *et al.*, 1996). No forman esporas y son inmóviles, su tamaño se encentran entre 0,6 - 1,0 x 1,0 -10 um (Olsen *et*

*al.*, 2010). Presentan forma un tanto pleomorfica y pueden desarrollar ramificaciones o filamentos (Madigan *et al.*, 2009).

Se agrupan en el rango supra genérico de los actinomicetos que excepcionalmente tienen un alto contenido de guanina-citosina y lípidos, probablemente, el más alto entre todas las bacterias. Géneros estrechamente relacionados con *Mycobacterium* y otros como *Corynebacterium*, *Gordona*, *Tsukammurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Dietzia*, tiene compuestos similares de la pared celular y la estructura, por lo tanto, muestran una cierta semejanza fenotípica (Barrera, 2007).

Las especies del género *Mycobacterium* se identifican en base a propiedades metabólicas y bioquímicas, estructura antigénica, sensibilidad antibióticos y patogenicidad a diferentes especies animales (Kantor, 2007). La capacidad ácido resistencia y presencia de ácidos micólicos, 60-90 átomos de carbono, es importante en los bacilos tuberculosos (Murray *et al.*, 2007)

Como todas las células procariontas, las micobacterias poseen un citoplasma, membrana celular y un espacio peri plasmático que lo separa de una gruesa y compleja pared celular (Sussman, 2002).

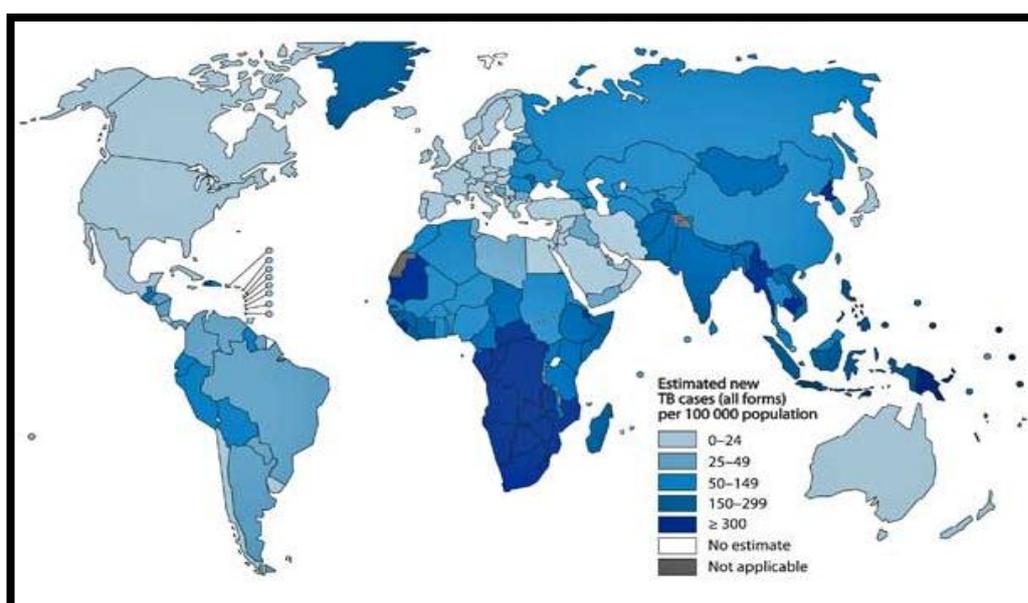
## **2.7. EPIDEMIOLOGÍA**

### **2.7.1 Tuberculosis Bovina en Seres Humanos a Nivel Mundial**

El segundo agente causal de TB, más común en personas, es *M. bovis* (Pérez *et al.*, 2008), sin embargo los datos son incompletos y dispersos respecto a su importancia en la TB humana (Abalos y Retamal, 2004), pero se sabe que la incidencia de TBB es heterogenia en todo el mundo (Etchechoury *et al.*, 2010).

A nivel mundial en el 2009, se estimó 9,4 millones de casos incidentes de tuberculosis, con una prevalencia de 14 millones. Además, se presentó

que alrededor 1,7 millones de personas murieron con TB, de los cuales 456000 eran VIH-positivas (OMS, 2010) Se estima que aproximadamente un 3.1% de los casos mundiales de TB en humanos, 2.1 % pulmonar y 9.4% extra pulmonar, son causados por *M. bovis* (Cosivi *et al.*, 1998; Grange y Yates, 1994). Otros indican que dependiendo de la zona, varia su incidencia, es así que en países desarrollados representa alrededor del 1% de todos los casos (Hlavsa *et al.*, 2008), ya sea por reactivación en personas mayores o inmigrantes de países donde la TBB no ha sido erradicada (de la Rúa- Domenech, 2006). Al contrario en países en vías de desarrollo se cree que es causante de hasta 10% de los casos (Cousins *et al.*, 1999).



**Figura1.-** Tasa de incidencia estimada de TB 2011 (OMS, 2011)

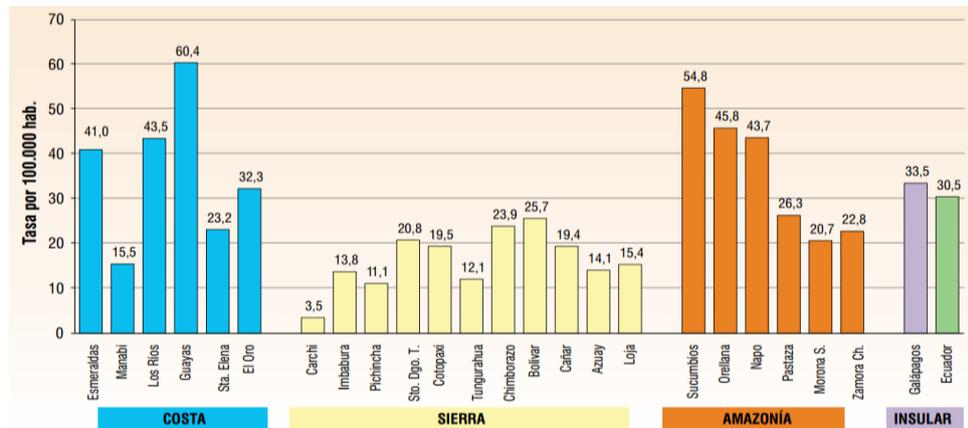
### 2.7.2. Para América Latina

En la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, la leche es pasteurizada, pero el control de calidad no siempre es adecuado lo que significa que una parte de la población sigue consumiendo leche sin pasteurizar. Además la infección de TBB en el ganado sigue siendo

frecuente en varios países, y las tasa de incidencia de la tuberculosis humana son relativamente altos (Ritacco *et al.*, 2006), cabe destacar que en esta zona el diagnóstico se realiza por confirmación bacteriológica, por ser rápido de bajo costo y muy específicos, pero la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* no se considera una prioridad de salud pública, ya que el tratamiento estándar es efectivo para los dos agentes (de Kantor *et al.*, 2010). Sin embargo se estima que el 2% de los casos de tuberculosis pulmonar y 8 % de extra pulmonar son causados por *M. bovis* (Rivera y Giménez, 2010). Durante los últimos 10 años no se ha emitido informes de casos positivos de TBB en Bolivia, Chile, Cuba, Panamá y Perú (Kantor *et al.*, 2010). En una región principalmente de Argentina, varios estudios, han demostrado una incidencia que oscila entre el 0,7 al 6,2% (Cataldi y Romano, 2007). En México, Pérez *et al.*, (2008) encontró que 13,8% de 74 aislamientos en pacientes con TB, el agente causal fue *M. bovis*.

### **2.7.3. En Ecuador**

Para el año 2011 según el Ministerio de Salud pública se reportó los datos de TB totales, por provincia, que se pueden observar en la tabla siguiente. Sin embargo por la falta de estudios y de identificación del patógeno se estima que la incidencia se encuentra relacionada con el resto de países de la zona. Destacando que el periodo de 1998-2005, en base a su crecimiento y/ o características morfológicas se aisló 2 cepas de *M. bovis*, en dos niños con TB extra pulmonar, sospechando que la ruta de trasmisión fue la ingestión de los microorganismos (Kantor *et al.*, 2007).



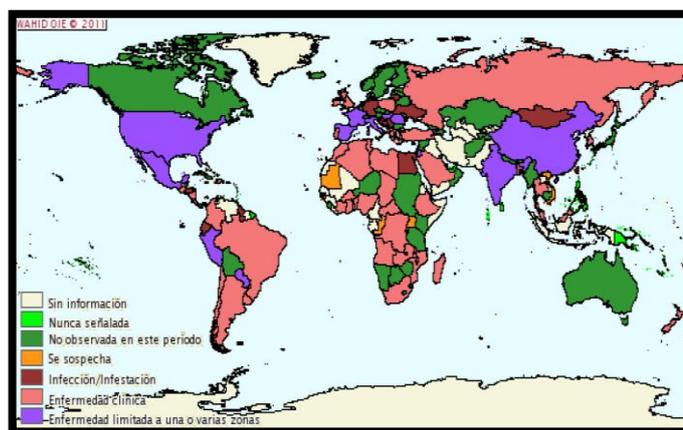
**Figura 2.** Tasa de incidencia de tuberculosis total y Pulmonar, Baciloscopía positiva por Provincias, Ecuador 2009 (Fuente 1: MSP; 2010 Programa Nacional Control de la Tuberculosis)

#### 2.7.4 Tuberculosis Bovina en Ganado Bovino a Nivel Mundial

En los países industrializados, la TBB en animales está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de control, mientras que en varios países en desarrollo la situación no ha mejorado o la prevalencia se encuentra en aumento (Acha y Szyzfyres, 2001).

Si bien la tuberculosis bovina algunas vez estuvo presente en el mundo entero, existen países declarados, en la actualidad, libres de TBB como Australia, Islandia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Austria, Suiza, Luxemburgo, Letonia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, República Checa, Canadá, Singapur, Jamaica, Barbados e Israelk (CFSPH, 2009).

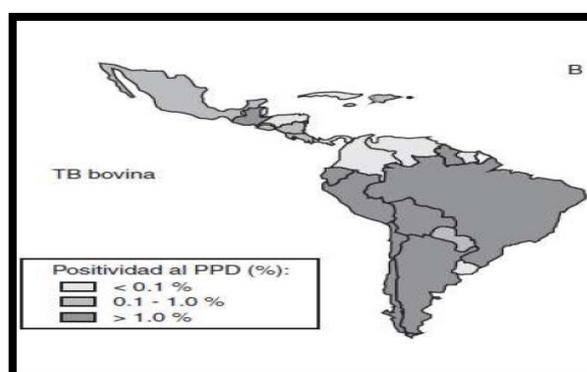
Para el período de enero- junio del 2010, la Organización Mundial de Sanidad Animal determinó la distribución mundial de TBB en el ganado bovino, en donde se pudo diferenciar países con infección/infestación como Ecuador, Ucrania y Mongolia (en rojo) y otros que nunca se ha señalado como las islas Filipinas.



**Figura 3.** Mapa de distribución de TBB enero- junio 2010, (OIE, 2011)

### 2.7.5 Para América Latina

De los aproximadamente de los 374 millones de bovinos en América Latina y el Caribe, el 70% se localiza en las zonas donde las tasas infección por *M. bovis* en el ganado son superiores al 1%. El restante 30%, se encuentra en países donde la enfermedad afecta a menos del 1%, incluyendo 62 millones, en lugares donde la infección por tuberculosis bovina no está presente (de Kantor y Ritacco, 2006). De acuerdo con la prueba retardada de tuberculosis, existen regiones con muy baja o nula prevalencia, como algunas islas del Caribe; de prevalecía media, como México y con alta prevalencia como Brasil o Argentina

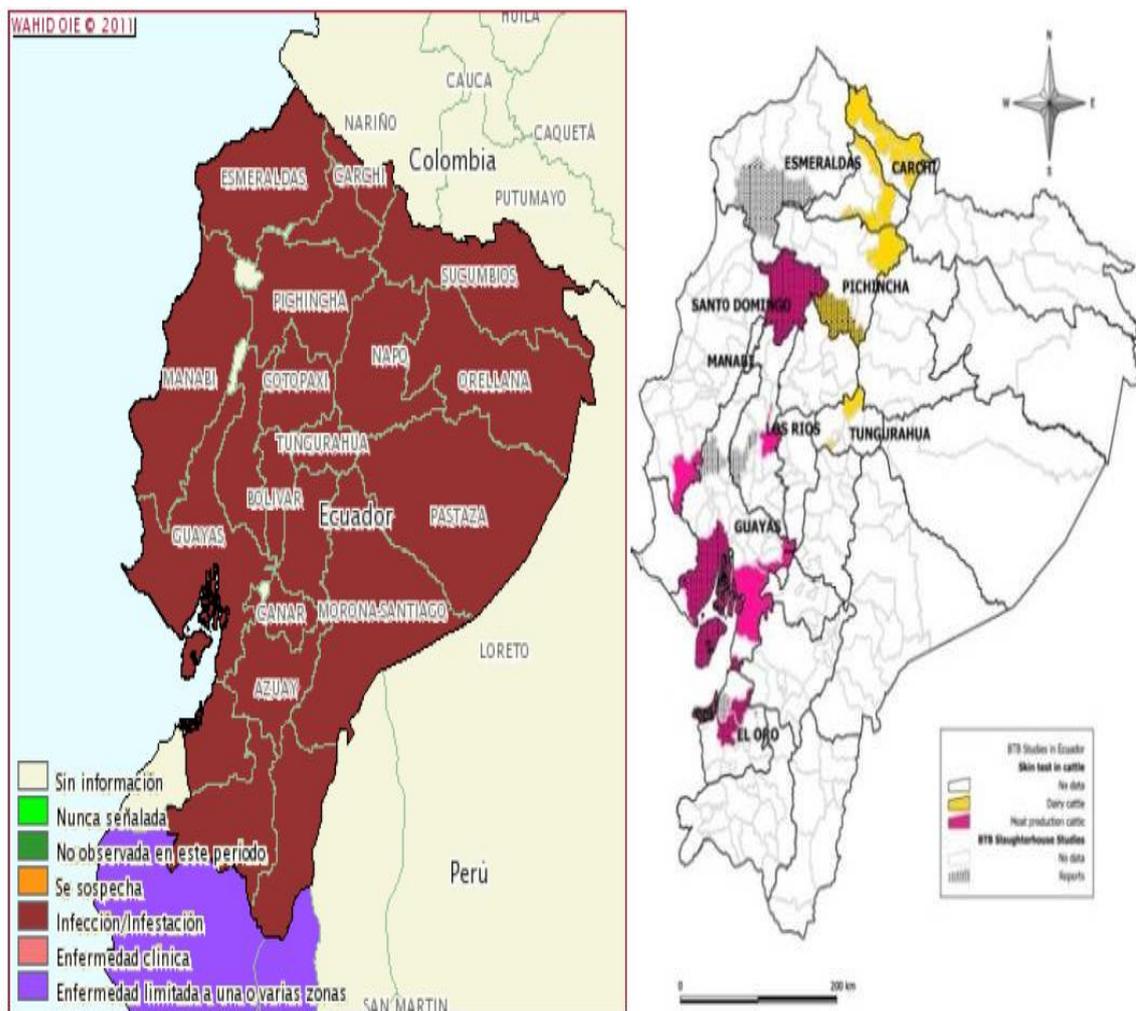


**Figura 4.** Prevalencia de TBB en Latinoamérica. (López *et al* 2006)

### 2.7.6. En Ecuador

La prevalencia nacional de TBB es desconocida (Proaño-Pérez, 2011), pero se ha reportado al Ecuador dentro de un grupo de países de América Latina que tiene una prevalencia relativamente alta (Kantor y Ritacco, 2006; de Kantor *et al.*, 2007), los casos no están bien documentados ni cuantificados, por varias razones: como la falta de un adecuado registro de animales positivos, el uso limitado de pruebas diagnósticas, pero sobre todo porque no es una enfermedad de declaración obligatoria (Proaño-Pérez *et al.*, 2011). Existen varios reportes publicados, Proaño-Pérez *et al.*, (2006) en un estudio realizado en el cantón Mejía encontró una prevalencia de 7,95% en hatos grandes, 4,24% en medianos y 0,3 en pequeños; posteriormente llevó a cabo una investigación más detallada en la misma regio en los años 2007 y 2008, calculando una prevaecía en hatos grades de 8,63% y 8,43%, respectivamente, además de una incidencia del 1,70% (Proaño-Pérez *et al.*, 2009). A nivel de mataderos se identificó en la misma zona 2,3% y 2,4% de prevaecía entre 2007 y 2008, respectivamente (Proaño-Pérez *et al.*, 2011)

Además existen reporte, mediante pruebas de tuberculina simples y comparativa (Proaño-Pérez., 2011) En la provincia de Tungurahua, Acosta y Parreño (1977) encontraron una prevaecía baja (0,33%), un estudio posterior en 2003 en la misma zona mostro una diferencia incrementando a 1,2% (Alemán *et al.*, 2003). Mientras que la provincia de Pichincha, específicamente en el cantón Cayambe, se encontró una prevaecía de 2,81% (Acosta y Parreño, 1977), y posteriormente varió a 0,4%.



**Figura 5.** a) Mapa de distribución de Enfermedades, Tuberculosis Bovina, Ecuador (OIE, 2011); b) Estudio llevados a cabo mediante pruebas de tuberculina e inspecciones veterinarias para determinar la prevalencia de la tuberculosis bovina, Ecuador, 1972- 2008 (Proaño-Pérez et al., 2011)

**Cuadro 2.** Prevalencia de la tuberculosis bovina en el ganado de lechero, según estudios disponibles.

Autor	Año	Localización		Prueba usada	Tamaño de hato <sup>a</sup>	No. Cabezas	Positivos / No. Animales (%)	
		Provincia	Cantón					
Acosta & Parreño	1977	Tungurahua	Píllaro	SITT <sup>b</sup> & CITT <sup>c</sup>	NA <sup>d</sup>	20	7 / 2 132	0.18
Salazar & Cevallos	2002	Pichincha	Cayambe	SITT & CITT	NA	26	14 / 3 006	0.47
Alemán <i>et al.</i>	2003	Tungurahua	Píllaro, Mocha	SITT & CITT	NA	24	49 / 4 012	1.22
Proaño-Pérez <i>et al.</i>	2006	Pichincha	Mejía	SITT & CITT	large	15	26 / 327	7.95
Proaño-Pérez <i>et al.</i>	2007	Pichincha	Mejía	CITT	large	13	142 / 1 644	8.63
Proaño-Pérez <i>et al.</i>	2008	Pichincha	Mejía	CITT	large	13	122 / 1 446	8.43

<sup>a</sup>, >70 bovinos; <sup>b</sup>, Prueba simple de tuberculina; <sup>c</sup>, Prueba comparativa de tuberculina; <sup>d</sup>, no disponible.

**Fuente:** (Proaño Pérez *et al.* 2011)

## 2.8. FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD

### 2.8.1. Factores Internos

#### 2.8.1.1. Raza

La influencia de la raza no puede determinarse con certeza; de todas maneras, el que la enfermedad se presente con especial frecuencia en ciertas razas en gran parte guarda relación con el modo de vivir y la explotación de esos animales, por ejemplo los bovinos de razas grises de las estepas enferman proporcionalmente en relación a los de raza de color; cuando se estabula, es mucho más rara en becerros de razas de

color que viven en prados y en montañas que en los estabulados (Ramos *et al.*, 2004).

#### **2.8.1.2. Sexo**

En cuanto al sexo, va unido al modo de explotar del animal ya que es muy frecuente en vacas de las cuales rara vez no reaccionan a la tuberculina (de 70 a 80% más en granjas lecheras); en cambio en los bueyes y sobre todo en los toros que suelen alcanzar menos edad, el número de casos es menor (Ramos *et al.*, 2012).

#### **2.8.1.3. Edad**

Con la edad, la frecuencia de las enfermedades tuberculosas aumenta poco a poco, pero continuamente en bovinos. La mitad de los casos de tuberculosis descubiertos por la prueba tuberculina pos-mortem en el matadero, pasan de los 6 años; este hecho, a pesar de la receptibilidad del organismo juvenil, se debe a que los animales están expuestos a contagios más frecuentes y persistentes conforme van teniendo más edad (Ramos *et al.*, 2012).

### **2.8.2. FACTORES EXTERNOS**

#### **2.8.2.1. Alimentación**

El organismo también se debilita por la alimentación inadecuada e insuficiente con piensos poco sustanciosos (residuos acuosos de fábricas o destilerías), por el cebamiento (en cerdos), por la excesiva explotación de rendimiento lácteo, los partos numerosos y el trabajo fatigoso y persistente (Ramos *et al.*, 2012).

#### **2.8.2.2. Manejo**

Las causas externas que disminuyen la fuerza vital del organismo y la resistencia de los tejidos, generalmente favorecen al desarrollo de la tuberculosis. Entre estas figuran establos mal ventilado, húmedo y sucio,

el poco ejercicio al aire libre y además la aspiración del polvo y humos irritantes (Ramos *et al.*, 2012).

### **2.8.2.3. Enfermedades**

Otras enfermedades también favorecen al desarrollo de la tuberculosis. La infección se desenvuelve con frecuencia después de una inflamación aguda de los pulmones, pues el tejido pulmonar enfermo, y en particular el exudado reabsorbido incompletamente, son terrenos favorables para el bacilo tuberculoso. En otros casos el organismo se debilita por la enfermedad general aguda que aviva el proceso tuberculoso latente y acelera su curso (Ramos *et al.*, 2012)

### **2.8.3. Patogenia**

Los micro bacterias patógenas son parásitos intracelulares facultativos. *M. tuberculosis* y *M. bovis* se mantienen vivos en la naturaleza mediante la transmisión de un hospedador a otro (Kantor, 2007) y son capaces de producir tanto una enfermedad progresiva como una infección latente (Parrish *et al.*, 1998). El bacilo tuberculoso penetra en el organismo principalmente por vía aerógena, 800-90% de los casos, aunque no se descartan la vía entérica, por ejemplo en terneros amamantados con leche infectada, debido a que del 1-2% de las vacas con TBB elimina el bacilo al desarrollar mastitis (Acha y Szyfres, 2011), o por el consumo de alimentos, pastos o agua contaminada con secreciones nasales, heces u orina que posea el patógeno, ya que se ha demostrado que *M. bovis* persiste por periodos largos de tiempo en el suelo, agua y maíz. (Fine *et al* 2011).

La trasmisión de *M. bovis* entre el ganado depende de una serie de factores, entre los que se encuentra la frecuencia de excreción, Vía de infección, dosis infecciosa, periodo de transmisibilidad del huésped (Good y Duignan, 2011). Por contaminación es posible solo si se presenta una serie de condiciones muy específicas, además algunos estudios ha

demostrado que en etapas tempranas la transmisión entre animales es poco probable (Griffin y Dolan, 1995).

El pulmón es la principal puerta de entrada del bacilo, que causa una infección localizada en el sitio donde se depositan después de la inhalación (Kritski y Fiuza, 2007), en la mayoría de los casos (90) debido a una respuesta inmune eficiente no se desarrolla la enfermedad durante toda la vida, sin embargo, el riesgo de desarrollo aumenta cuando existen algunas alteraciones del sistema inmunológico (Parrish *et al.*, 1998; Hernández-Prado *et al.*, 2007); si no puede ser contenida en el plano local, la difusión de los bacilos se produce inicialmente por la ruta hematogena, hacia diferentes órganos (Kritski y Fiuza, 2007).

Incluso después de controlar con éxito la TB primaria, algunos bacilos permanecen en un estado no-replicante o lentamente-replicante para el resto de la vida del individuo, esta etapa es asintomática y la enfermedad surge como consecuencia de la reactivación de las bacterias (Parrish *et al.*, 1998)

#### **2.8.4. Mecanismo de Infección de *M. bovis***

Estudios clásicos en animales sugieren que existen varias etapas en la infección de los bacilos tuberculosos en el huésped (Lurie, 1964; Gillespie, 2006).

##### **2.8.4.1. Primera Etapa: Inicial o de Ataque**

Una vez inhalados, la mayoría de los patógenos se encuentran atrapados en la mucosa de las vías superiores del tracto respiratorio, las partículas o micro-gotas menores de 5µm llegan a las vías respiratorias inferiores, especialmente en el interior de los alvéolos, donde son fácilmente fagocitados por los macrófagos alveolares, si la respuesta inmune es completamente eficaz, causará la eliminación del agente patógeno por acción fagocítica (Kritski y Fiuza, 2007). Por el contrario, si los mecanismos no son eficientes, el agente infeccioso puede sobrevivir en el

pulmón. Una vez dentro del macrófago, la micobacteria tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse, inhibiendo la acidificación al impedir la unión fagosoma con el lisosoma (Kaufmann, 2011) gracias a lípidos de la envoltura como LAM y PIM, que impiden su maduración (Vergue et al., 2004), no obstante puede fusionarse a otras vesículas intracelulares para facilitar el acceso del patógeno a nutrientes y al proceso de replicación intravacuolar. (Murray et al., 2007). Además el bacilo tuberculoso tiene la capacidad de impedir la activación de macrófagos por IFN- $\gamma$  e IL-12, provocando que el Huésped sea susceptible (Alcais et al., 2005).

#### **2.8.4.2 Segunda Etapa: De Simbiosis o Crecimiento Logarítmico**

Durante los días o semanas siguientes, hay un crecimiento logarítmico de los bacilos dentro de los macrófagos, que son destruidos liberando micobacterias en el medio extracelular (Palmieri, 2001), una característica de esta etapa es la formación de células gigantes multinucleadas a partir de macrófagos fusionados (Murray et al., 2007a). Por otra parte se inicia un reclutamiento celular, ya que los monocitos sanguíneos y otras células inmunitarias son atraídos al sitio de la infección debido a que pueden diferenciar a los macrófagos que son capaces de destruir al bacilo (Gillespie, 2006).

El estado de crecimiento sin oposición, de los bacilos, finalizan cuando aparecen los macrófagos activados, respaldados por dos mecanismos inmunitarios: la inmunidad media por célula (IMC) y la hipersensibilidad retardada (HR) (Palmier, 2001).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y las quimosinas inflamatorias, producidas por macrófagos infectados, reclutan células blancas de la sangre (Kritski y Fiuza, 2007). Dos líneas de linfocitos (los Cd4+relacionados con la IMC y los Cd8 ligados a la HR) comienzan eliminando los macrófagos no activados lo que crea áreas de necrosis caseosa donde los bacilos ya no pueden multiplicarse como lo hacían en los macrófagos, que pueden sobrevivir en estado latente (Prescot et al.,

1999). Las células reclutadas producen su propio complemento de quimiocinas y citoquinas que amplifican el reclutamiento celular provocando, una masa celular llamada tubérculo o granuloma, el cual inicialmente se compone de un núcleo de macrófagos infectados, rodeados de macrófagos espumosos, con una capa exterior de linfocitos rodeados de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (Kritski y Fiuza, 2007).

#### **2.8.4.3 Tercera Etapa: de Licuefacción y Formación de la Cavidad**

En esta etapa se inicia, o bien, las células inmunes no logran controlar la multiplicación de las micobacterias (Gillespie, 2006). La licuefacción de áreas de necrosis caseosa puede producirse después de la infección primaria o un largo periodo de quiescencia. Como el caseum hidrolizado es un mejor medio para el desarrollo de los bacilos, se puede producir una proliferación extracelular intensa sin opción inmunitaria (Palmieri, 2001).

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

La PCR es una técnica de amplificación con la que se puede obtener  $1 \times 10^9$  de copias de una secuencia de ADN específica, a partir de una simple copia de ADN molde. Para esto es necesario contar con cebadores específicos a la secuencia diana. Dentro de las ventajas que proporciona esta técnica tenemos la alta sensibilidad, especificidad y la rapidez. Existen desventajas como son la fácil contaminación, la generación de falsos positivos. Este protocolo describe los principios básicos de la PCR, proporciona una metodología que se traducirá en la amplificación de secuencias de la mayoría de objetivo, y presenta estrategias para la optimización de una reacción. Siguiendo esta guía de PCR, debe ser capaz de:

- Establecer las reacciones y las condiciones de ciclos térmicos convencionales para un experimento de PCR

- Comprender la función de varios componentes de la reacción y su efecto global sobre un experimento de PCR
- Diseñar y optimizar un experimento de PCR para cualquier molde de DNA
- Solucionar problemas de fallidos experimentos de PCR

## 2.10. TRABAJOS RELACIONADOS

- ✓ Arráiz (2007), Evaluación de un ensayo de PCR múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia.
- ✓ Ameni (2010) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated from tuberculosis lesions of cattle in north Eastern Ethiopia.
- ✓ Huart (2003) PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions.
- ✓ Lazaro (2014) Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*.
- ✓ Mokaddas (2007) Development and Evaluation of a Multiplex PCR for Rapid Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members from Non-tuberculous Mycobacteria.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES**

#### **3.1.1 Material de Campo**

Muestras de leche de bovinos

Tubos

Guantes de manejo.

Mascarillas.

Overol

Botas

Material de sujeción

Gradillas

Cámara fotográfica

Desinfectantes

#### **3.1.2. Material de Oficina**

Computadora

Calculadora

Esferográficos

Hojas de papel

Libreta

Internet

Memoria USB

Impresora

#### **3.1.3. Equipos y materiales de laboratorio**

Centrífuga

Pipeta automática de volumen ajustable

Micropipetas desechables.

Microtubos

Vasos de precipitación de distintos volúmenes.

Varillas magnéticas

Papel absorbente

Probetas graduadas

Agarosa

Termociclador

### **3.1.4. Reactivos**

Cebadores

- RD4intF, 5´ - ACACGCGGCGAAGTATAGC-3´
- RD4flankR, 5´ - AAGGCGAACAGATTCAGCAT-3´
- RD4falnkF, 5´ - CTCGTCTGAAGGCCACTAAAG-3´

Kit Invitrogen (Pure Link Genomic DNA mini kit)

Enzima (Platinum Taq Polymerase)

Agua destilada

## **3.2. METODOS**

### **3.2.1. Descripción del Área de Estudio**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Cantón Loja, situado en el sur occidente de la provincia de Loja. Posee un clima templado andino con una oscilación anual de la temperatura de 15 °C, El cantón Loja tiene una superficie de 11026 kilómetros cuadrados y está ubicado entre los 2100 m.s.n.m. Limita, al norte con el cantón Saraguro, al sur y al este con la Provincia de Zamora Chinchipe y al Oeste con parte de la Provincia de El Oro y los cantones de Catamayo, Gonzanamá y Quilanga.



**Figura 6.** Ubicación geográfica del cantón Loja (Wikipedia)

### 3.2.2. Delimitación del Área de Estudio

El área de estudio se dividió por parroquias del cantón Loja: El Valle, Sucre, San Sebastián, Chantaco, Chuquiribamba, El Cisne, Gualiel, Jimbilla, Malacatos, Quinara, San Lucas, San Pedro de Vilcabamba, Santiago, Taquil, Vilcabamba y Yangana.

El diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja (UNL).

### 3.2.3. Tamaño y Selección de la Muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se tomó en consideración los datos proporcionados por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro sede Loja (AGROCALIDAD) referentes a la campaña de vacunación contra la fiebre aftosa 2014. Primera Fase en la cual se tuvo una población de bovinos inmunizados de 49.829. Es así que para determinar el tamaño de la muestra para el presente estudio se aplicó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{PxQxN}{(N-1)\frac{E^2}{K^2} + PQ}$$

**donde:**

**N** = Tamaño de la muestra

**P** = Probabilidad que se cumpla (0,05)

**Q** = Probabilidad que no se cumpla (0,099)

**E<sup>2</sup>**= Constante

**K<sup>2</sup>**= Constante (2)

**N**= Número de animales

$$n = \frac{0,25 (49829)}{(49829-1)\frac{(0.099)^2}{(2)^2} + 0.25}$$

$$n = \frac{12457.25}{(49828)(0,00245025)+0.25}$$

$$n = \frac{12457.25}{122,341057}$$

$$n = 102$$

**Se calculó 102 muestras para las pruebas moleculares**

**Cálculo de la Fracción**

$$F = \frac{N}{n}$$

$$F = \frac{49829}{102}$$

$$F = 489$$

Describiendo la fracción se debe tomar 1 muestra por cada 489 animales

### 3.2.4. Distribución de la Población en la diferentes Parroquias

#### Sector Norte: El Valle

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
NORTE	Jipiro, Amable María, Salapa, Yanacocha, Masaca, Carigan, Motupe, La Banda, San Cayetano, Los Molinos, La Pas, Zhucos, Las Pitas, Cochas.	$\frac{5999}{489}$	12

#### Sector Sur: San Sebastián

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
SUR	Punzara, Cajanuma, Z. Guayco, El Capulí, Dos Puentes, La Quebrada, Argelia, Pueblo Nuevo, Las Minas	$\frac{2209}{489}$	4

**Sector Este: El Sagrario**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>ESTE</b>	Eucaliptos, El Churo, El Calvario, El Rincón	$\frac{248}{489}$	1

**Sector Oeste: Sucre**

<b>Sector Rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>OESTE</b>	Tierras coloradas, Chonta Cruz, La Victoria, Menfis, Obrapía, Payanchi, Bolonia, D. Alvarez, Belén, Teneria, La Urna, Las Palmas, La Palmera	$\frac{1807}{489}$	4

**Parroquia rural: El Cisne**

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
<b>EL CISNE</b>	Ambocas, Chaquiruña, Agua de Milagro, Huasin, La Nona, La Concha, Millubo, Santa Teresita	$\frac{2477}{245}$	5

**Parroquia rural: Chuquiribamba**

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
<b>CHUQ UIRIB AMBA</b>	Tesalia, Guayllas, Saracapax, Hynacapac, Calucay, Carmelo, La Dolorosa, Miraflores, Pordel, Reina del Cisne, San Vicente, Simón Bolívar, Zañe	$\frac{5541}{489}$	11

**Parroquia rural: Gualele**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina</b> <b>Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>GUALELE</b>	Bahin, Celén, Centro, El Ary, Gualaspamba, Lluglla, Ramada, Rodeo, San Francisco, Panecillo, Porvenir, San Juan alto y bajo, Dorado, Los Pinos	$\frac{3904}{489}$	8

**Parroquia rural: Taquil**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina</b> <b>Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>TAQUIL</b>	La Aguangora, Chinchaca, Cera, Naranjito, Cachipamba, Macainume, Paja blanca, Duraznillo, Limón, Cenen, Gonzabal	$\frac{1844}{489}$	4

**Parroquia rural: Chantaco**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina</b> <b>Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>CHANTACO</b>	El auxilio, Linderos, Fátima, Motupe, Cumbe, San Nicolás.	$\frac{193}{489}$	1

**Parroquia rural: Santiago**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina</b> <b>Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>SANTIAGO</b>	Barrio central, Cachipirca, Minas, San José, Sayo, Cenen, Pucala, El Gallo, La Chorrera, El Paglo, Manzano, Liria, Lliclla, Posin, Chaclipaccha, Aguacate y Chacoyante	$\frac{5852}{489}$	12

**Parroquia rural: Jimbilla**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>JIMBILLA</b>	Hinzhapa, Jesús María, Las Palmas, San Vicente, La Chonta, Huacabamba, Montecristi, Masaca, Los Molinos, San Isidro, Santa Bárbara, San Antonio	$\frac{2868}{489}$	6

**Parroquia rural: Malacatos**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>MALACATOS</b>	Tres Leguas, Rumishitana, Granadillo, Poto pamba, Nangara, Chorrillos, Landangui, El Prado, Naranjo dulce, Cavianga, El Carmen, El Sauce, San Francisco, Calera, Pedregal, San José de Ceibopamba, Santa Cruz, Santa Ana	$\frac{2827}{489}$	6

**Parroquia rural: San Pedro**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>SAN PEDRO</b>	Panecillo, Dorado alto, bajo, Amala, Carango, Sacapo, El Chaupi, Uchima	$\frac{227}{489}$	1

**Parroquia rural: Vilcabamba**

<b>Sector rural</b>	<b>Barrios</b>	<b>Población bovina Fracción de Muestreo</b>	<b>Muestra</b>
<b>VILCABAMBA</b>	Yamburara bajo, alto, San José, Mollepamba, Cayluma, Cuctanama alto, bajo, Linderos, Santorum, Moyococha, Solanda, Tumianuma	$\frac{3721}{489}$	7

**Parroquia rural: San Lucas**

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
<b>SAN LUCAS</b>	Cañi, Jaboncillo, Lancapag, Moraspamba, Ciudadela, San Lucas, Linderos, Pueblo Viejo, Langa, Bucashi, Vinuyaco Alto, Vinuyaco Bajo, Durazno, Censo, Puruzhuma, San José, Nogal, Bellavista	$\frac{5668}{489}$	11

**Parroquia rural: Quinara**

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
<b>QUINARA</b>	La Palmira, Sahuayco. Atillo, Quinara	$\frac{259}{489}$	1

### Parroquia rural: Yangana

Sector rural	Barrios	Población bovina Fracción de Muestreo	Muestra
YANG ANA	Patinuma, Suro, Masanamaca, San Comunidades, Gabriel, Huaycopamba, La Elvira, Marcopamba, Quebrada Seca, Anganuma	$\frac{4185}{489}$	8
<b>TOTAL DE MUESTRAS</b>			<b>102</b>

#### 3.2.5. Variables

- a) **Prevalencia de acuerdo a la Zona.-** En esta variable cada parroquia se tomará como zona, entre ellas se encuentra; El Valle, Sucre, San Sebastián, Chantaco, Chuquiribamba, El Cisne, Gualiel, Jimbilla, Malacatos, Quinara, San Lucas, San Pedro de Vilcabamba, Santiago, Taquil, Vilcabamba y Yangana.
- b) **Prevalencia de acuerdo a la Edad.-**En el factor edad se incluyeron todos los animales en producción.
- c) **Prevalencia de acuerdo a la Raza:** en este factor se incluyeron los bovinos hembras en producción de las diferentes razas existentes en el cantón Loja.
- d) **Prevalencia de acuerdo a los Casos Positivo:** se consideran todos los animales positivos a la prueba de biología molecular.

### **3.3. RECOPIACION DE LA INFORMACION**

El presente estudio se desarrolló llevando a cabo un trabajo de campo apoyado de técnicas de laboratorio, las cuales se describen a continuación.

#### **3.3.1. Recolección de muestras**

El trabajo de campo se desarrolló con la recolección de muestras de leche de vacas en producción. Las 102 muestras fueron tomadas al azar de las diferentes ganaderías lecheras de las parroquias ubicadas en el perímetro territorial del cantón Loja.

Todas las muestras se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja

#### **3.3.2. Análisis de Laboratorio**

Los análisis de laboratorio se realizaron utilizando las siguientes técnicas:

##### **3.3.2.1. Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN, de muestras de leche, de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* y Vacuna BCG se procedió siguiendo las especificaciones del kit Pure Link Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies).

1. Poner el baño a una temperatura de 55 °C.
2. Poner 200µL de Leche (fresca o congelada) en un tubo estéril. En el caso de la suspensión bacteriana también 200 uL.
3. Adicione 20µL de Proteinasa K a la muestra.
4. Adicione 20µL de RNAsa a la muestra.
5. Mezcle en vórtex e incube por 2min.
6. Adicione 200µL de PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer
7. Mezcle en vórtex hasta obtener una solución homogénea

8. Incube a 55°C por 10min
9. Adicione Etanol 96-100%
10. Mezcle en vórtex por 15seg, hasta obtener una solución homogénea
11. Colocar una columna dentro del tubo colector
12. Adicione aproximadamente 640µL de la solución en la columna
13. Centrifugue la columna a 10.000g por 1min a temperatura ambiente
14. Descarte el tubo colector y coloque la columna en un tubo colector nuevo
15. Adicione 500µL de Wash Buffer 1 preparado con etanol en la columna
16. Centrifugue la columna a 10.000g por 1 min
17. Descarte el tubo y coloque un nuevo
18. Adicione 500µL de Wash Buffer 2 preparado con etanol en la columna
19. Centrifugue la columna a 10.000g por 3 min a temperatura ambiente y descarte el tubo colector
20. Coloque la columna en un tubo estéril de 1.5ml.
21. Adicione 25-200µL de PureLink Genomic Elution en la columna
22. Incube a temperatura ambiente por 1min.
23. Centrifugue a 10.000g por 1 minuto a temperatura ambiente.

### Interpretación

Posteriormente se procedió a determinar la concentración y calidad del ADN en el Espectrofotómetro (NanoDrop 2000). Al producto de la extracción de ADN lo encontramos en (ng/µL).

### **3.3.2.2. Determinación de la presencia de *Mycobacterium spp*, mediante PCR.**

Para detectar la presencia de *Mycobacterium sp*, en las muestras de leche se empleó la combinación de los iniciadores universales RD4intF, RD4flankR y RD4falnkF para la amplificación (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Secuencias nucleotídicas de los iniciadores seleccionados para la amplificación de la región genómica ADN RD4 de *Mycobacterium spp.*

<b>Iniciadores</b>	<b>Secuencias 5' → 3'</b>
RD4intF	5'- ACACGCGGCGAAGTATAGC-3'
RD4flankR	5'- AAGGCGAACAGATTCAGCAT-3'
RD4falkF	5'-CTCGTCGAAGGCCACTAAAG-3'

Para la mezcla de reacción de la amplificación se utilizó 2.5uL de la solución amortiguadora de PCR 10X (Invitrogen); 0.75uL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0.5uL de dNTPs, (10 mM), 1.0 µL, cada uno de los cebadores, 0.1 uL de *Taq Platinum DNA Polimerasa* (Invitrogen); 17.15uL de H<sub>2</sub>O y 1 µL de ADN total para un volumen final de 25 µL, (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Elementos de las Reacción en Cadena de la Polimerasa.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O	17.15 uL
Buffer 10x	2.5 uL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75 uL
dNTPs 10mM	0.5 uL
RD4 intF 1X	1 uL
RD4 flank F 1X	1 uL
RD4 flank R 1X	1 uL
Taq Platinum DNA Polimerasa 1U	0.1 uL
ADN (muestra) ng/uL	1 uL
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>25uL</b>

El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial 95°C por 15 minutos; 35 ciclos de desnaturalización de 95°C por 60 segundos, alineamiento a 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, seguido de una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se emplearon como controles positivos para el diagnóstico de la Tuberculosis, la cepa de *Mycobacterium bovis*, proveniente de la vacuna BCG y una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, proveniente de colonias

de orina de humanos infectados. El control negativo es solamente mezcla de reacción más 1 uL de ADN de *E. coli*.

### **3.3.2.3. Electroforesis**

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% durante 45 minutos en solución amortiguadora TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5 %, a 100 voltios a 80 mA y fueron teñidos con SYBR Safe (Invitrogen) 7uL/100mL de agarosa.

Para realizar la corrida electroforética se mezcló 2uL de Blue Juice al 10x (Invitrogen) con 8uL del producto de la RCP, al igual para los controles Como marcador de peso molecular se empleó el de 1Kb (Invitrogen), del cual se tomó 2uL y se mezcló con 2uL de Blue Juice y 4uL de H<sub>2</sub>O.

Para la corrida del gel se colocó en el primer pocillo marcador de peso molecular, seguido de las muestras y por último los controles positivos y el control negativo.

Los resultados fueron visualizados mediante un transiluminador de luz ultravioleta (UV) Enduro GDS TOUCH (Labnet) y se compararon con los obtenidos para controles positivos de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*, utilizados en las detecciones.

## **3.4. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION**

### **3.4.1. Tabulación**

Se procederá a ordenar y clasificar los resultados obtenidos mediante la elaboración de tablas y cuadros estadísticos de cada una de las variables en estudio.

### **3.4.2. Análisis e interpretación**

En cada una de las variables se procederá a calcular los porcentajes y posteriormente se realizará una interpretación de carácter descriptivo y explicativo para llegar a conclusiones válidas en el trabajo.

### **3.4.3. Presentación de resultados**

Los resultados se presentaron mediante cuadros, gráficos estadísticos y de manera textual, para elaborar el informe final.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PREVALENCIA DE ACUERDO LA ZONA

Para determinar la prevalencia de la Tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a las parroquias, se tomó en cuenta cada una de las parroquias tanto urbanas como rurales del cantón Loja. Los resultados se resumen en el cuadro cinco y se grafican en la figura uno.

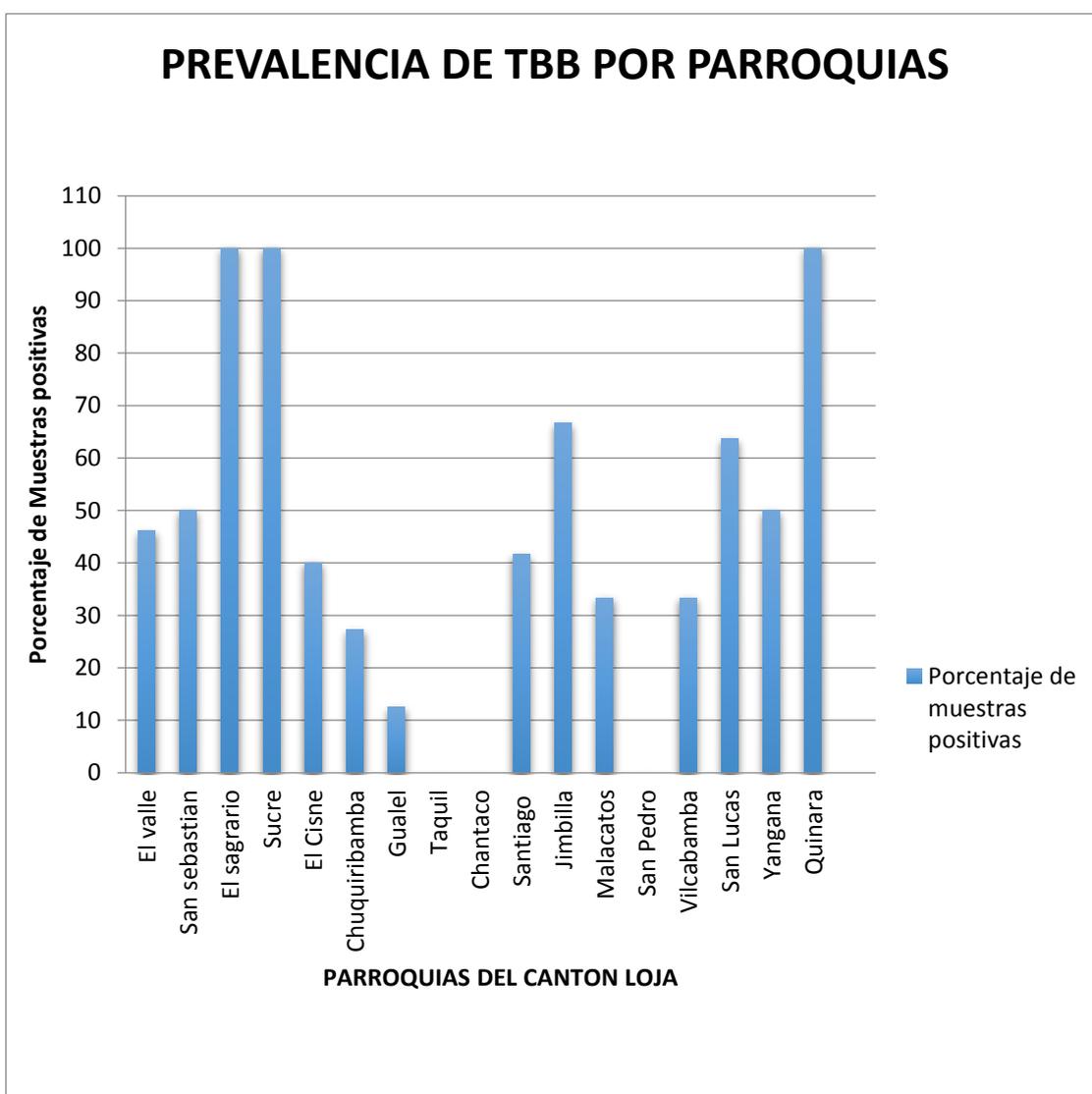
**Cuadro 5.** Prevalencia de TBB de acuerdo a las parroquias.

<b>Parroquia</b>	<b>Nro. Muestras totales</b>	<b>Nro. de muestras Positivas</b>	<b>Porcentaje</b>
El Valle	13	6	46
Sagrario	1	1	100
San Sebastián	4	2	50
Sucre	4	4	100
Chantaco	1	0	0
Chuquiribamba	11	3	27
El Cisne	5	2	40
Gualel	8	1	13
Jimbilla	6	4	67
Malacatos	6	2	33
Quinara	1	1	100
San Lucas	11	7	64
S. Pedro V	1	0	0

Santiago	12	5	42
Taquil	4	0	0
Vilcabamba	6	2	33
Yangana	8	4	50
TOTAL	102	44	

**Fuente:** Investigación Directa

Se aprecia en el cuadro cinco que en las parroquias Sucre (urbana), Sagrario (urbana) y Quinara (rural) se presentó la enfermedad en un 100% de los animales muestreados, también se registró la presencia de la TBB en la parroquia Jimbilla con un 67% de las vacas en producción, seguida de la parroquia San Lucas con un 64%. Mientras que en las parroquias de San Sebastián y Yangana se registró la TBB en un 50% en ambas parroquias para las vacas en producción muestreadas, para una mejor comprensión se grafica en la figura siete.



**Figura 7.** Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) en las diferentes parroquias del cantón Loja.

#### 4.2. PREVALENCIA DE ACUERDO LA RAZA

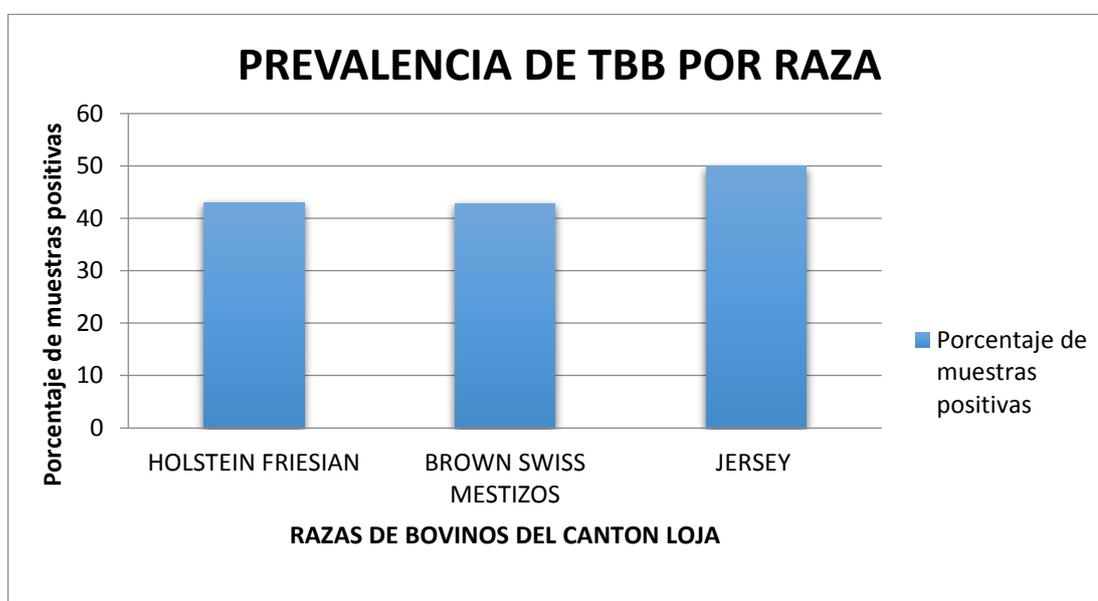
En la prevalencia de acuerdo a la raza se tomó en cuenta los siguientes rangos: Holstein y sus mestizos, Brown Swiss Mestizos, y Jersey. Los resultados se muestran en el cuadro seis y se grafican en la figura ocho.

**Cuadro 6.** Prevalencia de la TBB de acuerdo a la raza.

Raza	Total de Muestras	Muestras Positivas	Porcentaje (%)
Holstein y sus Mestizos	86	37	43
Brown Swiss Mestizos	14	6	43
Jersey	2	1	50
<b>TOTAL</b>	102	44	

**Fuente:** Investigación Directa

En el cuadro seis se muestra que en la raza Jersey se registró un 50% de las vacas en producción muestreadas con tuberculosis bovina. Por otro lado se obtuvo un 43% de bovinos hembras en producción afectadas con TBB en las razas Brown Swiss Mestizos, Holstein y sus mestizos, para una mejor comprensión se gráfica en la figura ocho.



**Figura 8.** Prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a la raza.

### 4.3. PREVALENCIA DE ACUERDO LA EDAD

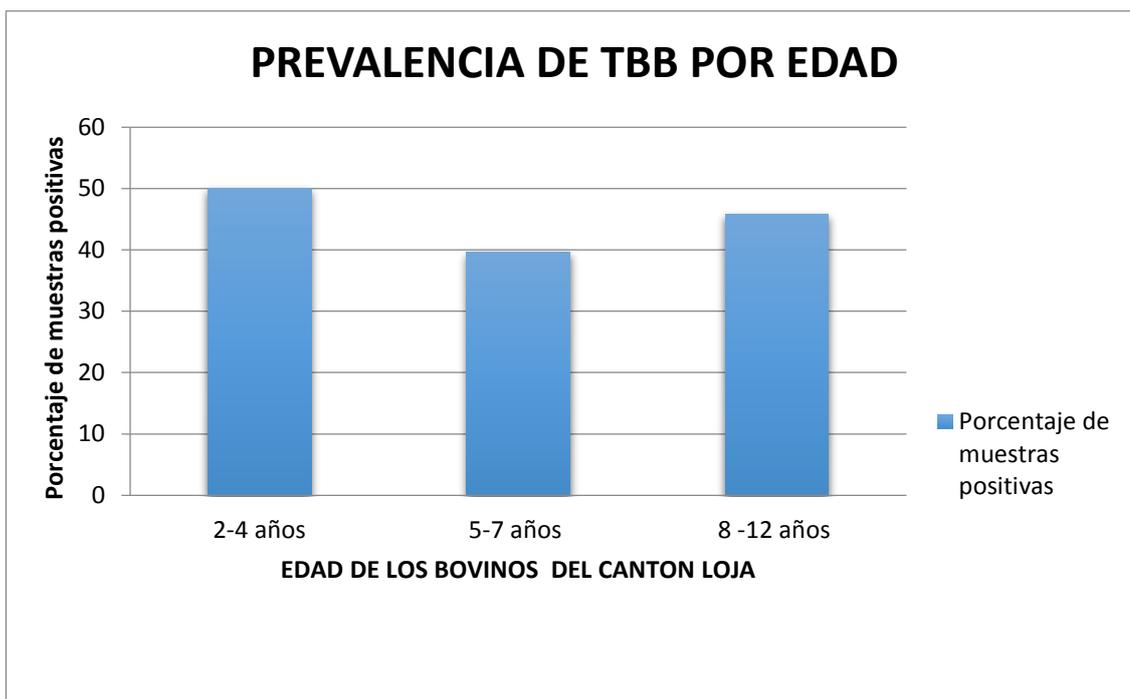
Se consideró la edad de las vacas en producción muestreados y se clasificó por rangos los cuales fueron: 2-4 años, 5-7 años, 8-12 años. Los resultados se muestran en el cuadro siete y se representan en la figura nueve.

**Cuadro 7.** Prevalencia de la TBB de acuerdo a la edad.

<b>Raza</b>	<b>Total de Muestras</b>	<b>Muestras Positivas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
2-4 años	24	12	50
5-7 años	53	21	40
8-12 años	25	11	46

**Fuente:** Investigación Directa

Se aprecia claramente que un 50% de vacas en producción de entre 2 a 4 años presentan tuberculosis bovina, mientras que el 46% de las vacas en producción, que presentan TBB están en una edad de 8 a 12 años, seguidos de un 40% en vacas de entre 5 a 7 años, para una mejor comprensión se representa en la figura nueve.



**Figura 9.** Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) de acuerdo a la edad.

#### 4.4. PREVALENCIA DE ACUERDO A LOS CASOS POSITIVOS

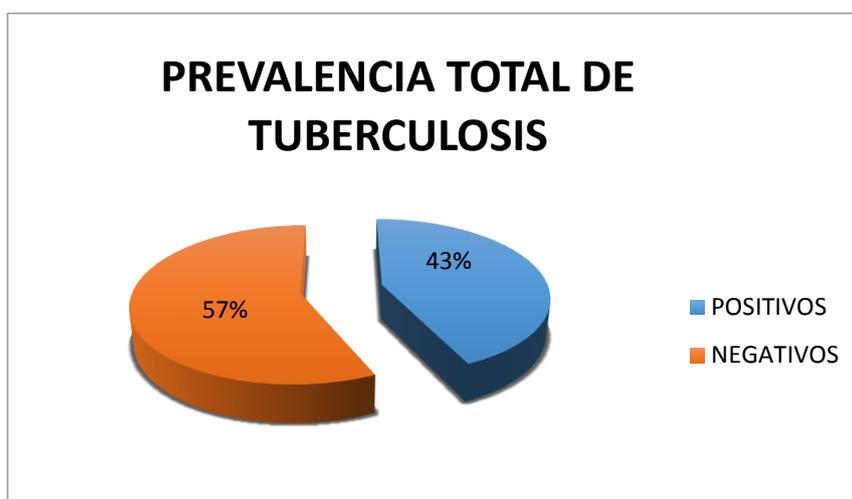
Se consideró animales positivos y negativos a la prueba de biología molecular, Reacción en la cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. Los resultados se muestran en el cuadro ocho y se representan en la figura diez.

**Cuadro 8.** Prevalencia de la TBB de acuerdo a los casos positivos

Casos	Total de Muestras	Porcentaje (%)
Positivos	44	43.13
Negativos	58	56.86
TOTAL	102	100

**Fuente:** Investigación Directa

Se aprecia claramente que un 43.13% de bovinos del cantón Loja presentan tuberculosis bovina. Mientras que el 56.86% de los bovinos son negativos a TBB, para una mejor comprensión se representa en la figura diez.



**Figura 10.** Representación gráfica de la distribución de las frecuencias en las muestras tomadas.

## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1 PREVALENCIA DE ACUERDO A LAS PARROQUIAS**

Los resultados obtenidos en esta investigación arrojan que existe una prevalencia desde el 0 al 100% de los bovinos en producción que son positivos a *Mycobacterium bovis*. De las dieciséis, catorce de las parroquias presentan altos índices de prevalencia, lo cual indica que la enfermedad se encuentra ampliamente diseminada en el cantón Loja. Estudios previos realizados en la Universidad Nacional de Loja describen un 6% de hembras bovinas que fueron positivas a la prueba de tuberculina en el Sector Norte de la hoya de Loja, lo cual es mucho menor que lo encontrado en este estudio (Paccha, 2012).

Así mismo los datos de la presente investigación son superiores en porcentaje a los descritos por Román, (2014), el cual realizó un estudio a 357 bovinos, los cuales fueron tuberculinizados en el cantón Loja donde obtuvo un 6.20% de animales positivos.

Una de las posibles causas de la elevada prevalencia y diseminación de la enfermedad en catorce de las dieciséis parroquias del cantón Loja pudiera ser por la falta de exámenes de diagnóstico respectivos a los bovinos, lo que propicia que animales infectados no sean detectados y continúen liberando la bacteria en los diferentes hatos ganaderos.

### **5.2 PREVALENCIA DE ACUERDO A LA RAZA**

De acuerdo a los resultados obtenidos de las dos vacas de raza Jersey muestreadas una es positiva lo que representa un 50 %. Sería necesario tomar un mayor número de muestras provenientes de esta raza para determinar si pudieran ser más susceptibles a adquirir la enfermedad que

el resto de las razas. Por otro lado la raza Holstein y sus mestizos mostraron un 43% de vacas afectadas por la TBB. Hay que tener en cuenta que en la presente investigación el 85% de los animales muestreados pertenecen a la raza Holstein precisamente por tratarse de hatos lecheros. De igual manera para la raza Brown Swiss Mestizos se registró un 43% de bovinos con TBB.

En esta investigación se obtuvo resultados positivos para todas las razas de ganado muestreadas, a diferencia de los obtenidos por Román, (2014), en el cual todos los animales que resultaron positivos pertenecían a la raza Holstein.

### **5.3 PREVALENCIA DE ACUERDO A LA EDAD**

En la presente investigación el 50% de las vacas en producción que se encuentran entre las edades de 2 a 4 años presentan tuberculosis bovina, mientras que el 46% de los bovinos muestreados que se encuentran entre 8 a 12 años son positivas a TBB, seguidos de un 40% en los animales de entre 5 a 7 años. Con estos datos se determinó que la TBB está presente en animales de todas las edades. Pero es preocupante que el mayor porcentaje de animales infectados son los más jóvenes.

Esto concuerda con lo descrito por Herrera, (2011), quien informa que existe presencia de la enfermedad en animales de todas las edades. Pero a diferencia Herrera, (2011) informa que existe un mayor porcentaje (40.60%) de animales infectados de entre 5 y 7 años de edad.

En cambio Román, (2014) menciona que un 17,35 % de provenientes del camal son positivas a TBB, las cuales fueron analizadas por baciloscopía. La edad promedio de los animales en los que se identificó el bacilo tuberculoso oscila entre 8,5 años aproximadamente, lo que concuerda con lo obtenido en el presente estudio.

#### 5.4 PREVALENCIA DE ACUERDO A LOS CASOS POSITIVOS

Existen pocos estudios basados en la detección de *M. bovis* mediante técnicas moleculares en Ecuador.

La prevalencia de TBB en vacas en producción obtenida en este estudio es de 43,13%, la cual fue determinada a través la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La cual mucho más sensible y específica que las pruebas tradicionales. La región amplificada en este estudio es RD4 que pertenece a una de las 43 regiones diferenciales en el género *Mycobacterium*. En el caso de RD4 permite diferenciar a *Mycobacterium bovis* del resto de los miembros del complejo. Esto es posible ya que el gen Rv1510 (RD4) se encuentra truncado en la especie *M. bovis*, incluyendo *M. bovis* variedad BCG, pues es el único miembro del complejo que carece del *locus* RD4 (Arráiz *et al.*, 2007).

Echeverría, (2011) mediante la aplicación de PCR anidado a partir de muestras de pulmón de ganado reveló una prevalencia de 4,33 % siendo este porcentaje inferior obtenido en la presente investigación. Debido a que la leche es una de las principales fuentes de diseminación de *M bovis* por lo cual es mucho más probable encontrar el bacilo, colocando este trabajo entre uno de los primeros donde se realiza diagnóstico molecular a partir de muestras de leche.

En esta investigación en 44 muestras se obtuvieron bandas de aproximadamente 400 pb las que corresponden a *M bovis*, lo que coincide con lo descrito por Ameni *et al.*, (2010) para estos cebadores. Sin embargo estos autores realizaron su estudio a partir de cepas cultivadas de tejido post mortem, a diferencia de este estudio donde se parte de muestras de leche directamente y no de cultivo. Lo que resulta de gran utilidad ya que el cultivo de esta bacteria requiere tiempo e infraestructura adecuada.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados expuestos se puede deducir las siguientes conclusiones

Del total de animales muestreados en la presente investigación se obtuvo un 43.13% de casos positivos en la detección de *Mycobacterium bovis*, lo que nos indica que una gran parte de la población bovina, presentan la enfermedad.

De acuerdo a los datos obtenidos en el transcurso de la investigación y en relación a las parroquias estudiadas se registró una mayor incidencia en las parroquias El Sagrario, Sucre (urbanas) y Quinara (rural) donde se presentó en la enfermedad en 100%, así como también en las parroquias Chantaco, San Pedro y Taquil (rurales) no se registró casos positivos de tuberculosis.

Los porcentajes de incidencia de tuberculosis de acuerdo a la raza es la raza Jersey con 50%, seguida de un 43% en la vacas en producción de las razas Holstein y Brown Swiss Mestizos, afectados por la TBB.

Al hacer el análisis de los resultados de acuerdo a la edad se encontró un 50% de bovinos entre 2 a 4 años presentan tuberculosis bovina, mientras que el 46% de los bovinos que presentan TBB están en una edad de 8 a 12 años, seguidos de un 40% en los bovinos de entre 5 a 7 años

La tuberculosis tiene un gran impacto económico en las explotaciones lecheras del cantón Loja especialmente en las vacas en etapa de producción, sin restar importancia al resto de categorías, debido a que están sometidas a estrés, lo cual incrementa la susceptibilidad a otras infecciones y eliminación temprana de los animales afectados, que al ser descartados disminuyen significativamente su valor comercial.

## 7. RECOMENDACIONES

Por riesgo a la salud pública, los animales positivos a TBB deben ser separados de los hatos y sacrificados.

Realizar estudios en la misma zona y en otros sitios con un número mayor de muestras , con el fin de determinar una mejor prevalencia e incidencia de Tuberculosis Bovina.

Realizar un estudio epidemiológico y una caracterización molecular a nivel nacional con el fin de detectar la presencia de variaciones genéticas del *M. bovis*.

Utilizar los protocolos de realizados en la presente investigación en extracción de ADN de muestras clínicas (leche) y PCR convencional.

Se recomienda aplicar las técnicas de biología molecular para la implementación de programas de control de TBB en Ecuador, determinando zonas endémicas y controlando la movilidad de los animales.

Capacitar a los ganaderos sobre las repercusiones de salud y económicas que tiene la TBB y sus factores de riesgo que provocan.

Debido al alto grado de prevalencia, se recomienda consumir únicamente leche pasteurizada.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Abalos P. y Retamal P (2004). Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev Sci Tech, 23 (2), 583-94.

Acosta C. y Parreño B. (1977). Incidencia de tuberculosis bovina en veinte haciendas del cantón Píllaro. [Tesis]. Quito: Facultad de medicina veterinaria, Universidad Central del Ecuador.

Acha P. y Szyfres B. (2001). ZONOSIS Y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. (tercera ed.). Washington DC.: Organización panamericana de la Salud.

Aimé B., Lequen L., Balageas A., Haddad N., Maugein J. (2011). *M. bovis* and *M. caprae* infections in Aquitaine: A clinico-epidemiologic study of 15 patients. Pathol Biol (Paris).

Ameni (2010) Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated from tuberculosis lesions of cattle in north Eastern Ethiopia.

Alcais A., Fieschi C., Abel L., Casanova J. (2005). Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. J Exp Med 202, 1617-21

Alemán R., Cajilema C., Jaramillo F. (2003). Diagnóstico de Tuberculosis Bovina mediante la prueba intradérmica única en hatos lecheros de la provincia de Tungurahua. [Tesis]. Quito: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Central del Ecuador.

Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Domínguez L., (2003). Elevaton of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* to species rack as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp nov. Int j Syst Evol Microbiol 53, 1785- 1789.

Arráiz (2007), Evaluación de un ensayo de PCR múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia.

Ashford D., Voelker L., Steele J., (2006). Bovine Tuberculosis: Environmental PublicHealth Preparedness Considerations for the Future. In: *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Thoen C., Steele J., Gilsdorf M. (Eds). (Second edition). USA: Wiley-Blackwell.

Ayele W., Neill D., Zinsstag J., Weiss G., Pavlik I. (2004). Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8, 924-937.

Barrera L. (2007). The basic of clinical bacteriology. In: Tuberculosis: From Basic Science to patient care. Palomino J.C., Leão S., Ritacco V. (Eds). (First edition). Antwerp - Sao Paolo – Buenos Aires: Emma Raderschadt.

Barquero F, L. 2009. Prueba de la tuberculina (PPD) aspectos técnicos y teóricos. Consultado 4 ene. 2012.

Biet F., Boschioli M., Thorel M., Guilloteau L. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res*, 36(3), 411-36.

Blowey W, R; Weaver A, D. 2006. Enfermedades y trastornos del ganado vacuno. 2ed. México, McGraw-Hill. p 89-187.

Brosch R., Gordon S., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gu C. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 368

Brosch R., Gordon S., Pym A., Eiglmeier K., Garnier T., Cole S. (2000). Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 290, 143-52.

Cataldi A. y Romano M. (2007). Tuberculosis caused by Other Members of the M.tuberculosis Complex, In: Tuberculosis: From Basic Science to patient care. Palomino J.C., Leão S., Ritacco V. (Eds). (First edition). Antwerp - Sao Paulo – Buenos Aires: Emma Raderschadt.

Cosivi O., Grange J., Daborn C., Raviglione M., Fujikura T., Cousins D., Robinson R., Huchzermeyer H., de Kantor I., Meslin F. (1998). Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases* 4, 59-70.

Cousins. (1994). The Australian population: DNA typing of isolates, 1970–. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*, 3, 722–731.

de Kantor I. & Ritacco V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol* 112, 111-118.

de Kantor I. (2007). *Micobacterias*. In: *Microbiología Veterinaria*. Stanchi N., Martino P., Gentulini E., Reinoso E., Echeverría M., Leardini N., Copes J. (eds). (pp. 300-312). Buenos Aires Argentina: Inter. Médica.

Echeverría G. (2011) Determinación de la prevalencia de Tuberculosis Bovina (TBB) mediante la aplicación de NESTED-PCR, en los bovinos faenados en los camales municipales de Cayambe ( Pichincha) y Pelileo (Tungurahua)

Etchechoury I., Valencia G., Morcillo N., Sequeira M., Imperiale B., López M., Caimi K., Zumárraga M., Cataldi A., Romano M. (2010). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses Public Health*, 57(6), 375-81.

Fine A., Bolin C., Gardiner J., Kaneene J. (2011). A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Vet Med Int.* 26.

Garbaccio, S. s.f. Tuberculosis animal. 2012.

Garnier T., Eiglmeier K., Camus J., Medina N., Mansoor H., Pryor S.,

Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayer R., Keating L., Wheeler P., Parkhill J., Barrell B., Cole S., Gordon S., Hewinson R. (2003). The complete of *Mycobacterium bovis*. PNAS, 100 (13), /877-7882.

Griffin JM., Haheesy T., Lynch K., Salman MD., McCarthy J., Hurley T. (1993). The association of cattle husbandry practices environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Irlanda. Preventive Veterinary Medicine, vol.17, no. 3-4, pp. 145-160, 1993

Good M. y Duignan A. (2011). Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. Vet Med Int.

Harris N., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrell D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., RodriguezLainz A., CernekHoskins S., Rast R., Ginsberg M., Kinde H.(2007). Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. Appl Environ Microbiol, 73, 10 25–8.

Hlavsa M., Moonan P., Cowan L., Navin T., Kammerer J., Morlock G., Crawford J., LoBueP. (2008). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. Clin Infect Dis, 47(2), 168-75.

Kaneene J., Miller R., de Kantor I., Thoen C. (2010). Tuberculosis in wild animals. Int J Tuberc Lung Dis, 14 (12), 1508-12.

Kaneene J. y Pfeiffer D. (2006). Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. In; *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Thoen C., Steele J., Gilsdorf M.(Eds). (Second edition). USA: Wiley-Blackwell.

Kritski A. y Fiuza F. (2007). Tuberculosis in Adults. In: Tuberculosis: From Basic Science to patient care. Palomino J.C., Leão S., Ritacco V. (Eds). (First edition). Antwerp Sao Paulo Buenos Aires: Emma Raderschadt.

Lobue P., Enarson D., Thoen C. (2010). Tuberculosis in humans and animals: an overview. *Int J Tuberc Lung Dis*, 14(9), 1075–1078.

López L., Díaz F., vallecillo A., Esquivel H., Gutiérrez J. (2006). Tuberculosis Humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2), 173-178.

Lurie M. (1964). Resistance to tuberculosis: experimental studies in natural and acquired defence mechanisms. Cambridge, Massachusetts; Harvard University Press.

Madigan M., Mantinko J., Dunlap P., Clark D. (2009). *Biología de los Microorganismos*. (12ed.). (pp. 504-507, 1083-1086). Madrid España. Person Educacion S.A.

Martín C., Bigi F., Gicquel B. (2007). New Vaccines against Tuberculosis. In: Tuberculosis: From Basic Science to patient care. Palomino J.C., Leão S., Ritacco V. (Eds). (first edition). Antwerp - Sao Paulo - Buenos Aires: Emma Raderschadt.

Michel A., Coetzee M., Keet D., Maré L., Warren R., Cooper D., Bengis R., Kremer K., vanHelden P. (2009). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from free-ranging wildlife in South African game reserves. *Veterinary Microbiology*, 133(4), 335–343.

Murray P., Tenover J.C., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover J.C. (2007b). *Manual of Clinical Microbiology*. (9 ed.). (Vol 1). (pp. 543-588). Washington-USA: ASM Press.

O'Reilly L. y Daborn C. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, 76(1), 1–46.

OIE (World Organization for Animal Health). (2004). Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. Extraído el 24 septiembre, 2010, de <http://www.oie.int>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). Global tuberculosis control 2010. Extraído el 27 de febrero, 2011, de <http://www.who.int/tb/country/en/index.html>

Paccha D. (2012), Diagnóstico de Tuberculosis Bovina por medio de la prueba cervical comparativa en hembras bovina de la hoya de Loja.

Parrish N., Dick J., Bishai W. (1998). Mechanism of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 6, 107-12.

Palmieri O. (2001). Enfermedades Infecciosas. (pp. 296-313). Chile: McGraw-Hill-InterAmérica.

Pérez L., Milián. Suazo F., Arriaga C., Romero C., Escartín M. (2008). Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico. *Salud pública Méx*, 50(4), 286-281

Prescott L., Harley J., Klein D. (1999). Microbiología. (cuarta ed.). (pp. 803-805). España: McGraw-Hill Companies, Inc.

Proaño Pérez F., Benítez W., Celi M., Ron L., Benítez R., Portaels F., Rigout L., Linden A. (2009). Comparative Intradermal Tuberculin Test in Dairy Cattle in the North of Ecuador and Risk factors Associated with Bovine Tuberculosis. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, 81, 6, 1103-1109.

Ramos, N; Parra y Sanabria, N. 2004. Prevalencia de la tuberculosis bovina, liberación y re-certificación de hatos lecheros en Portachuelo (Prov. Sara del Dpto. de Santa Cruz). Tesis Médico Veterinario. Santa Cruz, BO. UAGRAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Consultado 4 ene. 2012. Disponible en [http://www.fcv.uagr.edu.bo/sistemabibliotecario/doc\\_tesis/JULIO%20SANABRIA-20101123-164341.pdf](http://www.fcv.uagr.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/JULIO%20SANABRIA-20101123-164341.pdf)

Ritacco V., Sequeira M., de Kantor I. (2006). Human Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in Latin America and the Caribbean. In: Diseases of swine. Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S., Taylor D. (9th ed). Ames, IA, USA: Blackwell.

Rivera S. y Giménez J. (2010). La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. Revista electrónica de Veterinaria 11(09), 1695-7504.

Román F. (2014) Prospección de tuberculosis en ganaderías lecheras y en bovinos faenados del cantón Loja.

Salazar J. y Cevallos C. (2002). Diagnóstico de la TBB (tesis). Quito: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad central del Ecuador.

Schmitt S., O'Brien D., Bruningann C., Fitzgerald S. (2002). Bovine tuberculosis in Michigan wildlife and livestock. Ann NY Acad Sci, 969, 262–268.

Scorpio A. & Zhang Y. (1996). Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med, 2, 662-7.

Sussman M. (2002). Molecular Medical Microbiology. (Vol 3). (pp. 1731-1748). San Diego – California: Academic Press.

Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K., Connell N., Kreiswirth B., Whittam T., Musser J.(1997). Proc Natl Sci USA, 94,9869–9874.

The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). (2009). Bovine tuberculosis. Extraído el 25 de Julio, 2011, de [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tuberculosis\\_bovine.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tuberculosis_bovine.pdf)

Thoen C y Barletta. (2006). Pathogenesis of Mycobacterium bovis. In; *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans.

Tortoli E. (2006). The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol. Med. Microbiol, 48,159-178.

Zumárraga M., Meikle V., Bernardelli A., Tarabla H. Romano M., Cataldi A. (2005).

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Registro de Datos

# muestra PCR	Myco bacte	Resultado PCR	Fecha	N del Propieta	Parroquia	Barrio / Sector	Telefono	msnm	Nombre Animal	Arete	Raza	Edad
1			18/02/2015	Jorge Laba	El Valle	Zalapa		2020	Blanquita		h. mestizo	5
2			18/02/2015	Jorge Laba	El Valle	Zalapa		2020	margarita		h. mestizo	6
3			18/02/2015	Jorge Laba	El Valle	Zalapa		2020	negrita		h. mestizo	4
4			19/02/2015	Jorge Laba	El Valle	Zalapa		2020	kichi		h. mestizo	6
5	Bovis	POSITIVO	19/02/2015	Jorge Laba	El Valle	Zalapa		2020	chichica		h. mestizo	4
6		POSITIVO	19/02/2015	Jorge Paez	El Valle	Zalapa		2020		179	holstein	7
7	Bovis	POSITIVO	19/02/2015	Jorge Paez	El Valle	Zalapa		2020		211	holstein	6
8			19/02/2015	Jorge Paez	El Valle	Zalapa		2020		202	holstein	6
9	Bovis	POSITIVO	19/02/2015	Jorge Paez	El Valle	Zalapa		2020		173	holstein	8
10	Bovis	POSITIVO	18/02/2015	Mario Manc	El Valle	Zalapa		2020		4215	holstein	5
11			18/02/2015	Mario Manc	El Valle	Zalapa		2020		4165	holstein	6
12	Bovis	POSITIVO	18/02/2015	Mario Manc	El Valle	Zalapa		2020		4197	holstein	6
13			18/02/2015	Mario Manc	El Valle	Zalapa		2020		4206	holstein	6
14			18/02/2015	Eduardo Rc	S Sebastian	Punzara			negra		holstein	9
15			19/02/2015	Eduardo Rc	S Sebastian	Punzara			flora		holstein	9
16	Bovis	POSITIVO	#####	Eduardo Rc	S Sebastian	Punzara			nancy		holstein	8
17	Bovis	POSITIVO	21/02/2015	Eduardo Rc	S Sebastian	Punzara			pepa		holstein	8
18	Bovis	POSITIVO	#####	Gustavo Vil	Sagrario	Zamora Huaico				102	holstein	7
19	Bovis	POSITIVO	#####	Victor Benit	Sucre	Eucaliptos			Blanca		h. mestizo	7
20	Bovis	POSITIVO	#####	Victor Benit	Sucre	Eucaliptos			Pintada		h. mestizo	4
21	Bovis	POSITIVO	#####	Victor Benit	Sucre	Eucaliptos			cacho quebrado		h. mestizo	4
22	Bovis	POSITIVO	01/05/2015	Mariano Gr	Sucre	Belen			pintada		h. mestizo	6
23			#####	Edwin Augu	El Cisne			2340		6133	h. mestizo	5
24	Bovis	POSITIVO	#####	Edwin Augu	El Cisne			2340		5766	h. mestizo	5
25			#####	Edwin Augu	El Cisne			2340		5756	h. mestizo	6
26			#####	Manuel Mur	El Cisne			2340	pintada		h. mestizo	5
27	Bovis	POSITIVO	#####	Mateo Viña	El Cisne			2340	negrita		h. mestizo	3
28			#####	Amable Cui	Chuquiribamba			2720	pintada grande		h. mestizo	7
29			#####	Amable Cui	Chuquiribamba			2720	pintada mediana		h. mestizo	6
30	Bovis	POSITIVO	#####	Amable Cui	Chuquiribamba			2720	negra pezones negros		h. mestizo	4
31		POSITIVO	11/02/2015	Rosa E Mor	Chuquiribamba			2720	pintada		h. mestizo	4
32			11/02/2015	Rosa E Mor	Chuquiribamba			2720	patita		h. mestizo	3
33			11/02/2015	Nidia P Ang	Chuquiribar	Calvario		2270	Churona Pintada		h. mestizo	4
34			11/02/2015	Nidia P Ang	Chuquiribar	Calvario		2270	Blanca		h. mestizo	4
35			#####	Agustin Rig	Chuquiribamba		9,4E+08	2720	negra	9676	h. mestizo	4
36			#####	Agustin Rig	Chuquiribamba		9,4E+08	2720	Vaca chiquita		h. mestizo	4
37	Bovis	POSITIVO	#####	Agustin Rig	Chuquiribamba		9,4E+08	2720		9679	h. mestizo	5
38			#####	Agustin Rig	Chuquiribamba		9,4E+08	2720	mocha		h. mestizo	9
39			11/03/2015	Luis Porfirio	Gualel	Palma Chiquita		2520		9535	h. mestizo	5
40			11/03/2015	Luis Porfirio	Gualel	Palma Chiquita		2520	calzada		h. mestizo	5

# muestra PCR	Mycobacte	Resultado PCR	Fecha	N del Propieta	Parroquia	Barrio / Sector	Telefono	msnm	Nombre Animal	Arete	Raza	Edad
---------------	-----------	---------------	-------	----------------	-----------	-----------------	----------	------	---------------	-------	------	------

40			11/03/2015	Luis Porfirio	Gualel	Palma Chiquita		2520	calzada		h mestizo	5
41			11/03/2015	Juan Pablo	Gualel			2520		6672	h mestizo	8
42	Bovis	POSITIVO	11/03/2015	Jose Cleme	Gualel		9,86E+09	2520	chinita		h mestizo	6
43			11/03/2015	Jose Cleme	Gualel		9,86E+09	2520	churuca		h mestizo	4
44			11/03/2015	Luis Aurelio	Gualel			2520	Churona		h mestizo	6
45			11/03/2015	Luis Aurelio	Gualel			2520	colorada		h mestizo	7
46			11/03/2015	Luis Aurelio	Gualel			2520	negra		h mestizo	6
47			11/02/2015	Edgar Villeg	Taquil	La Aguangora		2280		6912	holstein	10
48			11/02/2015	Edgar Villeg	Taquil	La Aguangora		2280	darinca		jersey	7
49			11/02/2015	Edgar Villeg	Taquil	La Aguangora		2280		6884	holstein	8
50			11/02/2015	Edgar Villeg	Taquil	La Aguangora		2280		82	holstein	4
51			#####	Juan Cham	Chantaco			2720	pintada		h mestizo	6
52			12/02/2015	Kelly Morod	Santiago	Central		2430	cacho quebrado		h mestizo	8
53	Bovis	POSITIVO	12/02/2015	Kelly Morod	Santiago	Central		2430	Amor		h mestizo	3
54			12/02/2015	Kelly Morod	Santiago	Central		2430	cachos afilados		h mestizo	6
55	Bovis	POSITIVO	12/02/2015	Kelly Morod	Santiago	Central		2430	cacho limado		h mestizo	8
56	Bovis	POSITIVO	12/02/2015	Angel Mont	Santiago	Central		2430	pintada		h mestizo	5
57			12/02/2015	Angel Mont	Santiago	Central		2430	blanca		h mestizo	8
58			12/02/2015	Angel Mont	Santiago	Central		2430	blanca loca		h mestizo	4
59			12/02/2015	Angel Mont	Santiago	Central		2430	cachona		h mestizo	3
60			12/02/2015	Angel Mont	Santiago	Central		2430	venado		h mestizo	7
61			12/02/2015	Angel Mont	Santiago	Central		2430	3 pezones		h mestizo	12
62	Bovis	POSITIVO	12/03/2015	Daniel Torre	Santiago	Barrio Central		2430		51	holstein	7
63	Bovis	POSITIVO	12/03/2015	Daniel Torre	Santiago	Barrio Central		2430		64	holstein	5
64	Bovis	POSITIVO	13/02/2015	Gonzalo Ma	Jimbilla	San Vicente		1950	guayaca		h mestizo	4
65			13/02/2015	Gonzalo Ma	Jimbilla	San Vicente		1950	sabina		h mestizo	4
66			13/02/2015	Gonzalo Ma	Jimbilla	San Vicente		1950	loca		h mestizo	4
67	Bovis	POSITIVO	13/02/2015	Gonzalo Ma	Jimbilla	San Vicente		1950	grande		h mestizo	8
68	Bovis	POSITIVO	17/04/2015	Francel Gir	Jimbilla	La chonta		1950		1356	h mestizo	3
69	Bovis	POSITIVO	17/04/2015	Francel Gir	Jimbilla	La chonta		1950	negra vieja		h mestizo	3
70			13/03/2015	Mario Jara	Malacatos	Pedregal	9,68E+08	1470		928	B S mestizo	5
71			13/03/2015	Mario Jara	Malacatos	Pedregal	9,68E+08	1470	mulata de manuel		B S mestizo	6
72	Bovis	POSITIVO	13/03/2015	Mario Jara	Malacatos	Pedregal	9,68E+08	1470	mulata de pablo		B S mestizo	4
73	Bovis	POSITIVO	13/03/2015	Felicia Gua	Malacatos	Landangui		1470		5309	B S mestizo	5
74			13/03/2015	Felicia Gua	Malacatos	Landangui		1470		8546	B S mestizo	5
75			13/03/2015	Felicia Gua	Malacatos	Landangui		1470		8548	B S mestizo	7
76			#####	Leon	San Pedro	Pilaora de Café			Pintada		h mestizo	7
77			11/03/2015	Patricio Val	vilcabamba	San Jose		1650		5911	Holstein	4
78			11/03/2015	Patricio Val	vilcabamba	San Jose		1650		5939	Holstein	8
79	Bovis	POSITIVO	11/03/2015	Patricio Val	vilcabamba	San Jose		1650		5928	Holstein	6

# muestra PCR	Mycobacte	Resultado PCR	Fecha	N del Propieta	Parroquia	Barrio / Sector	Telefono	msnm	Nombre Animal	Arete	Raza	Edad
---------------	-----------	---------------	-------	----------------	-----------	-----------------	----------	------	---------------	-------	------	------

80			11/03/2015	Patricio Val	vilcabamba	San Jose		1650		5958	Holstein	7
81	Bovis	POSITIVO	11/03/2015	Patricio Val	vilcabamba	San Jose		1650		5932	Holstein	8
82			11/03/2015	Rosa Japor	vilcabamba	San Jose		1650	vieja		h mestizo	5
83	Bovis	POSITIVO	12/02/2015	Maria Guan	San Lucas	Ciudadela	9,68E+08	2430	pintada cachona		h mestizo	11
84	Bovis	POSITIVO	12/02/2015	Maria Guan	San Lucas	Ciudadela	9,68E+08	2430	mocha dos		h mestizo	5
85			12/02/2015	Maria Guan	San Lucas	Ciudadela	9,68E+08	2430	chira		h mestizo	5
86	Bovis	POSITIVO	12/02/2015	Maria Guan	San Lucas	Ciudadela	9,68E+08	2430	pintada		h mestizo	8
87	Bovis	POSITIVO	#####	Claudio Zhu	San Lucas	Ciudadela	9,88E+08	2430	blanca		h mestizo	8
88			#####	Maria Ama	San Lucas	Ciudadela		2430	pintada un cacho		h mestizo	7
89			#####	Juan Guala	San Lucas	Ciudadela		2430	pintada		h mestizo	6
90			#####	Juan Guala	San Lucas	Ciudadela		2430	encereada		B S mestizo	4
91	Bovis	POSITIVO	#####	Juan Guala	San Lucas	Ciudadela		2430	pintada crema		h mestizo	6
92	Bovis	POSITIVO	#####	Habel Sara	San Lucas	Caña		2430		779	h mestizo	6
93	Bovis	POSITIVO	#####	Habel Sara	San Lucas	Caña		2430	cinta blanca		h mestizo	4
94	Bovis	POSITIVO	#####	Jorge Pardi	Yangana	Suro		2100		8995	p. suizo	5
95			#####	Jorge Pardi	Yangana	Suro		2100		8422	p. suizo	7
96	Bovis	POSITIVO	#####	Jorge Pardi	Yangana	Suro		2100		8420	p. suizo	7
97			#####	Orlando Va	Yangana	Suro		2100		1120	p. suizo	8
98	Bovis	POSITIVO	#####	Orlando Va	Yangana	Suro		2100		1023	p. suizo	3
99			#####	Orlando Va	Yangana	Suro		2100		1015	p. suizo	3
100			#####	Darwin Tam	Yangana	Suro		2100	blanca cacho mocho		h mestizo	6
101	Bovis	POSITIVO	#####	Darwin Tam	Yangana	Suro		2100	Jersey		Jersey	3
102	Bovis	POSITIVO	#####	Alfonso Brid	Quinara	Quinara		1570	amarilla		B S mestizo	4

## Anexo 2. Fotografías

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES**  
**RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

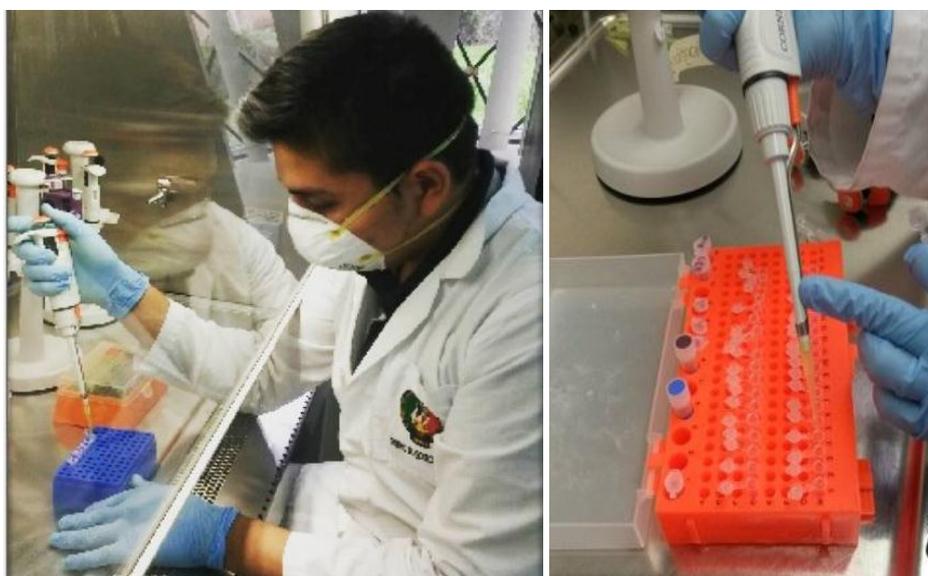
**TESIS:** “ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS BOVINAS DEL CANTÓN LOJA.”.



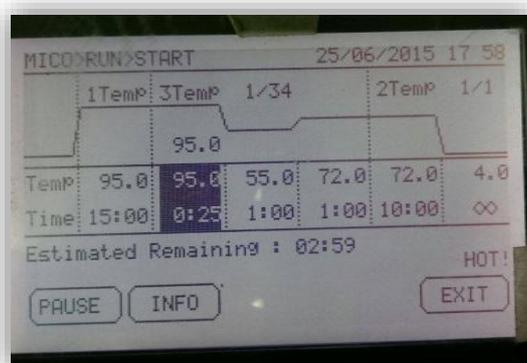
**Foto 1.** Recolección de leche en vacas en producción del cantón Loja



**Foto 2.** Kit de extracción de ADN y Cebadores RD4



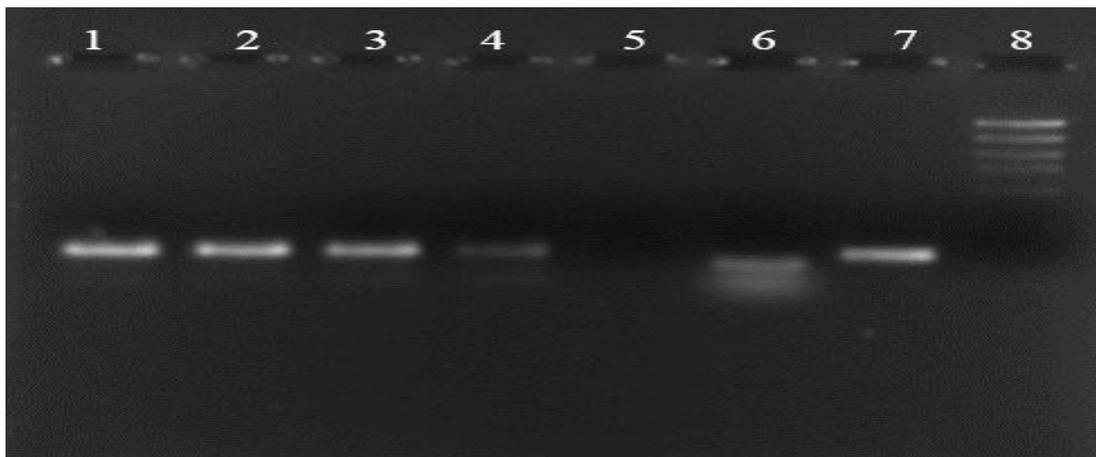
**Foto 3.** Realización de la PCR



**Foto 4.** Programación de ciclos en el Termociclador y colocación de muestras.



**Foto 5.** Realización de la Electroforesis



**Foto 6.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % para la separación de productos de PCR de la delección RD4 de cuatro muestras de leche provenientes de vacas en producción del cantón Loja. Líneas de 1-4 muestras de leche positivas a *M. bovis* con tamaño de banda correspondiente a 400pb aproximadamente. Línea 5 control negativo. Línea 6 control positivo de *M. tuberculosis*. Línea 7 control positivo de *M. bovis* variedad BCG.

## GLOSARIO

- $\mu\text{g}$ : Microgramo
- $\mu\text{L}$ : Microlitro
- $\mu\text{M}$ : Micromolar
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- BCG: Bacillus de Calmette y Guérin
- Buffer: es un compuesto que tiende a mantener una solución a pH constante
- Blue Juice: está diseñado para facilitar la carga y el seguimiento de las muestras de ADN en geles agarosa
- dNTPs: desoxiribonucleótidos trifosfato
- EDTA: Ácido Etilen-Diamino Tetracético
- Enduro GDS TOUCH: Transiluminador Ultravioleta
- g: Gravedades
- Kpb kilopares de bases
- pb: Pares de bases
- PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), reacción en cadena de la polimerasa
- ng/uL: nanogramos por microlitro
- mA: miliamperios
- $\text{MgCl}_2$ : Cloruro de Magnesio
- mM: milimolar
- RD4: Región diferencial para Mycobacterium spp.
- SYBR Safe: Utilizado en biología molecular para la identificación del ADN en gel de agarosa, reemplaza al bromuro de etidio ya que no produce efectos nocivos
- TBE (Tris-Borato-EDTA)
- U: Unidad
- UV: Ultravioleta