

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO

Tema: “Prevalencia de Tuberculosis bovina TBB mediante el uso de aislamiento microbiológico de lesiones compatibles de la enfermedad en animales faenados en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi”

Trabajo de titulación previa la obtención del
título de Ingeniera en Desarrollo Integral Agropecuario

AUTORA: Rosas Tapia Jéssica Pamela

TUTOR: Ibarra Rosero Edison Marcelo Msc.

Tulcán, 2021

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR

Certificamos que la estudiante Rosas Tapia Jéssica Pamela con el número de cédula 0401628219 ha elaborado el trabajo de titulación: “Prevalencia de Tuberculosis bovina TBB mediante el uso de aislamiento microbiológico de lesiones compatibles de la enfermedad en animales faenados en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi”

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de Titulación, Sustentación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizamos la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.

f.....

Ibarra Marcelo Msc.

TUTOR

f.....

Campos Martin Msc.

LECTOR

Tulcán, marzo de 2021

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente trabajo de titulación constituye requisito previo para la obtención del título de **Ingeniera** en la Carrera de agropecuaria de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales

Yo, Rosas Tapia Jéssica Pamela con cédula de identidad número 0401628219 declaro: que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

f.....

Rosas Tapia Jéssica Pamela

AUTORA

Tulcán, marzo de 2021

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Rosas Tapia Jéssica Pamela declaro ser autora de los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “Prevalencia de Tuberculosis bovina TBB mediante el uso de aislamiento microbiológico de lesiones compatibles de la enfermedad en animales faenados en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi” y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

f.....

Rosas Tapia Jéssica Pamela

AUTORA

Tulcán, marzo de 2021

AGRADECIMIENTO

A mis padres por ser mi guía y apoyo incondicional en días difíciles, por los innumerables esfuerzos que hicieron para poder cumplir esta meta y por ser tan valiosos en cada etapa de mi vida. A mis hermanos por estar presentes y darme ánimo. A mi abuelita por ser un pilar fundamental, por brindarme su tiempo para escucharme y brindarme sus sabios consejos, por consentirme tanto. A mi hijo Bastian por motivarme a crecer cada día, por darme la felicidad y compartir tantas risas. A Edder por apoyarme y ayudarme en cada evento.

A la Universidad Politécnica estatal del Carchi, por permitirme realizar mis estudios de tercer nivel. A la carrera de Agropecuaria, sus docentes por las enseñanzas y aprendizajes durante esta etapa.

A mi tutor Msc. Marcelo Ibarra y lector Msc. Martin Campos por la amistad, paciencia, apoyo y guía durante este trabajo de investigación.

Al Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ) por abrirme las puertas para realizar este trabajo, al Ing. Gustavo Echeverría por su gran aportación de conocimientos, ser guía durante toda la elaboración de este trabajo y un agradecimiento especial a los pasantes de los laboratorios de biología molecular y microbiología del Instituto por ayudarme en el proceso de esta investigación.

A mi familia y amigos en general que estuvieron cerca en los últimos años y de alguna u otra manera me apoyaron.

Jéssica Pamela Rosas Tapia

DEDICATORIA

A mis padres Eduardo y Sandra

A mis hermanos Verónica y Deyvid

A mi abuelita Charito

Especialmente A mi hijo, mi complemento

Bastian Sadir todo esto es por ti y para ti

Quienes me apoyaron incondicionalmente,

siendo una pieza fundamental en mi vida

para ayudarme a llegar tan lejos.

Jéssica Pamela Rosas Tapia

ÍNDICE

I.	PROBLEMA	15
1.1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.2.	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	17
1.3.	JUSTIFICACIÓN	18
1.4.	OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	19
1.4.1.	Objetivo General.....	19
1.4.2.	Objetivos Específicos	19
1.4.3.	Preguntas de Investigación	20
II.	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	21
2.1.	ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	21
2.2.	MARCO TEÓRICO	23
2.2.1	Importancia de la tuberculosis.....	23
2.2.2	Generalidades de la tuberculosis.	24
2.2.3	Clasificación Taxonómica	25
2.2.4	Características.....	28
2.2.5	Epidemiología de <i>M. bovis</i>	31
2.2.6	<i>Mycobacterium bovis</i>	34
2.2.7	Síntomas y signos.	34
2.2.8	Transmisión.	36
2.2.9	Diagnóstico.....	37
2.2.10	Prevención y control.....	43
2.2.11	Factores de riesgo	44
III.	METODOLOGÍA.....	46
3.1.	ENFOQUE METODOLÓGICO.....	46
3.1.1.	Enfoque.....	46

3.1.2. Tipo de Investigación	46
3.2. HIPÓTESIS	46
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	47
3.3.1 Definición de variables.....	47
3.3.2 Operacionalización de variables.....	47
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS	47
3.4.1 Capacitación	47
3.4.2 Toma de muestras	48
3.4.3 Transporte de muestras	49
3.4.4 Fase de laboratorio.....	49
Instructivo de preparación de medios de cultivo para micobacterias	51
Procedimiento LOWENSTEIN JENSEN.....	51
Procedimiento STONEBRINK.....	51
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
3.5.1 Muestreo aleatorio simple	56
3.5.2 Prevalencia.....	56
3.5.3 Toma de Muestras	57
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1. RESULTADOS	58
4.1.1 Inspección Veterinaria.....	58
4.1.2 Diagnóstico Bacteriológico	58
4.1.3 Diagnóstico PCR	59
4.1.3 Prevalencia de TBB según las pruebas diagnósticas utilizadas.....	61
4.1.3 Comparación de pruebas directas.....	61
4.2. DISCUSIÓN	62
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
5.1. CONCLUSIONES	68

5.2. RECOMENDACIONES.....	68
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
V. ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Modelo teórico de la envoltura de Mycobacterium. El material capsular no está representado.....	29
Figura 2 Pared celular micobacteriana.	30
Figura 3 Distribución mundial de la TBB para el año 2017 y el primer semestre del 2018...31	31
Figura 4 Estimaciones de prevalencia de TBB en Latinoamérica. En base a la positividad al PPD en bovinos.	32
Figura 5 Ubicación de las fincas positivas (rojo) y negativas(verde) en la provincia del Carchi.	33
Figura 6 ganglio pulmonar.	35
Figura 7 ganglio traqueobronquial.	35
Figura 8 Alternativas acción positiva	38
Figura 9 Inspección de lesiones de TBB	48
Figura 10 Inspección de lesiones de TBB	48
Figura 11 ganglio pulmonar.	49
Figura 12 Inspección veterinaria.	49
Figura 13 Procesamiento de muestras-cámara de flujo laminar.....	50
Figura 14 procesamiento de muestras- vortex.....	50
Figura 15 cultivo en medio Stonebrink.	52
Figura 16 proceso de incubación.....	52
Figura 17 Tinción Zielh Neelsen.....	53
Figura 18 Fórmula prevalencia.....	56
Figura 19 Electroforesis en gel de agarosa 2%, M. bovis	60
Figura 20 Electroforesis en gel agarosa 2%, MNT.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación Taxonómica	25
Tabla 2 Clasificación de especies pertenecientes al género Mycobacterium.....	26
Tabla 3 Sensibilidad y especificidad de la tuberculina.....	38
Tabla 4 Detección de micobacterias en diferentes hospedadores y tejidos por PCR de captura de secuencia de ADN.	41
Tabla 5 Operacionalización de variables.....	47
Tabla 6 Bandas de identificación y secuencia de primers utilizados para el master mix.....	54
Tabla 7 Reactivos utilizados para el master mix	54
Tabla 8 Parámetros ingresados en el termociclador	55
Tabla 9 Resultados de diagnóstico mediante inspección veterinaria.....	58
Tabla 10 Resultados de diagnóstico bacteriológico a inspección pos-mortem	58
Tabla 11 Resultados de diagnóstico molecular de muestras positivas a bacteriología.....	59
Tabla 12 Bandas de identificación de PCR multiplex para M. bovis.....	59
Tabla 13 Prevalencia de TBB.....	61
Tabla 14 Comparación de pruebas diagnósticas directas para M. bovis.....	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado o Acta del Perfil de Investigación.....	79
Anexo 2: Certificado del abstract por parte de idiomas	80
Anexo 3: Palpación de lesiones compatibles.....	81
Anexo 4: Inspección Veterinaria.....	81
Anexo 5 Inspección de lesiones compatibles.....	82
Anexo 6 Incubación de muestras.....	82
Anexo 7 Cultivo Stonebrink.....	83

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la prevalencia del *Mycobacterium bovis*, se realizó un muestreo aleatorio simple. Para este proceso se llevó a cabo 3 etapas: la primera fue realizar la inspección de lesiones visibles compatibles con tuberculosis bovina, en el centro de faenamiento de Tulcán, provincia del Carchi, la segunda fue realizar el cultivo de las muestras de lesiones en los laboratorios del Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador (UCE) y como tercera etapa se realizó el diagnóstico e identificación del *M. bovis* para esto se empleó la técnica molecular (PCR). En total fueron 289 bovinos examinados mediante inspección macroscópica *post-mortem*, de la cual se obtuvo un porcentaje de prevalencia de lesiones compatibles con la enfermedad de 43,25% (125/289). Mediante el cultivo bacteriológico realizado en medio sólido Stonebrink y con tinción Ziehl-Neelsen de las muestras recolectadas se determinó una prevalencia de *M. bovis* de 2,77% (8/289) y mediante diagnóstico de PCR empleando el fragmento RD9 y RD1 se obtuvo una prevalencia de 1,73% (5/289) logrando confirmar la presencia de *M. bovis* en el centro de faenamiento del cantón Tulcán.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, lesiones compatibles, cultivo bacteriológico, PCR.

ABSTRACT

In order to determine the prevalence of *Mycobacterium bovis*, a simple random sampling was carried out. For this process, 3 stages were performed: the first was to develop the inspection of visible lesions compatible with bovine tuberculosis, in the Tulcán slaughterhouse, Carchi province. The second was to execute the culture of the lesion samples in the laboratories of the Zoonosis Research Institute (CIZ) of the Central University of Ecuador (UCE) and as a third stage the diagnosis and identification of *M. bovis* was carried out, for this the molecular technique (PCR) was used. In total, 289 cattle were examined by post-mortem macroscopic inspection, from which a prevalence percentage of lesions compatible with the disease of 43.25% (125/289) was obtained. By means of the bacteriological culture carried out in solid Stonebrink medium and with Zielh Neelsen staining of the collected samples, a prevalence of *M. bovis* of 2.77% (8/289) was determined and by means of PCR diagnosis using the RD9 and RD1 fragments, a prevalence of 1.73% (5/289), confirming the presence of *M. bovis* in the slaughterhouse of the Tulcán canton.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, compatible lesions, bacteriological culture, PCR.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una importante enfermedad zoonótica a nivel mundial (CRESA, 2015), es causada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), esta enfermedad genera pérdidas económicas (OIE, 2019), en la producción de leche, carne y su comercialización, debido a que los países que se encuentran libres de tuberculosis, importan solamente ganado bovino de aquellos países cuya prevalencia de la enfermedad no representa riesgo sanitario o estén libres de tuberculosis (Roa, 2015). Los bovinos resultan ser el principal reservorio de *M. bovis* y una gran fuente de infección para los humanos, también afecta a algunos animales domésticos y cierta población silvestre; produce un deterioro del estado general de salud, causando a la larga la muerte (OIE, 2019). En Sudamérica la infección tuberculosa podría superar los 4 millones de cabezas de ganado, siendo el *M. bovis* el causante del 90% de esta infección y en los humanos llegando a provocar el 2 al 8% de infección. (Roa, 2015).

La principal vía de infección de la tuberculosis bovina es la vía aerógena, donde cerca del 80-90% del ganado es infectado por inhalación y la vía de eliminación puede ser la leche, orina o heces por las que se contamina el resto del hato e incluso los seres humanos (Phillips et al., 2003; citado en Quinotoa & Chicaiza, 2013), la transmisión de la enfermedad a los seres humanos es mediante el consumo de leche cruda o la elaboración artesanal de productos derivados de la leche y también por estar expuesto a las excreciones de los animales enfermos (CRESA, 2015). La TBB produce lesiones visibles en distintas zonas del cuerpo, principalmente en pulmones y ganglios linfáticos formándose granulomas nodulares conocidos como tubérculos (Ramos, 2017).

Las pérdidas económicas nacionales debidas a TBB no se pueden calcular con precisión por la falta de datos estandarizados. Sin embargo, en el cantón Mejía se estima aproximadamente \$ 460 000 por año. Esta estimación se basa en la prevalencia real determinada en 2008 por el CITT (comparative intradermal tuberculin test) y datos oficiales sobre la población bovina de este cantón: aproximadamente 55 000 cabezas de ganado distribuidas en 2 722 rebaños. Se consideraron tres factores importantes para estimar las pérdidas económicas causadas por el ganado afectado: disminución de la producción de leche (13%), pérdida de peso (36%) y disminución de la tasa de reproducción (12%). Sin embargo, la expropiación de los canales no

se tuvo en cuenta para este cálculo porque los bovinos sospechosos de TBB no se descartaron completamente (Proaño-Pérez F et al.,2011).

En Ecuador existe el plan de contingencia nacional que siguen los ganaderos de manera voluntaria, en donde si un animal es positivo a TBB, el animal debe ser inmediatamente faenado, es por esta razón que los ganaderos evitan notificar a las autoridades respectivas de que haya presencia de esta enfermedad, por miedo a las pérdidas y las limitaciones que causa a la finca (Ramos, 2017). Para obtener el Certificado de predios libres de TBB, el ganadero debe realizar un examen clínico con la prueba de tuberculinización que tiene resultado a las 72 horas después de haberla inyectado en el pliegue ano-caudal, y la interpretación se basa en la observación que debe realizarla el mismo operador, este trámite solicitan voluntariamente los propietarios del predio, para lograr la certificación oficial en donde se encuentre garantizado que bovinos y subproductos no sean riesgo para la salud humana (AGROCALIDAD, 2020); la prueba simple de tuberculina puede ocasionar falsos negativos debido a la existencia de infecciones causadas por otras micobacterias diferentes al *M. bovis*, sin embargo, Rivera P., et.al., (2009) indica que la enfermedad en algunos casos presenta patrones de respuesta inmunitaria y cada uno se caracteriza por respuestas exclusivamente celulares, humorales o mixtas, llegando hasta la no respuesta o anergia, que se determina haciendo un diagnóstico con pruebas de laboratorio con mayor especificidad.

La baja especificidad de las pruebas de tuberculina no permite detectar el agente causal de la TBB, sin embargo, existe diferentes investigaciones con pruebas moleculares que han permitido identificar la genética de la especie de micobacterias. Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, los objetivos que se plantearon para la realización de este trabajo permitieron las inspecciones y posteriormente el aislamiento del *M. bovis* obtenido de bovinos del camal de Tulcán. Para alcanzar estos objetivos se utilizaron técnicas de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) utilizando el fragmento RD9 y RD1 para la detección de *M. bovis* y *M. tuberculosis* con la finalidad de reconocer el agente causal para facilitar los datos a programas de salud animal y humana favoreciendo así el control de esta enfermedad ya que por la falta de datos estandarizados se dificulta hacer control.

I. PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Zumárraga M., et al, (2005) manifiesta que la tuberculosis bovina (TBB) es una importante zoonosis que se encuentra en todo el mundo, afectando más al ganado bovino en gran parte de América del Sur (citado en Echeverría, 2011). El agente causal de la tuberculosis en bovinos es *M. bovis* (OIE, 2019), perteneciente al género *Mycobacterium* que agrupa más de 120 especies, la gran parte son ambientales y no patógenas, conocidas como micobacterias no tuberculosas (MNT) y el complejo *M. tuberculosis* (MTBC), conformado por: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canetti* (Lawn SD, Zumla Al., 2011), teniendo el inconveniente que para muchas provincias del Ecuador y en especial la provincia del Carchi no se ha identificado el agente causal debido al desconocimiento o falta de capacitación del personal de faenamiento, así como también la falta de infraestructura de laboratorio para el diagnóstico bacteriológico y molecular.

El origen de la TB data en Egipto en los años 3700 a.C, convirtiéndola en una de las enfermedades más antiguas (Méndez, 2011), los primeros hallazgos se encontraron en momias pertenecientes a la predinastía egipcia y en restos humanos ubicados en Suecia e Italia (Cartes, 2013). En América latina, la TB se cree que los migrantes europeos introdujeron la enfermedad, sin embargo, fue encontrado ADN de *M. tuberculosis* en momias situadas en el Perú, llegando a la conclusión que existió desde la era Precolombina (Méndez, 2011).

En Europa a finales del siglo XVIII la epidemia alcanzó su máximo apogeo (Cartes, 2013), mientras tanto en América del Norte y del Sur sucedió a finales del siglo XIX (M. C. Bermejo, et. al, 2007). A pesar de que esta enfermedad afectó a muchas personas de la sociedad europea, la tuberculosis no fue descifrada sino hasta el siglo XIX por el médico anatomopatólogo francés René Laennec (1781-1826), con su un instrumento denominado estetoscopio, permitió realizar la auscultación a los pacientes, con la ayuda de este aparato Laennec logra describir diferentes enfermedades torácicas siendo una de ellas, la tuberculosis (Cartes, 2013). El 24 de marzo de 1882 Robert Koch presenta sus primeros hallazgos de *M. tuberculosis* ante la sociedad de Fisiología de Berlín (Méndez, 2011). Theobald Smith aisló por primera vez el *M. bovis* en el año de 1898 *bovis* (Mantilla G., et. al, 2014), donde demostró que la tuberculosis humana y la bovina eran causadas por dos organismos diferentes (OIE, 2019), por las características de los

cultivos y su diferente patogenicidad, del cual en 1970 toma el nombre de *M. bovis* (Mantilla G., et. al, 2014).

La tuberculosis bovina se encuentra distribuida a nivel mundial, la prevalencia varía de acuerdo a los diferentes países. En algunos de los países más desarrollados esta enfermedad se encuentra erradicada o en una fase final de erradicación y en algunos de los países en desarrollo sigue siendo una enfermedad endémica. Llega a causar aproximadamente una disminución del 10 al 20% de la producción lechera y cárnica y un 5% en la capacidad reproductiva de los rebaños (Romero, 2010), también ocasiona considerables pérdidas económicas y graves consecuencias en la salud pública especialmente en países con programas de vigilancia deficientes o que carecen completamente de ellos, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reconoce que esta es una grave enfermedad infecciosa, proponiendo así el control de TBB mediante un interfaz entre ecosistema, animales y seres humanos de suma importancia para la industria ganadera y la salud pública (FAO, 2012).

La población de algunos países aún ingieren leche cruda o no hervida, mientras que, en otros países pertenecientes a África y Asia, el consumir leche hervida ha protegido a la población de TBB, sin embargo, algunos productos lácteos pueden llegar a constituir una fuente de infección de *M. bovis* (Kleeberg, 1984). En regiones donde la higiene alimentaria es aplicada con coherencia, el riesgo para el público en general se ha reducido; sin embargo, la infección por la tuberculosis bovina sigue resultando un riesgo para profesionales que se dedican a la ganadería, trabajadores de mataderos, productores de derivados de leche y carniceros (OIE, 2019).

En América Latina, la TB humana y bovina es considerada un problema de difícil erradicación (López, et al.,2006), el número estimado de casos de tuberculosis en humanos en el 2008 fue de 282 000 siendo el agente causal *M. tuberculosis* y un número menor causado por *M. bovis*, la mayoría de casos fueron confirmados mediante frotis microscópico, esta tecnología es rápida, de bajo costo permitiendo fácilmente la detección de infecciones pulmonares, sin embargo, no se puede diferenciar las especies (I. N. de Kantor, P. A. LoBue, C. O. Thoen, 2010), por lo que es importante el uso de técnicas más específicas como es el cultivo bacteriológico y técnicas moleculares que permitan solucionar este acometido.

En América Latina el concepto de eliminar todo animal positivo a una prueba de tuberculina en la práctica pocas veces se cumple, esto podría depender principalmente de las políticas de

Estado y la colaboración del productor (Gil & Samartino, 2000 citado en Cushicóndor, 2014). El limitado uso de pruebas de laboratorio y la falta de inspección *post-mortem* ha dificultado aplicar un sistema de control de la enfermedad y de la vigilancia epidemiológica (Proaño-Pérez, *et al.*, 2011), sin embargo, en los últimos años se ha intensificado la vigilancia epidemiológica en faena en mataderos y frigoríficos en algunos países de América Latina, sobretodo en Argentina y Brasil que son los países que más producen carne (Kantor, *et al.*, 2012).

Cushicóndor, (2014) manifiesta que, en el Ecuador, el incremento de cabezas de ganado de 3,6% para el año 2011, en la región sierra del país, probablemente, sea una causa que favorece a que la infección por *M. bovis* se encuentre en mantenimiento y propagación, debido al contacto directo. Además, la enfermedad no cuenta con registros adecuados de los animales positivos a las diferentes pruebas *ante-mortem* y *post-mortem*, para realizar una correcta trazabilidad del ganado afectado hasta la explotación de origen y su posterior control. En Ecuador, para el cantón Mejía, provincia de Pichincha, la prevalencia es de 7,13% en fincas grandes y una incidencia de 1,70% (Proaño-Pérez F., *et. al.*,2009).

Un estudio realizado en el año 2013 en tres provincias de la Sierra: Cotopaxi, Carchi e Imbabura, con la prueba ano-caudal simple, se encontró una prevalencia de 1% en las tres provincias, en donde fueron analizadas 131 fincas y 1323 animales. La prevalencia de fincas rectoras fue de 8,47 % Cotopaxi, 3,57% en Carchi y 4,55% en Imbabura. La prevalencia de animales positivos fue de 4,07% en Cotopaxi, 0,37% en el Carchi y 2,02% en Imbabura (Quinotoa Ivan & Chicaiza Juan , 2013), sin embargo, no se hizo un seguimiento a estos animales con diagnósticos que permitan confirmar si la infección de tuberculosis es causada por *M. bovis*, causando problemas para la eficiente erradicación de esta zoonosis, debido a la presencia de reactores positivos que podrían haber sido falsos positivos, por una reacción inespecífica a infecciones anteriores por *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis*, agentes que se encuentran en el medio ambiente (Flores F.; *et.al.*, 2005).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La creciente prevalencia de tuberculosis bovina en la provincia del Carchi y la no identificación del agente causal dificulta diseñar programas de control y erradicación eficientes para esta zoonosis?

1.3. JUSTIFICACIÓN

En 2018, 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis de las que 1,5 millones murieron, la incidencia de TB se ha reducido en los últimos años, en un promedio de 2% anual, gracias al diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad (OMS, 2019), aunque la cepa del *M. bovis* no es el principal causante de la tuberculosis en el hombre, si no *M. tuberculosis*, esta enfermedad puede ser adquirida por ingerir leche cruda de animales infectados o al inhalar gotículas infectivas (OIE, 2019), con poca frecuencia se transmite a través de consumo de carne contaminada mal cocida o cruda (WHO, FAO,OIE, 2017). Sin embargo, algunos países han reportado que hasta un 10% de TB humana es causada por *M. bovis* (CRESA, 2015), estando la mayoría de los casos relacionada con grupos de riesgo que se dedican a las tareas rurales (Canal, 2013). A pesar de que en algunos países se ha logrado controlar la enfermedad, la situación se ha agravado por la aparición de cepas de *M. bovis* multirresistentes a antibióticos y conjuntamente con la diseminación del virus causante del VIH (Abalos P., Retamal P., 2005).

La falta de vigilancia o registros de esta enfermedad causa el desconocimiento de la prevalencia real en el país, “la importancia de conocer el proceso o historia natural de una enfermedad es que durante el proceso se puede introducir tratamientos con el objetivo de intervenir y modificar el curso natural de la enfermedad” (Núria, 2020). El conocer el agente causal de esta enfermedad permite tener registros para mejorar el control o erradicar totalmente la TBB, esto puede ser posible implementando la técnica de cultivo bacteriológico que aísla los BAAR (bacilo ácido alcohol resistentes) presentes en una muestra en cantidad suficiente como para identificarlos por métodos bioquímicos, toda vez que sea necesario (Barrera, 2008), por otra parte el diagnóstico mediante PCR permite amplificar un fragmento de ADN a partir de una muestra mínima, con una sensibilidad y especificidad muy alta encontrando con mayor facilidad y rapidez el agente causal (Terreno, 2014) permitiendo obtener resultados en horas a diferencia del cultivo que puede tomar meses de crecimiento (Estrada-Chávez, *et. al.*, 2004).

Con esta información acerca de la TBB se evidenció la necesidad de realizar este estudio *post-mortem* en el camal de la ciudad de Tulcán, este método permite identificar a los animales afectados, mediante palpación e inspección de pulmones y ganglios linfáticos asociados (Proaño-Pérez; *et. al.*,2011), es necesario tener información de prevalencia local, actualmente esta información se encuentra en investigaciones de tesis de pregrado que han sido realizadas con la prueba de tuberculina ano-caudal, resulta preocupante no tener datos de prevalencia del

agente causal en la provincia ya que no se puede realizar el control de la enfermedad, impidiendo hacer el seguimiento a las fincas que poseen animales enfermos. Mediante la inspección veterinaria se obtiene muestras de las partes calcificadas por esta enfermedad siendo en este caso las lesiones granulomatosas. Para el crecimiento de estas bacterias se requiere de un medio de cultivo y tinción diferente a los que habitualmente se emplea para bacterias, ya que su crecimiento es muy lento teniendo un promedio de 6 a 8 semanas, se debe realizar una buena descontaminación en las muestras con el fin de destruir otro tipo de bacterias con un periodo más rápido de crecimiento. Para identificar que la infección de tuberculosis es por la bacteria *M. bovis* se utilizó la prueba de PCR que presenta sensibilidad y especificidad para la detección de esta bacteria (Echeverría, 2011), la obtención de cepas y su tipificación permite dar seguimiento a la enfermedad y observar su propagación especialmente en la venta de animales a diferentes zonas del país.

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Determinar la prevalencia de tuberculosis bovina mediante métodos de diagnóstico de inspección microbiológica *post mortem*, cultivo bacteriológico y PCR en ganado bovino faenado en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Inspeccionar lesiones compatibles de TBB en el camal de Tulcán, provincia del Carchi.
- Establecer la prevalencia de TBB mediante inspección *post-mortem* de tejidos lesionados compatibles con la TBB y cultivo bacteriológico en ganado bovino faenado en el camal de Tulcán, provincia del Carchi.
- Identificar mediante técnicas moleculares las cepas de *Mycobacterium* de los cultivos bacteriológicos positivos.

1.4.3. Preguntas de Investigación

- ¿Qué tipos de lesiones son compatibles con la TBB en el camal de Tulcán?
- ¿Cuál es la prevalencia microbiológica TBB en ganado bovino faenado en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi?
- ¿Cuál es la cepa de *Mycobacterium* circundante en bovinos faenados en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi?

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Paillacho en el año 2015, en su investigación de prevalencia de tuberculosis y sus factores de riesgo en la parroquia Santa Martha de Cuba, provincia del Carchi, realizando con el método de Tuberculinización Cervical Comparativa determino una prevalencia en bovinos de 0,54%, (2/368) y la prevalencia en UPAs es de 6,6 %, (2/30) con al menos un animal reactor. Los factores de riesgo observados son: movimientos pecuarios, compra de animales en lugares con estado sanitario desconocido, ingresos involuntarios de animales externos, deficientes condiciones higiénicas de infraestructura, origen del agua de bebida, y la presencia de hospederos tanto domésticos como silvestres. Paillacho recomendó sacrificar los animales positivos a la prueba de tuberculina, para dar un control y evitar que se siga propagando la enfermedad, sin embargo, los animales positivos de esta investigación no fueron sacrificados.

Quinotoa I., & Chicaiza J., en el año de 2013 indican en su investigación realizada en las provincias de Cotopaxi, Carchi e Imbabura el análisis de los factores de riesgo y prevalencia de tuberculosis bovina por medio del modelo estadístico bayesiano, con la prueba de tuberculinización ano-caudal simple, teniendo como resultado de prevalencia 4,57% en Cotopaxi, 0,37% en el Carchi y 2,02 % en Imbabura, de los cuales se identificaron como factores de riesgo a la edad, sexo al tamaño de fincas, altitud, tipo de producción, introducción de otros animales rumiantes, densidad poblacional, y si los animales fueron previamente tuberculinizados.

Cushicóndor, (2014) en su investigación de prevalencia de TBB en el Matadero Municipal del Cantón Mejía, provincia de Pichincha, indica que fueron examinados 395 animales mediante inspección veterinaria, haciendo una inspección macroscópica post-mortem (IP), obteniendo una prevalencia aparente de lesiones compatibles con la enfermedad de 1,01% (4/395; IC95%: 0,28% – 2,57%). Por otra parte, para corroborar la presencia de TB, realizó el cultivo bacteriológico, de las muestras de tejido colectadas de los 395 animales, obteniendo una prevalencia aparente de *M. bovis* de 1,52% (IC95%= 0,56% – 3,28%), logrando confirmar el microorganismo en una de las lesiones encontradas. Al analizar los factores biológicos y de procedencia en relación con las lesiones visibles positivas y de *M. bovis*, no se logró determinar

que la edad, el biotipo, el sexo y la procedencia de los animales fueran factores para presentar lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad o *M. bovis*.

Roa Junior, (2015) en su investigación de prevalencia de tuberculosis bovina en la ciudad de Loja utilizó el método de extracción de ADN a partir de muestras de leche de hembras bovinas, con 102 extracciones de ADN con el Kit Pure Link Genomic DNA miniKit, (Invitrogen) por medio de la reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR). Empleando dos controles positivos: la cepa de *M. bovis*, proveniente de la vacuna BCG y una cepa de *M. bovis*, proveniente de colonias de orina de humanos infectados. Los resultados de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5%, dando como resultado que el 43,13 % (44/102) de las muestras resultaron positivas a *Mycobacterium spp.*

Proaño Pérez, (2011) en su investigación en el cantón Mejía, la realizó en diferentes etapas en donde la primera etapa fue en 2003 donde las fincas fueron clasificadas en 3 categorías según su tamaño dando como resultado: en las fincas grandes, el 7,95% de los bovinos respondió positivamente a las pruebas cutáneas, mientras que en las categorías 2 y 3, respectivamente, el 4,24% y el 0,30% de los bovinos reaccionaron positivamente.

Para la segunda etapa se investigaron más de 2.000 reses de 20 rebaños. En el transcurso del año 2007 y 2008, mediante la prueba de tuberculinización intradérmica comparativa, resultó una prevalencia de TBB: 0,27% y 0,57% en hatos medianos y 8,63% y 8,43% en hatos grandes respectivamente a cada año 2007 y 2008. El tamaño del hato ha sido claramente identificado como un factor de riesgo para la tuberculosis bovina, como lo es la edad del ganado, el posible contacto con otras especies animales y la introducción de nuevo ganado en la granja. Un tercer estudio se realizó en un matadero en el cantón Mejía con 1390 bovinos sacrificados durante un período de dos años. Se detectaron un total de 33 bovinos con lesiones macroscópicas sospechosas, que representan el 2,3% y el 2,4% de los animales inspeccionados en 2007 y 2008.

Orbe R, (2019) en su investigación de prevalencia y factores de riesgo asociados a la TBB en haciendas ganaderas pertenecientes al Centro Agrícola de la parroquia de Tulcán, cantón Tulcán, utilizó las pruebas de tuberculina ano-caudal simple y para la confirmación de animales reactivos y sospechosos aplicó la prueba de tuberculina comparativa, la información de prevalencia y su asociación a factores de riesgo se estableció mediante la prueba de chicuadrado. La prevalencia encontrada fue de 1,05% a nivel de animales (4/380) y a nivel de

datos de 16% (4/24), los factores de riesgo encontrados en esta investigación fueron la procedencia del agua brindada a los animales y el movimiento pecuario.

Ortega E., (2014) en su investigación de evaluación del tipo de tejido y medio de cultivo como parámetros determinantes en el aislamiento de *Mycobacterium* spp., con 25 animales positivos a *Mycobacterium* spp. previamente diagnosticados por cultivo *in vitro*, de un pool de biopsias de cada animal; consistió en la siembra de tres muestras por separado: pulmón, ganglio traqueobronquial y ganglio mediastinal, en cuatro repeticiones de dos medios de cultivo: Löwenstein-Jensen (LJ) y Stonebrink (ST), obteniendo 43 aislamientos diferentes que se caracterizaron mediante: morfología, tiempo de crecimiento, pigmentación y pruebas bioquímicas (Niacina y NaCl), y se identificaron por PCR, determinando: 21/43 como *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) y 22/43 como micobacterias ambientales (MNT).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1 Importancia de la tuberculosis.

La tuberculosis es una de las primeras enfermedades reportadas, se estima que su antigüedad es de 15.000 y 20.000 años, el microorganismo que la originó evolucionó de microorganismos primitivos del género *Mycobacterium*, se cree que en el momento de evolucionar una micobacteria, saltó la barrera biológica por presión selectiva, y pasó a tener un reservorio en animales, por lo que probablemente dio origen al *M. bovis*. El paso del *M. bovis*, al hombre se dio mediante la domesticación de los animales (SENASA, 2019).

Actualmente la tuberculosis se encuentra en todo el mundo, en el 2012, 49 países notificaron casos de tuberculosis bovina (OIE, 2013), aproximadamente más de 50 millones de bovinos se encuentran infectados con tuberculosis, con una estimación de 3 mil millones de dólares en pérdidas económicas (Ramos, et. al, 2004; Ortega E., 2014). En América latina especialmente en ganado lechero, existe aproximadamente 374 millones de bovinos con tuberculosis, sin embargo, no existe medidas de control en todos los países (de Kantor I. & Ritacco V., 2006).

En Ecuador se realizan pruebas de tuberculina en ganado lechero y carne, pero no hay datos específicamente de todo el país, la prevalencia que se obtiene son debido a estudios que realizan

tesistas con la tuberculina-testing y que, mediante esta prueba, se puede controlar una parte de animales infectados (Freddy Proaño-Pérez, et. al.,2011; Ortega E., 2014)

2.2.2 Generalidades de la tuberculosis.

“La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad crónica e infecciosa, provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)” (Panvet, 2008), que tiene relación con las bacterias que causan la TB en humanos y en aves. En algunos caso llega a afectar a los mamíferos, deteriorando su salud, principalmente causando tos y con el tiempo la muerte (OIE, 2019). La TBB ataca principalmente a ganado bovino pero en ocasiones el hombre está involucrado y se puede contagiar, por lo que resulta una amenaza para la salud pública de Ecuador (Herrera, 2011).

Se atribuye el nombre de “tuberculosis” debido a la formación de nódulos en los ganglios linfáticos del animal infectado, llamados “tubérculos” (OIE, 2019), cualquier parte del cuerpo puede ser afectado, sin embargo, Proaño, (2005) explica que “se observa con más frecuencia lesiones en nódulos linfáticos de cabeza, tórax, pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo”. Los animales domésticos fueron atacados por esta enfermedad en todo el mundo, esto sucedió hasta los años veinte, donde empezaron a aplicarse medidas de control en los países desarrollados. Hoy en día, la TBB sigue atacando principalmente al ganado bovino y la fauna salvaje (OIE, 2019).

Esta enfermedad ataca específicamente al tracto respiratorio, por lo que se considera que el contagio es producido por vía aerógena, al inhalar partículas donde se encuentra *M. bovis*, el animal sano puede contagiarse al compartir los bebederos o la sala de ordeño, por otra parte, se encuentra la vía de contagio oral, que puede suceder al compartir el pasto y demás alimentos que se encuentren contaminados (Ramos, 2017). Los animales que resultan más propensos a contagiarse son los que tienen poca edad y especialmente las hembras debido a que pasan por factores estresantes como la preñez avanzada, la preñez y producción lechera (Orbe, 2019).

Tiene un gran impacto en la salud pública debido a que es una enfermedad zoonótica, una persona se puede contagiar por el consumo de leche cruda de animales infectados, por esta razón es obligatorio notificar a la Organización Mundial de la Sanidad (OMS), para evitar la comercialización de productos pecuarios de animales infectados. Es causante de varias pérdidas

económicas a los productores, debido a que causa reducción en la producción lechera hasta en un 20 %, la carne es depreciada debido a los códigos sanitarios, la demonización del animal sin ninguna remuneración (Ramos, 2017).

2.2.3 Clasificación Taxonómica

El *M. bovis* pertenece al género *Mycobacterium*, cuando este apareció se conocían dos especies: el bacilo que causaba la lepra *Mycobacterium leprae* y el bacilo tuberculoso o *M. tuberculosis* (Rodríguez, 2008). En la actualidad existe 120 tipos diferentes de micobacterias, su pared celular tiene alto contenido en lípidos por lo que las convierte en bacterias ácido-alcohol resistentes, esto impide a la anilina que su colorante no las penetre, por lo que no se puede observar claramente la tinción Gram, por lo que para una visualización más clara se utiliza arilmetanos que son colorantes especiales (González, 2013).

Estas micobacterias tienen la capacidad de permanecer con vida en objetos inanimados que estén libres de exposición solar por varias semanas, en comparación a otras bacterias que no forman esporas, estas son más resistentes a desinfectantes como fenol y cresoles, álcalis (I. Dorronsoro, L. Torroba, 2007), toleran el PH ácido por lo que resiste a la destrucción en el interior de los macrófagos en el interior del huésped (Gómez, 2009), también resiste a la desecación y congelación, pero una vez expuestas ante la luz ultravioleta y calor a menos de 65°C por 30 minutos, estas bacterias se inactivan (I. Dorronsoro, L. Torroba, 2007).

Tabla 1 Clasificación Taxonómica

Reino:	BACTERIA
Filum:	ACTINOBACTERIA
Clase:	ACTINOBACTERIDAE
Orden:	ACTINOMYCETALES
Familia:	Mycobacteriaceae
Género:	<i>Mycobacterium</i>
Especie:	<i>M. bovis</i>

Fuente: Ortega E., (2014).

El género *Mycobacterium* debido a la existencia de varias especies fue dividido en dos grupos: complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) y micobacterias no tuberculosas o atípicas

(MNT) (Ortega E. , 2014), estas últimas son micobacterias no patógenas, se encuentran en el agua y sus sistemas de conducción, algunos alimentos, en la leche y algunos animales, estas bacterias son causantes de algunas infecciones en los humanos y a pesar de que no se trasmite de personas a persona se supone que su colonización puede ser ambiental, afecta más a las personas que son inmunodeficientes incluso puede llegar a causar la muerte (Gómez, 2009).

Tabla 2 Clasificación de especies pertenecientes al género *Mycobacterium*.

CLASIFICACIÓN	GRUPO	CARACTERÍSTICAS	PIGMENTO	ESPECIES
COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)	I	No cromógenas Colonias rugosas o lisas Crecimiento lento (14-21 días)		<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. bovis BCG</i> <i>M. microti</i> <i>M. africanum</i> <i>M. pinnipedii</i> <i>M. canetti</i> <i>M. caprae</i> <i>M. mungi</i>
		Fotocromógenas Colonias rugosas Crecimiento lento (14-21)	Cristales amarillos de caroteno Rosa-rojo	<i>M. intermedium</i> <i>M. buckleii</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. lycopinogenes</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. lactis</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. bohemicum</i> <i>M. lentiflavum</i>
MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT)	II	Escotocromógenas Colonias lisas Crecimiento lento (10-14 días)	Amarillo-naranja	<i>M. tusciae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. ulcerans</i>
	III		Irregular	<i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i> <i>M. avium</i> <i>M. celatum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. terrea</i> <i>M. heidelbergense</i> <i>M. monochromogenicum</i>
	IV	No cromógenas Crecimiento lento (14-21 días)		<i>M. malmoense</i> <i>M. triples</i> <i>M. braderii</i> <i>M. triviale</i> <i>M. marium</i> <i>M. novocastrense</i>

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT)		crecimiento rápido (5-7 días)	Rosa_rojo	<i>M. chelonae</i> <i>M. piscium</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. thamnopheo</i> <i>M. acapulcense</i> <i>M. rhodochrou</i> <i>M. aurum</i> <i>M. duvalli</i> <i>M. gadicum</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. obuense</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. tokaiense</i> <i>M. hassiacum</i>
	V	Escotocromógenas crecimiento rápido	Amarillo- naranja	<i>M. phlei</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. goodii</i> <i>M. wolynski</i> <i>M. diaernhoferi</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. graminis</i> <i>M. lactiola</i> <i>M. thermorecictible</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. austroafricanum</i>
			Irregular	

Fuente: Ortega E., (2014).

2.2.3.1 Especies

El nombre de *Mycobacterium* significa bacilo semejante a un hongo, estas bacterias forman filamentos ramificados similares a micelios (Onofre, 2016), las especies que pertenecen a MTBC son las causantes de la tuberculosis en los mamíferos, el agente principal de la tuberculosis zoonótica es *M. bovis* (Pedro N. Acha y Boris Szyfres, 2001); las nueve especies pertenecientes tienen sus respectivos huéspedes: *M. tuberculosis* (humanos y algunos primates), *M. bovis* (ganado bovino y en otros animales como los búfalos, alces y venados), *M. bovis* BCG (derivado atenuado de la cepa de *M. bovis* como vacuna preventiva en humanos) (González, 2013), *M. orygis* (en oris, gacelas, venados, antílopes, búfalos) (Rahim J., et. al., 2016), *M. africanum* y *M. cannetti* (causantes tuberculosis en África), *M. caprae* (ganado caprino), *M. microti* (pequeños roedores), *M. pinnipedi* (patógeno en focas que puede causar tuberculosis zoonótica ocasional en el hombre) (González, 2013) y *M. mungi* (mangosta rayada) aunque

existen reportes de estas cepas en diversos hospederos; habitualmente se utiliza el término de *M. tuberculosis* o bacilo tuberculoso como sinónimo de todas las especies mencionadas (Wirth T., et. al., 2008; Ortega E., 2014), y los descritos recientemente, *chimpanzee bacillus* (chimpancé), *dassie bacillus* (damán roquero), y *Mycobacterium suricattae* (suricata) (Jesús Viñuelas-Bayóna, et. al., 2017).

2.2.4 Características

Vadillo et. al. (2002) menciona que el género *Mycobacterium* tiene un tamaño de 1 a 10 µm (micras) de largo por 0.2 a 0.6 µm de ancho. Las paredes de estas bacterias son complejas y exigentes en requerimientos nutricionales, por lo produce que crezcan con lentitud, las variaciones de las especies necesitan medios enriquecidos y un contenido de yema de huevo (citado en Orbe, 2019, p. 23).

Gómez, (2009) indica que el tiempo de regeneración de las especies de MTBC es de 12-24 horas, existe diferentes hipótesis acerca de la lentitud replicativa, entre las más importantes esta la limitación en la captación de nutrientes debido a la gran impermeabilidad de la pared y a la presencia de nutrientes en la membrana celular, la otra hipótesis es la existencia de tan solo un operón para la síntesis de ARN (p.44).

Estas bacterias se reproducen de manera asexual, es decir que una bacteria clona a otra con la misma información genética, sin embargo, existe registros de esporulación en medios de cultivo de la especie *M. bovis* BCG (MTBC) (López L., 2005).

Otro aspecto característico es la presencia de trehalosa 6,6-dimicolato en la capa superficial de la pared celular, este componente confiere la capacidad de agregación en forma de “cuerdas” conformadas por agrupaciones de bacilos, visibles a observación microscópica y fenómenos asociado con características de virulencia del bacilo (Gómez, 2009), por otra parte, las especies de MTBC son aerobias como *M. tuberculosis* y microaerofílicas como *M.bovis* que requiere 5% de oxígeno para su desarrollo (I. Dorronsoro, L. Torroba, 2007).

2.2.4.1 Envoltura de *Mycobacterium*

La envoltura le provee a la bacteria la protección y el soporte, también conserva mecanismos que le permiten el intercambio sustancial entre la bacteria y el medio ambiente (Rodríguez, 2008).

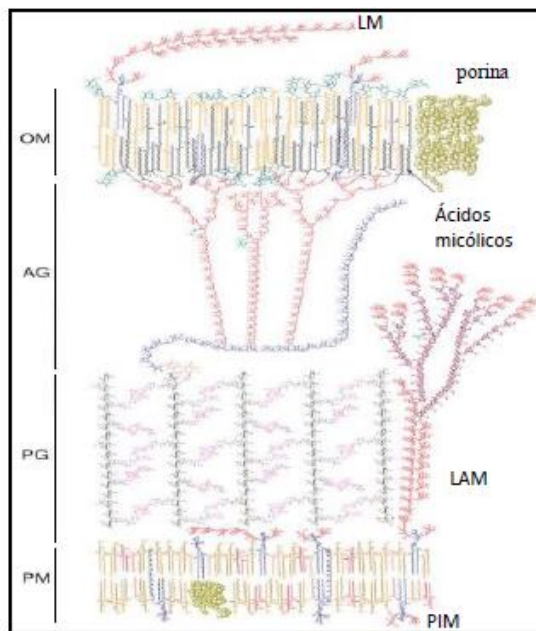


Figura 1 Modelo teórico de la envoltura de *Mycobacterium*. El material capsular no está representado.

Fuente: Kaur D., *et. al.*, (2009); Ortega E., (2014)

La envoltura se divide en dos partes principales:

a. Membrana plasmática

Le brinda a la célula la protección osmótica y el transporte de iones y moléculas (Rodríguez, 2008), aquí se anclan proteínas, manoso de fosfatidilinositol y lipoarabinomano (LAM) (Flores, 2016), se la puede observar como en cortes ultrafinos tal cual una membrana biológica trilaminar clásica, dos capas electrón-densas separadas por una capa transparente (Rodríguez, 2008), a lo largo se interfieren proteínas transportadoras y porinas, constituyendo el 15% del peso de la misma (Flores, 2016).

b. Pared celular

La pared celular brinda soporte mecánico y protección (Rodríguez, 2008), debido a que es rica en lípidos se la hace responsable de muchas características de estas bacterias (crecimiento lento, ácido alcohol resistencia, resistencia a antibacterianos comunes, resistencia a detergentes, antigenicidad) (Mendoza, 2004).

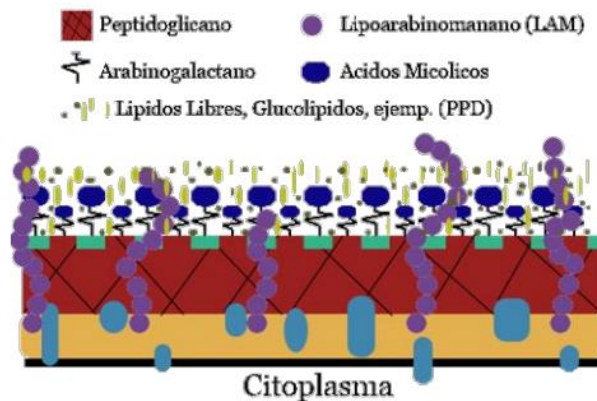


Figura 2 Pared celular micobacteriana.

Fuente: (Mendoza, 2004)

Los lípidos de la pared celular de las micobacterias la vuelven hidrófoba, está es la razón por las que son resistente a las tinciones básicas de anilina, a excepción que éstas sean sometidas al calor o detergentes, estas bacterias resisten a la decoloración de la mezcla de 3% de ácido clorhídrico y 95 % de etanol por lo que toman el nombre de ácido alcohol resistentes, siendo la razón por lo que deben de ser teñidas por fucsina carbólica (técnicas de ZiehlNeelsen/Kinyoung) (Mendoza, 2004).

2.2.4.2 Fisiología y metabolismo

Las micobacterias son muy variables en cuanto a su metabolismo, se encuentran las de crecimiento rápido creciendo en menos de tres días y micobacterias que crecen lentamente tomándose varias semanas y con la necesidad de medios más ricos que pueden ser solidos a base de agar o en base de huevos (Löwenstein-Jensen), o líquidos.

El *M. tuberculosis* y la mayoría de las micobacterias son estrictamente aerobios, excepto *M. bovis*, que es un microaerófilo el cual para su crecimiento optimo debe estar en un entorno con

un contenido de dióxido de carbono del 5 al 10%, su temperatura óptima de crecimiento es variable; *M. tuberculosis* lo hace a 37 °C con un rango entre 30 y 42 °C (Rodríguez, 2008).

2.2.5 Epidemiología de *M. bovis*

La TBB está presente en el ganado de todo el mundo, entre enero de 2017 y junio de 2018, 82 (el 44%) de los 188 países y territorios que notificaron a la OIE estaban siendo afectados por la enfermedad. Veintinueve países (35,4%) han informado de esta infección tanto en el ganado como en los animales salvajes. Dos países (2,4%) declararon que los casos de tuberculosis bovina solo se observaron en la vida silvestre, mientras que 51 países (62,2%) afirmaron que la enfermedad solo afectaba al ganado (Kiyokazu Murai *et al.*, 2019). La pasteurización de la leche y el control de la enfermedad han reducido la incidencia en los países industrializados. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, tanto el ganado domesticado como el salvaje tienen TBB, y las actividades de control y seguimiento son insuficientes o no se llevan a cabo (Aymerich, *et.al.*, s.f).

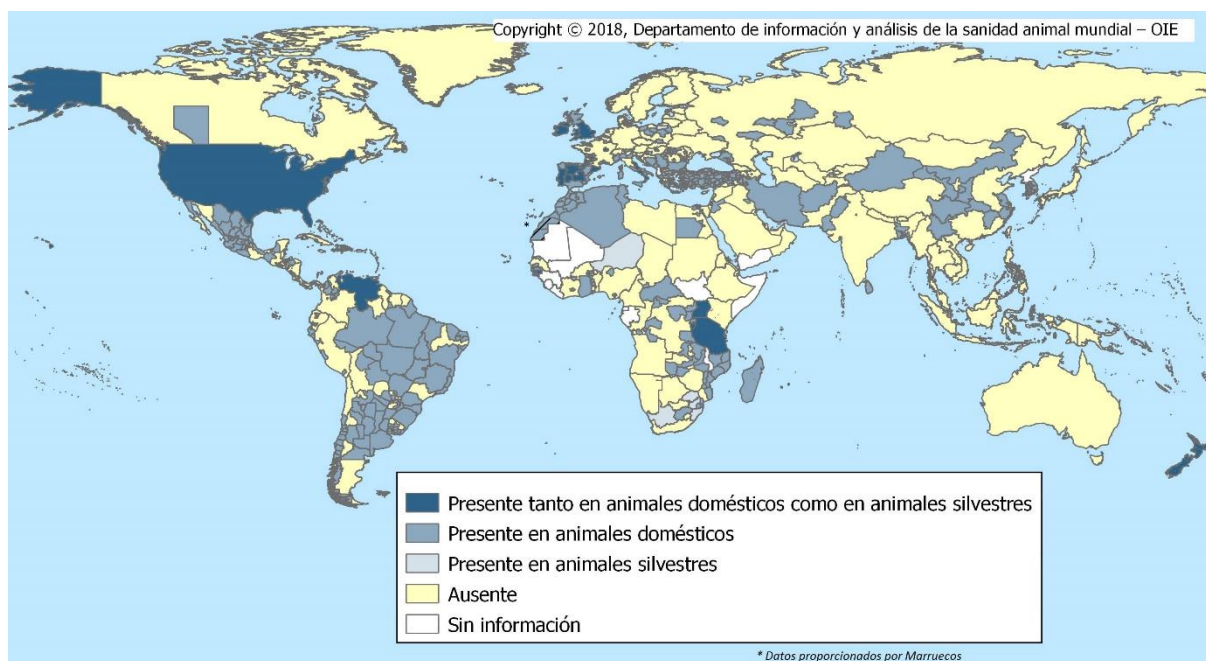


Figura 3 Distribución mundial de la TBB para el año 2017 y el primer semestre del 2018.

Fuente: Kiyokazu Murai, *et. al.*, 2019

La mayoría de los países de América Latina y el Caribe tienen infección por tuberculosis bovina y su importancia varía, especialmente concentrada en las vacas lecheras. Se han realizado

actividades de control y vigilancia en todos los países. Algunos ya se encuentran en etapa de erradicación (Cuba, Costa Rica, Panamá, Uruguay) (N.de Kantor, *et. al.*, 2011). Mediante prueba de tuberculina o derivado proteico puro (PPD), la prevalencia de tuberculosis bovina es muy baja o nula en algunas zonas, algunas islas del Caribe, países con prevalencia moderada (como México) y algunos de Centroamérica y con prevalencia alta como Argentina y Brasil (López L., *et. al.*, 2006).

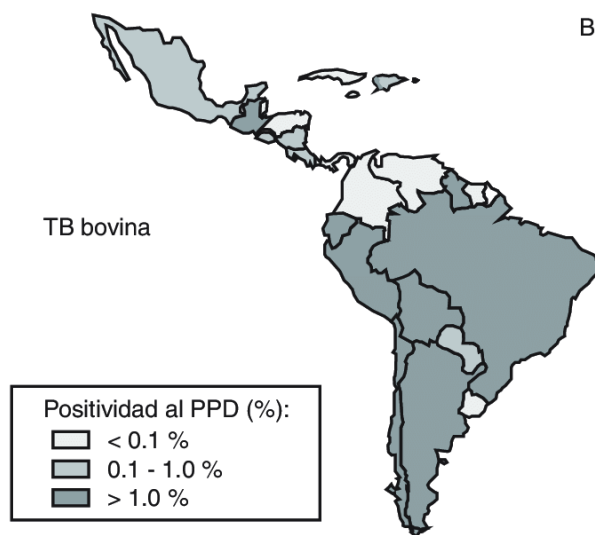


Figura 4 Estimaciones de prevalencia de TBB en Latinoamérica. En base a la positividad al PPD en bovinos.

Fuente: López L., *et. al.*, 2006

2.2.5.1 En Ecuador

Ecuador pertenece al grupo de países de América Latina que tiene una prevalencia relativamente alta (de Kantor I. & Ritacco V., 2006) y estos casos no se encuentran bien documentados ni cuantificados debido a la falta de un registro de animales positivos y el uso limitado de pruebas de tuberculina debido a que no es una enfermedad de declaración obligatoria (Proaño-Pérez, F., *et.al.*, 2011).

Para la provincia de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas, mediante investigación universitaria, se confirmó la presencia de TBB, mediante la prueba tuberculina con 160 bovinos inoculados en el pliegue ano-caudal, resultó una prevalencia de 12,86 (65/160).

Según Román & Rómulo, (2014), en el cantón Loja obtuvieron una positividad del 6,20% y 7,20% animales sospechosos esto fue mediante el diagnóstico de tuberculina intradérmica

simple y en bovinos faenados en camal y confirmando mediante Baciloscopía con tinción de Zielh Neelsen encontraron un porcentaje del 17,31% identificando el bacilo tuberculoso. Indicando la presencia de TBB para estas zonas del Ecuador.

Cushicóndor, (2014) determinó una prevalencia aparente de tuberculosis bovina del 1,52% por inspección veterinaria en el camal municipal del cantón Mejía (Pichincha). Mientras que Echeverría en el (2011), determinó mediante técnica PCR, prevalencia aparente de 4,33% y una prevalencia real de 2,51%, en los camales de Cayambe y Pelileo respectivamente; demostrando alta ocurrencia de tuberculosis en el área estudiada y pone en evidencia el riesgo que tienen los trabajadores en los mataderos y las personas que tienen contacto cercano con los animales enfermos.

2.2.5.2 En Carchi

Carchi es una de las provincias con mayor movimiento pecuario y que su prevalencia para la TBB es baja en comparación con otras provincias que también se dedican a la producción pecuaria, para el año 2002 Carchi presentó una prevalencia de 1,73% a comparación del año 2013 la prevalencia bajo a 0,37, la diferencia es significativa indicándonos aun la presencia de TBB (Quinotoa Ivan & Chicaiza Juan , 2013).

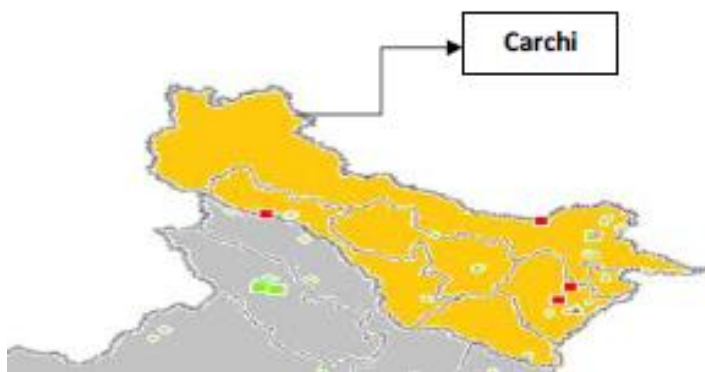


Figura 5 Ubicación de las fincas positivas (rojo) y negativas(verde) en la provincia del Carchi.

Fuente: (Quinotoa Ivan & Chicaiza Juan , 2013)

Paillacho, (2015) indica que la prevalencia es de 0,54% para el cantón Tulcán, valor que no representa diferencia comparativa con el estudio de Orbe (2019), en donde la prevalencia es de 1,05%, uno de los posibles problemas de que esta enfermedad no se encuentre erradicada de manera completa es que la provincia es fronteriza y la adquisición de animales se da con mucha

frecuencia en los mercados de donde no se sabe bien la procedencia del animal y con un estatus desconocido ya que no presentan un documento donde diga que el animal esté libre de enfermedades.

2.2.6 *Mycobacterium bovis*

La *M. bovis* es la bacteria causante de la TBB, se la encontró por primera vez en animales domésticos, ataca normalmente al ganado vacuno, pero puede ser transmitido a los humanos por medio del consumo de productos lácteos no pasteurizados, en este caso los pulmones no se pueden ver afectados, debido a que produce lesiones principalmente en la médula ósea de la cadera, rodillas, vértebras y ganglios linfáticos cervicales (Roa, 2015).

El *M. bovis* y *M. tuberculosis* tienen una secuencia genómica que coincide cerca del 99 %, es por esta razón que son necesarias pruebas específicas para lograr su tipificación (Prat Aymerich, *et.al.*), sin embargo, existe una gran diferencia con *M. tuberculosis* que es la incapacidad de metabolizar el glicerol debido a una alteración natural en genes implicados en el metabolismo del piruvato, es por esta razón que al piruvato se lo necesita como fuente de carbono para su crecimiento. El crecimiento en medio Löwenstein Jensen y Ogawa es pobre, debido a su contenido de glicerol (Pérez-Barragán, Manjarrez-Tellezb, 2017), también tiene una fuerte capacidad de supervivencia en organismos hospedadores, factores de virulencia y mecanismos patogénicos (Domínguez Odio, *et.al.*, 2016).

2.2.7 Síntomas y signos.

En algunos casos, la tuberculosis suele ser crónica y los síntomas pueden tardar meses o incluso años en aparecer (CRESA, 2015), en ocasiones resulta aguda desarrollando rápidamente infecciones que suelen ser asintomáticas (Quinotoa Ivan & Chicaiza Juan, 2013). Los signos inespecíficos que presenta el animal infectado es la caída de la producción lechera y deterioro general de salud, pérdida de apetito y peso. En cuanto a los signos clínicos que presentan son: taquipnea (aceleración de la respiración), disnea (dificultad de respirar) (CRESA, 2015), esto resulta en casos avanzados, cuando gran parte de los pulmones están destruidos (Pedro N. Acha y Boris Szyfres, 2001), también presenta fiebre fluctuante, sonidos anormales en la auscultación y percusión, a la larga causa la muerte del animal (CRESA, 2015), debido a su naturaleza a

largo plazo, esta enfermedad se vuelve más frecuente a medida que el animal envejece. (Pedro N. Acha y Boris Szyfres, 2001).

Pedro N. Acha y Boris Szyfres, (2001) manifiestan que por lo general la tuberculosis afecta a un solo órgano que es el pulmón, el proceso resulta lento y clínicamente inaparente por largo tiempo; es por eso que algunos animales resultan problema al hato ganadero debido a que toda su vida el animal pasa sin sintomatología evidente, pero eso no impide que el resto del rebaño se contagie. En países sin control de la enfermedad hay la presencia de la tuberculosis perlada, en donde el 5% de las vacas con tuberculosis avanzada, presentan metritis y el 1-2 % presenta una mastitis tuberculosa, convirtiéndose en la fuente de infección para los terneros amamantados de forma natural o artificial. Esta tuberculosis oral adquirida incluye inflamación de los ganglios retro faríngeos, el foco primario tiende a depositarse en los nódulos mesentéricos sin afectar la mucosa intestinal. (p.291)

En los casos cuando la bacteria permanece en estado latente en el organismo hospedador, se da la necrosis por caseificación de las lesiones tuberculosas que se encuentran en los ganglios linfáticos y pulmones. Las lesiones se muestran con un color amarillento y una consistencia pastosa, que cambia según el grado de calcificación de la lesión (CRESA, 2015).



Figura 6 ganglio pulmonar.

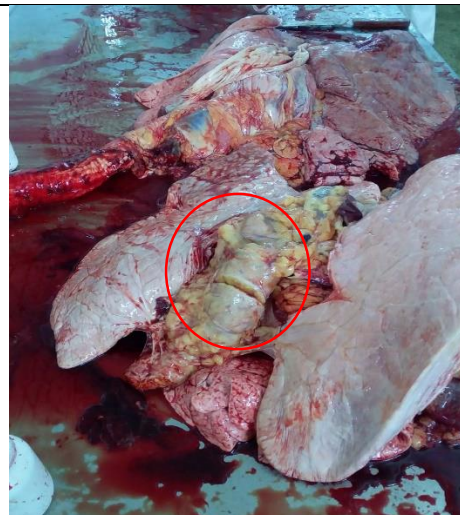


Figura 7 ganglio traqueobronquial.

2.2.8 Transmisión.

La vía común de infección es inhalar las gotículas infectadas que los animales enfermos expulsan al toser (OIE, 2019), a través de las heces y mediante la orina. La transmisión puede ser indirecta, ya que la micobacteria es muy resistente a la desecación y puede estar por muchos meses en el polvo o en los objetos de uso diario (Morán y Lazo , 2001), las terneras y el ser humano también pueden contagiarse al ingerir leche cruda procedente de vacas enfermas (OIE, 2019).

Los síntomas de la tuberculosis en el ganado suelen tardar varios meses en aparecer. La infección también puede estar inactiva y reactivarse durante períodos de estrés o en animales adultos (IICA, 2009), antes de mostrar los síntomas clínicos iniciales, una sola muestra puede propagar la enfermedad a muchas otras partes del rebaño. Por tanto, la principal vía de transmisión son las actividades de los animales domésticos infectados asintomáticos y el contacto con los animales salvajes infectados. (OIE, 2019). Las lesiones que son ocasionadas en los ganglios bronquiales al penetrar el agente causal pueden permanecer latentes o progresar, de acuerdo con la relación del binomio agente infeccioso-huésped. La infección puede extenderse a otros órganos a través del torrente sanguíneo linfático o mediante conductores naturales. Si el dispositivo inmunológico no destruye las bacterias, estas formarán nódulos donde se detuvieron. (Szyfres, 2001).

En comparación con los animales de carne, las vacas lecheras tienen una tasa de infección más alta debido a su vida económica efectiva más prolongada y porque tienen un mayor contacto cuando son recolectadas para el ordeño o estables o semi-estables o por la estabulación o semiestabulación (FAO, 2010). La ruta de *M. avium* que infecta al ganado es la ruta digestiva. Cuando se encuentran lesiones, generalmente se limitan al intestino y los ganglios mesentéricos, aunque en algunos casos se pueden encontrar en los pulmones y sus ganglios regionales más que en otras partes del cuerpo, lo que indica que en ocasiones la vía de penetración puede ser aerógena. La lesión es fácil de curar por sí sola. La infección por *M. avium* no se ha propagado de bovino en bovino. Los bovinos son altamente resistentes a *M. tuberculosis* y generalmente no causan cambios patológicos (Szyfres, 2001).

2.2.9 Diagnóstico.

El método clásico es la prueba de la tuberculina, que consiste en medir la respuesta inmune después de inyectar una pequeña cantidad de antígeno por vía intradérmica. (OIE, 2019).

2.2.9.1 Prueba de tuberculina pliegue ano-caudal (PAC): Esta es la prueba de tuberculina básica y de rutina que consiste en aplicar vía intradérmica un derivado proteico purificado (DPP) de origen bovino (ICA, 2016), esta prueba es de aplicación intradérmica en el tercio medio ano-caudal interno a 6 cm de la base de la cola (Torres, 2015) a una dosis de 0.1 mL, la lectura se la realiza luego de 72 ± 6 horas posteriores a la aplicación (ICA, 2016). Esta prueba puede presentar falsos positivos debido a que no diferencia entre *M. bovis* y otras micobacterias (Delgado, 2013).

- a) **Reacción negativa:** una inflamación del pliegue de 2 mm o no se observa inflamación además no presenta signos clínicos como puede ser dolor o inflamación de los ganglios linfáticos de la zona de aplicación de la tuberculina, exudación, necrosis, edema difuso.
- b) **Reacción sospechosa:** no se observan signos clínicos y el pliegue cutáneo mide de 2 a 4 mm.
- c) **Reacción positiva:** pliegue mayor 4 mm y observación de signos clínicos (ICA, 2016).

2.2.9.2 Prueba de tuberculina cervical comparativa (PCC): mediante esta prueba se confirma infección de *M. bovis* (ICA, 2016). Se aplica PPD bovino y PPD con una distancia de 12 cm, y el grosor de la piel se mide con un calibre antes y después de la aplicación. Su propósito es determinar si la respuesta inflamatoria es causada por *M. bovis* u otras micobacterias (Delgado, 2013). La lectura de la prueba se la realiza 72 ± 6 horas después de la aplicación (ICA, 2016).

- a) **Reacción negativa:** entre DPP bovina y DPP aviar la diferencia es menor a 1 mm.
- b) **Reacción sospechosa:** entre DPP bovina y DPP aviar esta entre 1 y 4 mm.
- c) **Reacción positiva:** el engrosamiento inducido por los DPP bovina con respecto a la DPP aviar es superior a 4 mm (ICA, 2016).

2.2.9.3 Prueba de tuberculina cervical simple (PCS): esta prueba se utiliza para detectar animales con *M. bovis* e inmediatamente eliminarlos de los predios en donde ya se realizó las

pruebas antes mencionadas. Se utiliza una dosis de 0.1 ml y la lectura se la realiza 72 ± 6 horas (ICA, 2016), se considera un animal positivo cuando el resultado de 2 mm o más de engrosamiento, comparándolo la medida previa a la aplicación (Delgado, 2013)



Figura 8 Alternativas acción positiva

Fuente: Delgado, 2013.

Tabla 3 Sensibilidad y especificidad de la tuberculina.

Prueba	Sensibilidad %	Especificidad %
PAC	85-90	95-98
PCC	74	98
PCS	90-95	90

Fuente: ICA,2016.

2.2.9.4 Inspección veterinaria. Para determinar si el animal padece de dicha enfermedad, el médico veterinario observa directamente el animal en estado post-mortem los granulomas tuberculosos que se encuentran en ganglios linfáticos, pulmonares, hígado, bazo, riñones, glándula mamaria (Proaño & Benítez, 2011), este examen tiene una sensibilidad para

inspecciones ordinarias en mataderos de 28,2% y una especificidad para las lesiones identificadas como tuberculosis de 99.3% (Biffa, Bogale & Skjerve, 2010).

SENASA, (2019) indica que para llevar un sistema completo de vigilancia epidemiológica, se debe llevar un registro de todos los animales que están destinados a la faena, una vez en el establecimiento la inspección sanitaria comienza con la identificación del animal y la procedencia en donde se encuentran lesiones compatibles con TBB, permitiendo así el rastreo retrospectivo, para así obtener una prevalencia en zonas o regiones que no se hayan investigado o el índice de animales con lesiones compatibles con TBB es bajo, algunos animales afectados pueden no ser detectados en la inspección si la misma no se realiza con la calidad técnica requerida, para esto se debe llevar una técnica de rigor: a) Observación visual b) Palpación c) Corte de órganos y linfoglándulas, viscerales y parietales d) Exámenes complementarios.

Puntos críticos de la inspección de faena

- a. Examen de la cabeza. Se retira de la res y se efectúa el corte foliado de las linfoglándulas retrofaríngeas, submaxilares, parotídeas y tonsilas.
- b. Examen de la cavidad torácica y pulmones. Las vísceras son depositadas en la mesa para la respectiva inspección, sin perder la relación con la cabeza y res, se realiza la palpación de todos los órganos, se efectúa el corte foliado de las linfoglándulas bronquiales y mediastínicas anterior y posterior.
- c. Examen de la cavidad abdominal. Se realiza el corte foliado de las linfoglándulas mesentéricas y gastroesplénico, con el fin de detectar lesiones compatibles con la enfermedad y poder saber con ello la vía de transmisión digestiva en la TBB. Asimismo, sobre cada órgano (hígado, bazo, etc.) se efectúan cortes precisos y sistemáticos, con el fin de verificar la existencia de procesos patológicos específico de TBB. Se continúa con el corte foliado de las linfoglándulas hepáticas.
- d. Examen de carcasa. En el palco de inspección el inspector veterinario realiza una revisión de las medias reses, cabeza y vísceras y está a la expectativa de las novedades que sus auxiliares le comuniquen, como resultados de sus controles. Los inspectores examinan si hay adherencias en las cavidades esplánicas. Asimismo, realizan incisiones foliadas de las linfoglándulas preescapular, prefemoral, inguinales (mamarios) e ilíacos.

Las muestras de origen animal que se remiten al laboratorio son ganglios y/o trozos de órganos (pulmón, hígado, bazo, intestinos, etc.). La toma de muestras siempre está a cargo de un profesional veterinario actuante, y las mismas se remitirán para su diagnóstico bacteriológico y diagnóstico histopatológico (Torres, 2015).

2.2.9.5 Cultivo bacteriológico.

Es considerada como técnica estándar de oro (Gold estándar) para arribar al diagnóstico definitivo. Sin embargo, el cultivo, en estas condiciones, tiene un crecimiento lento, llegando a insumir entre 2 y 3 meses (Garbaccio, 2006). Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos (Barrera, 2008), para el aislamiento inicial, el sedimento generalmente se inoculara en una serie de medios sólidos a base de huevo, como Löwenstein-Jensen, Coletsos o Stonebrinks. Estos medios deben contener piruvato y glicerol. El medio debe colocarse en un tubo cerrado para evitar que se seque. Durante el período de incubación, se debe controlar regularmente el crecimiento general de la superficie inclinada. Cuando haya crecimiento, se prepara el frotis y la tinción con la técnica de Zielh-Neelsen. (OIE, 2018).

La sensibilidad del cultivo es de 53% y especificidad de 88% (Biffa, Bogale & Skjerve, 2010), pudiendo ocurrir resultados falsos negativos debido a que fallas de la muestra remitida por presencia de microorganismos no viables (por falencias de transporte o en la remisión y acondicionamiento del material), dará un resultado negativo (Garbaccio, 2006).

2.2.9.6 Baciloscopía.

Esta detección se da a través de la coloración ácido alcohol resistente (Zielh Neelsen), es un complemento importante en la caracterización de un desarrollo micobacteriano en medios de cultivos, o bien, a partir de un frotis directo de muestras clínicas (Garbaccio, 2006), sin embargo, la sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo bacteriológico es de 43,5% y 94,4% respectivamente (Proaño-Pérez, *et al.*, 2011), pero es una herramienta útil para la detección de casos de TBB causada por *M. bovis* (Paillacho, 2015).

2.2.9.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Es un método molecular que puede identificar organismos analizando su ácido nucleico (Proaño-Pérez, F., *et al.*, 2011). Esta prueba puede amplificar cantidades extremadamente pequeñas de ADN, aun cuando las cantidades estén en el rango de picogramos y hacerlas detectables por medios convencionales (Suazo, *et al.*, 2010), permite la detección rápida con alta especificidad y sensibilidad de diversos productos alimenticios, varios patógenos microbianos de aguas ambientales (Cynthia W. Brasher, *et al.*, 1998), bacterias de diagnóstico difícil (Méndez-Álvarez, Pérez-Roth, 2004), como *Mycobacterium spp.*, *Chlamydia spp.*, micoplasmas, brucelas y otras bacterias de crecimiento lento que puede ser acelerado de varios días a un solo día (Sachse, 2004), también para detectar la presencia de genes clínicamente relevantes, como los que codifican la resistencia a los antibióticos o los que son más virulentos para los organismos que los portan. (Méndez-Álvarez, Pérez-Roth, 2004). La PCR tiene como blanco el gen que codifica la proteína MPB70, considerada específica para *M. bovis* (Suazo, *et al.*, 2010).

Su alta especificidad le permite distinguir dos microorganismos que están muy próximos en evolución, y su sensibilidad le permite detectar material genético viral de 20 copias / ml o menos (Gail, 2020).

La diferencia con el método de cultivo es que el PCR, amplifica ADN, mientras que los métodos de cultivo aíslan bacterias vivas y, en algunos casos, dejan la bacteria objetivo lesionada detrás (Hoorfar Jeffrey y Nigel Cook, 2003).

Para la detección de *M. bovis*, las muestras generalmente comprenden tejidos linfáticos frescos o congelados, el procedimiento de captura de secuencia ha permitido la detección de micobacterias en una amplia gama de huéspedes, especies y tipos de muestras. (A. Skuce, *et al.*, 2003).

Tabla 4 Detección de micobacterias en diferentes hospedadores y tejidos por PCR de captura de secuencia de ADN.

Especies	Sitio de la muestra	Tipo de muestra
Tejón	Riñón	Homogeneizado descontaminado
Jabalí	Pulmón	Formol-fijo parafina-integrada

Bovinos	Ganglios linfáticos	Fresco
Animales de compañía	Músculo	Congelados
Venado Hurón	Moco nasal	lipoluzado

Fuente: Skuce A., *et al.*, 2003.

Tipos de PCR:

- a. **PCR anidada:** también conocida como Nested PCR que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección (Milián Suazo, *et al.*, 2010), amplifica la muestra de ADN más pequeña en miles de millones de fragmentos, ya que se realiza en 2 PCR consecutivas (Yuenlab, 2020).
- b. **PCR múltiple:** Con este tipo de PCR, se pueden detectar múltiples fragmentos de ADN simultáneamente en una sola reacción y en una sola muestra (Yuenlab, 2020), permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés, se ha demostrado que es una buena opción, permite la detección simultánea de un número cada vez mayor de dianas, a partir de un número también creciente de tipos de muestras clínicas y requiere una cantidad menor de ácido nucleico molde (Méndez-Álvarez, Pérez-Roth, 2004).
- c. **PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR):** En este caso, el ARN se extrae de la muestra. Este ARN luego se convertirá en ADN a través de un proceso llamado transcripción inversa. En este proceso, se utiliza la transcriptasa inversa. Algunos virus (por ejemplo, el VIH y la hepatitis C) utilizan la transcriptasa inversa, que también puede determinar el nivel de expresión de genes específicos. (Yuenlab, 2020).

2.2.9.7 Interferón gamma.

Machado-Villarroel, *et al.*, (2015), indica que la prueba en sus siglas en inglés IGRA (ensayo de liberación de interferón-gamma) la diseñaron con el objetivo de complementar el diagnóstico de infección latente por tuberculosis y así incrementar la sensibilidad y especificidad.

(Centro de Diagnóstico Veterinario , 1995) indica que esta prueba se la realiza a partir del plasma que se encuentra en la sangre del bovino. La prueba de gamma interferón, como la prueba del pliegue ano-caudal, provoca la estimulación de las células T previamente sensibilizadas por la infección con *M. bovis*. Sin embargo, en la prueba gamma interferón el antígeno de PPD está en las células T en la sangre entera y la producción de gamma interferón por las células T estimuladas se monitorea *in vitro*. Esto es al revés de lo que ocurre con la prueba dérmica donde la medida es la detección de la inflamación e hinchazón. Para la prueba de gamma interferón se incuban pequeñas alícuotas de sangre entera heparinizada con antígeno de PPD. Después de 24 horas de incubación se elimina el plasma y se prueba para gamma interferón usando un anticuerpo monoclonal de enzima inmunoensayo (citado en Quinotoa & Chicaiza, 2013), una especificidad del 98-100% y una sensibilidad del 70-90% (Machado-Villaruel, *et. al.*, 2015).

2.2.10 Prevención y control.

CRESA, (2015) indica que el método habitual para el control de TBB, consiste en realizar la prueba individual de detección y posteriormente el sacrificio de los animales infectados. Otro método que resulta eficiente y útil para los programas de erradicación consisten en realizar un examen post mortem de la carne, con medidas intensivas de vigilancia, así como el control de los desplazamientos de los animales.

La inspección veterinaria puede ser aplicada para evaluar los programas de control que deben ir apoyados con un sistema de trazabilidad del ganado más el reporte de información de tipo sanitario (I. Kantor, *et al.*, 2010 citado en Cushicóndor, 2014), en los exámenes post mortem se buscan lesiones compatibles que vienen hacer tubérculos formados en los pulmones y ganglios linfáticos. En algunos países al detectar animales infectados, se impide la comercialización de la carne y se pone en conocimiento a los servicios veterinarios para hacer el seguimiento del rebaño de origen, que posteriormente se es sometido a pruebas y, en caso necesario, eliminado, por otra parte, la pasteurización de la leche de animales infectados ha impedido la propagación en poblaciones humanas (OIE, 2019).

2.2.11 Factores de riesgo

Orbe, (2019), menciona que, entre los principales factores de riesgo de tuberculosis en Carchi, están el movimiento pecuario, especies domésticas y silvestres, agua y el conocimiento de la enfermedad.

2.2.11.1 Movimiento pecuario

La nueva adquisición de animales de procedencia extranjera a la finca trae problemas debido a que no cuentan con un control sanitario o un documento que asegure que esté libre de tuberculosis (Orbe, 2019), los principales puntos de adquisición de la compra de animales son ferias ganaderas, mercados y fincas vecinas aumentando el riesgo de infección (Paillacho, 2015).

2.2.11.2 Especies domésticas

La transmisión de animales domésticos al ganado bovino no se debe descartar debido a que la infección por *M. bovis* se da en cabras, ovejas, caballos y cerdos complicando así el control o la erradicación de la enfermedad en el hato, de igual manera en los animales de compañía la infección es poco común, pero eso no significa que sirvan como huéspedes debido a que el gato y el perro en circunstancias se alimentan de la leche no pasteurizada de la vaca, pudiendo contagiar incluso a las personas (Reyes, 2012).

2.2.11.3 Especies Silvestres

Reyes, (2012) manifiesta que los animales silvestres pueden contagiar al rebaño de una manera indirecta, por medio de heces, orina y exudados que pueden permanecer en las pasturas o bebederos de donde se alimenta el ganado, por otra parte, Orbe (2019) por medio de su investigación manifiesta que los roedores y algunos mamíferos de la zona (erizos, armadillos, chucures) resultan ser hospederos del *M. bovis*.

2.2.11.4 Agua

El *M. bovis* no sobrevive por mucho tiempo en agua, la salpicadura durante la ingestión de agua puede proporcionar contagio (Reyes, 2012), un solo bacilo dentro de una gota es probablemente suficiente para establecer infección en el pulmón bovino (Proaño-Pérez F., et al., 2009). Sin embargo, en Carchi resultó ser un factor de riesgo, debido a que la corriente del agua pasaba por bordes de fincas con animales reactivos a TBB, la cual era brindada a los animales (Orbe, 2019).

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

Esta investigación tiene un enfoque mixto, debido a que el estudio es cuali-cuantitativo. Cualitativo ya que se realizó la identificación del agente causal de la tuberculosis a través de cultivos microbiológicos y PCR. Cuantitativo debido a que mediante los cultivos se obtuvo el porcentaje de prevalencia del *M. bovis* en el centro de faenamiento del cantón Tulcán.

3.1.2. Tipo de Investigación

La presente investigación posee dos tipos diferentes: investigación exploratoria y de campo. La investigación exploratoria, se enfoca en la recolección de información descriptiva para llevar a cabo la investigación (Ortiz, s.f.), por medio de esta investigación fue posible solventar las dudas acerca del tema e identificar la presencia de TBB y su agente causal en un contexto en donde no se modifican las condiciones.

Mediante la investigación de campo se adquiere datos directamente de la realidad, mediante métodos y técnicas de recolección de información (Graterol, 2011), la importancia de esta investigación radica en que el investigador se acerca directamente al lugar donde va a realizar su estudio obteniendo los datos necesarios para llevar a cabo la investigación (Cajal, s.f.), con este tipo de investigación y utilizando la técnica de observación, se inspeccionó los pulmones del bovino en estado post-mortem y se hizo la respectiva recolección de muestras de lesiones compatibles a la TBB en el centro de faenamiento.

3.2. HIPÓTESIS

H₁: Se identifica el agente causal de la TBB (*M. bovis*) en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi.

H₀: No se identifica el agente causal de la TBB (*M. bovis*) en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi.

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.3.1 Definición de variables.

Independiente: inspección veterinaria, aislamiento microbiológico, PCR.

Dependiente: identificación y prevalencia de *M. bovis*

3.3.2 Operacionalización de variables.

Tabla 5 Operacionalización de variables.

Variable	Dimensión	Indicadores	Técnica	Instrumento
Inspección veterinaria	Lesiones, granulomas	Observación de lesiones	Observación	Análisis de lesiones compatibles
Aislamiento microbiológico.	Aislamiento tipo de cultivo	Observación de crecimiento de colonias	Observación	Análisis de cultivo.
Análisis molecular	PCR <i>multiplex</i>	Observación de banda que indique la existencia de <i>M.bovis</i>	Observación	Análisis de banda.
Identificación y prevalencia de <i>M. bovis</i>	Prevalencia	Fórmula	Observación	Libros de campo

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

3.4.1 Capacitación

En los laboratorios del Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis CIZ, con un total de 16 horas se recibió una capacitación profesional en el área de Tuberculosis Bovina, especialmente en los temas de inmunodiagnóstico microbiología y biología molecular, siendo esta información de mucho provecho para poder realizar los cultivos de las lesiones compatibles con la TBB que se recolectaron en el camal de Tulcán. Por otra parte, para la recolección de

muestras la autora se trasladó al matadero de la ciudad de Santo Domingo, para observar y aprender la técnica de recolección de lesiones compatibles en animales positivos a la prueba de tuberculina.



Figura 9 Inspección de lesiones de TBB



Figura 10 Inspección de lesiones de TBB

3.4.2 Toma de muestras

En el centro de faenamiento de Tulcán se realizó la inspección macroscópica post-mortem de los tejidos: ganglionar linfático traqueo faríngeo y pulmonar, estos fueron palpados y cortados por la mitad para observar claramente si se encontraban calcificados mostrando un color amarillento, la toma de muestras se realizó de forma aséptica, con cuchillo desinfectado con cloro al 5%, con las medidas de bioseguridad y vestimenta adecuada, para protección de un posible contagio. El tiempo estimado para inspeccionar cada animal fue alrededor de 1 minuto. Las muestras fueron recogidas de manera individual en fundas herméticas rotuladas con el código de provincia y el número correspondiente de muestra.



Figura 11 ganglio pulmonar.



Figura 12 Inspección veterinaria.

3.4.3 Transporte de muestras

Al tomar las muestras en el camal, se almacenan en una caja térmica fría para ser transportadas a los laboratorios de la UPEC, donde se almacena en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su oportuno procesamiento en los laboratorios del CIZ, en Quito, es importante que las muestras se mantengan congeladas hasta ser procesadas, así “se conserva viables las micobacterias, evitando que crezcan otras bacterias contaminantes que dificultarían el cultivo” (CRESA, 2020).

3.4.4 Fase de laboratorio

Para cada fase realizada en el laboratorio se siguió los protocolos emitidos por el CIZ.

3.4.4.1 Procesamiento de las muestras en el laboratorio

Para el proceso de las muestras se trabajó de manera aséptica en el laboratorio de microbiología nivel III del CIZ, en la cámara de flujo laminar, evitando la contaminación cruzada entre muestras, las cuales ya se encontraban en proceso de descongelación:

- En cada uno de los tubos estériles se colocó 15 esferas de acero y 5 ml de agua destilada, previamente rotulados con el código de cada muestra.
- Se realizó cortes en las bolsas donde estaban transportadas las muestras para obtener las lesiones granulomatosas, posteriormente con la ayuda de una tijera y pinza esterilizadas

para cada toma se hizo pequeños cortes de la lesión y se fue colocando en los diferentes tubos sellados.

- Se utilizó el vortex para homogeneizar la muestra, durante 15 minutos, 3 ciclos a 100 rpm, dejando reposar las muestras por 5 minutos y repitiéndose todo el proceso 3 veces más.
- Al terminar el homogeneizado se desechó el sobrante.
- Se colocó agua destilada y se homogenizo por cuarta vez, con la ayuda de la pipeta se transfiere a tubos de 3 ml previamente rotulados, posteriormente para su utilización en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen y Stonebrink, el sobrante se almacenó a -20°C .

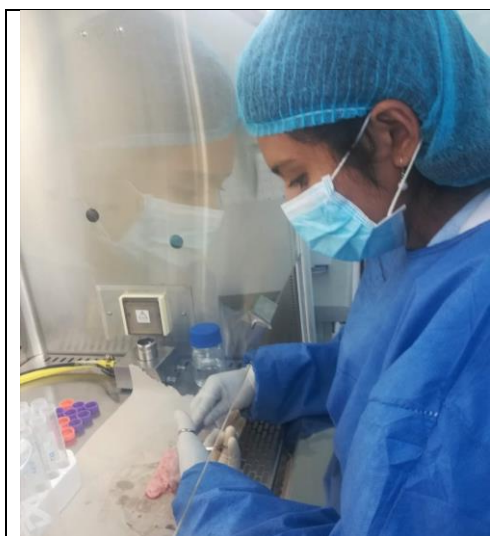


Figura 13 Procesamiento de muestras-
cámara de flujo laminar.



Figura 14 procesamiento de muestras- vortex

3.4.4.2 Descontaminación

HPC

1. Se tomó 500 ul de homogenizado y se colocó en un tubo fondo cónico de 15 ml.
2. Se agregó 500 ul de HPC 0,5 % en cada tubo y se homogeneizó en el vórtex.
3. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Cada tubo se vordexeo por 15 minutos y se centrifugo a 400 rpm por otros 15 minutos y se descartó el sobrante.

5. Se añadió 500 ul de H_2O , se utilizó el vórtex durante 10 minutos y posteriormente se centrifugo por 15 minutos Colocar 4 ml de agua estéril e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos realizando vórtex.
6. Se descartó el agua y se repitió el paso 5.
7. Se utilizó el vórtex hasta que la solución haya sido completamente desprendida de las paredes de los tubos, posteriormente se trasladó a la cabina de seguridad biológica y se realizó la siembra.

3.4.4.3 Preparación de cultivo para micobacterias.

Instructivo de preparación de medios de cultivo para micobacterias

Onofre, (2016) indica el siguiente procedimiento.

LOWENSTEIN-JENSEN Y STONEBRINK

Procedimiento LOWENSTEIN JENSEN

- Suspender 372 g de agar Löwenstein Medium Base en 600 ml de agua destilada.
- Añadir 12 ml de glicerol.
- Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio hierva.
- Autoclave a 121 °C durante 12 minutos.
- Enfriar a aproximadamente 50 °C.
- Mientras tanto, lavar los huevos y sumergirlos en etanol 70% durante 10 minutos, batirlos y filtrarlos usando un embudo forrado con gasa estéril hasta obtener 1000 ml que corresponden aproximadamente a 20 huevos.
- Añadir los huevos, mezclar y dispensar en tubos de vidrio estériles, aproximadamente 6 ml por tubo.
- Incubar los tubos en posición inclinada, a 80 °C durante 80 minutos.

Procedimiento STONEBRINK

- Suspender 37,2g de agar Löwenstein Medium Base en 600 ml de agua destilada.
- Añadir 6 g de piruvato de sodio.
- Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio hierva.
- Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- Enfriar a aproximadamente 50 °C.

- Mientras tanto, lavar los huevos y sumergirlos en etanol al 70% durante 10 minutos, batirlos y filtrarlos usando un embudo forrado con gasa estéril hasta obtener 1000 ml que corresponden aproximadamente a 20 huevos.
- Añadir los huevos, mezclar y dispensar en tubos de vidrio estériles, aproximadamente 6 ml por tubo.
- Incubar los tubos en posición inclinada a 80 °C durante 80 minutos. (CIZ,2020)

3.4.4.4 Siembra

- Una vez que el medio de cultivo se encuentra coagulado, se transfirió de manera cuidadosa la dilución, previamente se mezcló con la pipeta de 70 ml.
- El tubo se encontraba en una posición inclinada y con la ayuda de la pipeta se transfirió la solución realizando un movimiento rotatorio suave.
- Los tubos se incubaron a 37°C y se revisaron de forma periódica para comprobar el crecimiento de *M. bovis*.

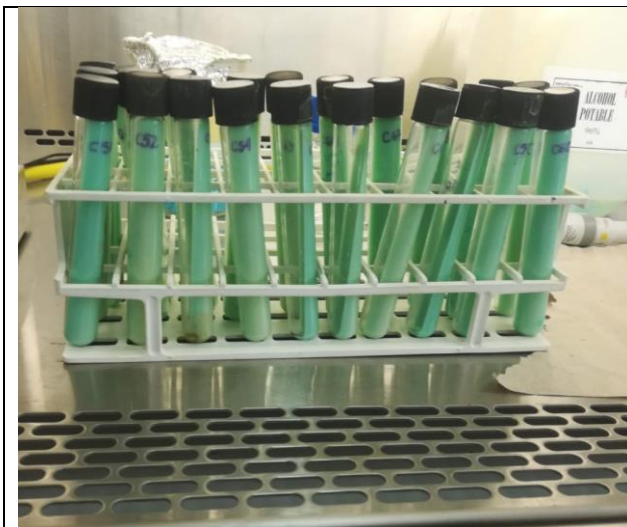


Figura 15 cultivo en medio Stonebrink.



Figura 16 proceso de incubación.

3.4.4.5 Microscopia o Ziehl Neelsen.

Después de observar el posible crecimiento de micobacterias en el cultivo bacteriológico se realizó el siguiente procedimiento con la Tinción de Ziehl-Neelsen:

- Con el asa microbiológica previamente esterilizado, se tomó una muestra de colonias de micobacterias que habían sido desarrolladas en el medio.
- El portaobjetos se encontraba previamente rotulado y por medio del hisopo se hizo un barrido de las colonias, fueron fijadas conservando una distancia de 1 cm entre cada muestra.
- La superficie fue cubierta con Fucsina fenicada durante 5 minutos.
- Se escurrió el exceso de coloración y se colocó ácido alcohol para que aquellas micobacterias que hayan retenido el ácido micólico continúen manteniendo el colorante, se mantiene durante 10 segundos.
- Con agua se hace un lavado para retirar restos de ácido-alcohol.
- Se cubrió los portaobjetos completamente con azul de metileno durante 1 minuto.
- Se lavó con agua para retirar restos de colorantes y se dejó secar las placas a temperatura ambiente y en una posición vertical.
- Posteriormente se visualizó en el microscopio con el lente de inmersión 100x.



Figura 17 Tinción Zielh Neelsen.

3.4.4.6 Extracción de ADN

En la extracción de *ADN* se utilizó el protocolo de Boiling

- Se colocó 5 colonias extraídas del medio de cultivo en 400 μ l de buffer tampón TE (Tris-EDTA) durante 10 minutos a 100 ° C.
- Se esperó 20 minutos a que exista una precipitación por gravedad y se tomó el material genético en suspensión.

3.4.4.7 PCR multiplex

Se utilizó el fragmento RD9 y RD1 para *M. bovis* y *M. tuberculosis*, teniendo como objetivo discriminar una posible antropozoonosis en el caso de existir *M. tuberculosis* en las muestras tomadas. Los primers utilizados según la banda de identificación se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6 Bandas de identificación y secuencia de primers utilizados para el master mix

<i>M.bovis</i>	
Bandas de identificación	Secuencia de primers
RD9 (108 pb)	5'-CAAGTTGCCGTTTCGAGCC-3'
	5'-CAATGTTTGTGCGCTGC-3'
	5'-GCTACCCTCGACCAAGTGTT-3'
RD1 (146-150 pb)	5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3'
	5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3'
	5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3'
Pb: pares de bases	
<i>M. tuberculosis</i>	
Bandas de identificación	Secuencia de cebadores
RD9 (235 pb)	5'-CAAGTTGCCGTTTCGAGCC-3'
	5'-CAATGTTTGTGCGCTGC-3'
	5'-GCTACCCTCGACCAAGTGTT-3'
RD1 (146-150 pb)	5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3'
	5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3'
	5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3'

Fuente: Parsons et al., 2002, p. 2341

Se preparó el master mix en un tubo de 1.5 ml, colocado a 0° C. Los cálculos fueron realizados previamente para un volumen de reacción final de 23 µl, y se añadió los reactivos en el orden y cantidades que se indican a continuación

Tabla 7 Reactivos utilizados para el master mix

Reactivo	Concentraciones		V1
	iniciales	finales	
H ₂ O	-	-	14.40 µl
Buffer	10X	1X	2.5 µl

MgSO ₄	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl
RD1 (1)	100 mM	1.8 pmol/µl	0.45 µl
RD1 (2)	100 mM	0.6 pmol/µl	0.15 µl
RD9 (1)	100 mM	1.8 pmol/µl	0.45 µl
RD9 (2)	100 mM	0.6 pmol/µl	0.15 µl
Taq	5U/µl	2U/100 µl	0.20 µl

Fuente: CIZ, 2020.

dNTPs: nucleótidos que generan las nuevas cadenas de ADN.

RD: cebador

- Se colocó 23 µl del mix en tubos de 200 µl, colocados previamente a 0°
- A cada tubo de 200 µl colocados en el termociclador se le agregó 5 µl de ADN extraído
- Se realizó la amplificación en el equipo según los parámetros que se indican a continuación

Tabla 8 Parámetros ingresados en el termociclador

Parámetros	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95 C°	15 min
Desnaturalización	94 C°	1 min
Hibridación I	62 C°	1 min
Hibridación	72 C°	1 min
Replicación	72 C°	1 min
Almacenamiento	12 C°	0

Fuente: CIZ, 2020.

- El número de ciclos fue de 40

3.4.4.7 Electroforesis

- Las bandas se visualizaron en gel de agarosa al 2%, esta fue preparada con 100 µl de buffer TBE y 2 gr de agarosa.
- Se agregó material genético bromuro de etidio 2ul por cada 30ml de gel.
- Se colocó las muestras en el tanque de electroforesis, con los marcadores de peso molecular (100 pb) a 100 voltios durante 45 minutos.

- Posteriormente se observó las bandas con luz uv en el transiluminador

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1 Muestreo aleatorio simple

Para determinar la prevalencia de TBB donde el estatus era desconocido se tomó en cuenta el 50% de probabilidad de encontrar la enfermedad, los intervalos de confianza para las prevalencias se calcularon con un 95% de confiabilidad, como indica (Cushicóndor, 2014), tomando en cuenta que los animales no eran de la misma finca, tomadas en días y meses diferentes.

$$n = \frac{1.96^2 * P_{exp} * (1 - P_{exp})}{d^2}$$

Donde:

n= tamaño de la muestra requerida

P_{exp}= probabilidad de las incertidumbres involucradas (50%)

d= se desea una precisión absoluta (5%)

$$n = \frac{1,96^2 * 0,5 * (1 - 0,5)}{0,05^2}$$

$$n = \frac{0,9604}{0,0025}$$

$$n = 384,16$$

3.5.2 Prevalencia

Fajardo-Gutiérrez, (2017), indican que la prevalencia “mide la proporción de individuos que se encuentran enfermos al momento de evaluar el padecimiento en la población, por lo tanto, no hay tiempo de seguimiento”.

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de población en ese momento}}$$

Figura 18 Fórmula prevalencia

Fuente: Fajardo-Gutiérrez, 2017

3.5.3 Toma de Muestras

Fueron tomadas 289 muestras en el centro de faenamiento del cantón Tulcán, no fue posible completar el número de muestras debido a la emergencia sanitaria que entro el país debido a la enfermedad COVID-19, impidiendo el ingreso a laboratorios.

3.5.4 Instrumentos de investigación

Para la recolección de información se utilizó la herramienta de la observación y los resultados se plasmaron en una tabla Excel.

3.5.5 Procesamiento y análisis de datos

Para los análisis los resultados obtenidos en el aislamiento del agente causal se utilizó la estadística descriptiva.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1 Inspección Veterinaria.

El número de animales inspeccionados *post-mortem* en el camal fue de 289 bovinos de los cuales se identificó 125 (43,25%) animales con lesiones compatibles a la TBB a nivel de pulmón y ganglios linfáticos.

Tabla 9 Resultados de diagnóstico mediante inspección veterinaria

Inspección Veterinaria	Animales	Porcentaje
Inspecciones positivas	125	43,25%
Inspecciones negativas	164	56,75%
Total	289	100%

4.1.2 Diagnóstico Bacteriológico

De las 125 muestras de lesiones compatibles con la TBB, mediante cultivo bacteriológico y la tinción (BAAR-bacilo ácido alcohol resistente) se obtuvieron 8 cultivos positivos: C109, C104, C160, C95, C24, C124, C121, C118.

Tabla 10 Resultados de diagnóstico bacteriológico a inspección *pos-mortem*

NÚMERO	ZONA	CODIGO	BACTERIOLOGÍA
3	CARCHI	C109	POSITIVO
5	CARCHI	C104	POSITIVO
7	CARCHI	C160	POSITIVO
8	CARCHI	C95	POSITIVO
11	CARCHI	C24	POSITIVO
13	CARCHI	C124	POSITIVO
28	CARCHI	C121	POSITIVO
29	CARCHI	C118	POSITIVO

4.1.3 Diagnóstico PCR

Se realizó un múltiplex PCR, identificando 5 cepas pertenecientes al MTBC (complejo *Mycobacterium tuberculosis*) consideradas como *M. bovis*. Tres cepas que no fueron consideradas del complejo MTBC fueron analizadas con otra técnica PCR, que es empleada por el CIZ para estos casos y que permiten identificar MNT (micobacterias no tuberculosas) que fueron clasificadas como 2 cepas de *M. avium* y 1 cepa de *M. immunogenum type*.

Tabla 11 Resultados de diagnóstico molecular de muestras positivas a bacteriología

NÚMERO	ZONA	CODIGO		PCR
3	CARCHI	C109	MTBC	<i>M.bovis</i>
5	CARCHI	C104	MTBC	<i>M.bovis</i>
7	CARCHI	C160	MTBC	<i>M.bovis</i>
8	CARCHI	C95	MTBC	<i>M.bovis</i>
11	CARCHI	C24	MNT	<i>M. avium</i>
13	CARCHI	C124	MTBC	<i>M.bovis</i>
28	CARCHI	C121	MNT	<i>M. avium</i>
29	CARCHI	C118	MNT	<i>M. immunogenum type</i>

Para la identificación de micobacterias *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, se utilizaron dos pares de secuencias como se indica en la tabla 12. Los cebadores utilizados para la prueba de PCR fueron RD9 y RD1 con diferentes secuencias de pares de bases para lograr la identificación de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Tabla 12 Bandas de identificación de PCR multiplex para *M. bovis*.

Especie	RD9	RD1
<i>M. tuberculosis</i>	235pb	146-150 pb
<i>M. bovis</i>	108 pb	146-150 pb
<i>M. BCG</i>	108pb	196-200 pb

Para la identificación entre cepas del complejo *M. tuberculosis* se utilizó la electroforesis en gel agarosa al 2%, dando como resultado en las 5 de las 8 cepas sometidas a la prueba, un producto de 108 pb, perteneciente al *M. bovis*. Adicionalmente no se observó amplificación del

fragmento 235 pb (*M. tuberculosis*), confirmando que las 5 muestras pertenecen al agente causal de la TBB (figura 14).

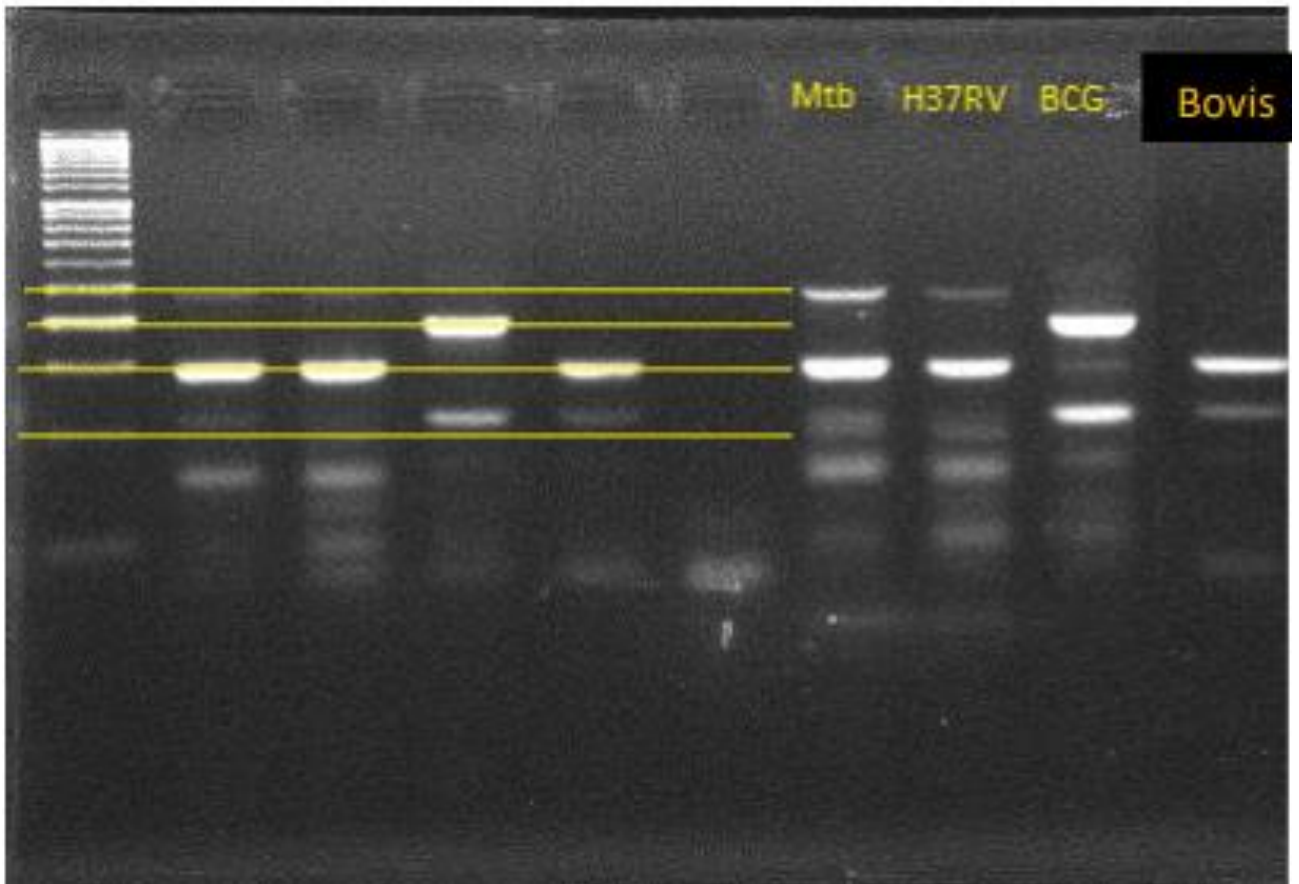


Figura 19 Electroforesis en gel de agarosa 2%, *M. bovis*

Las 3 cepas restantes fueron identificadas como MNT (figura 15).

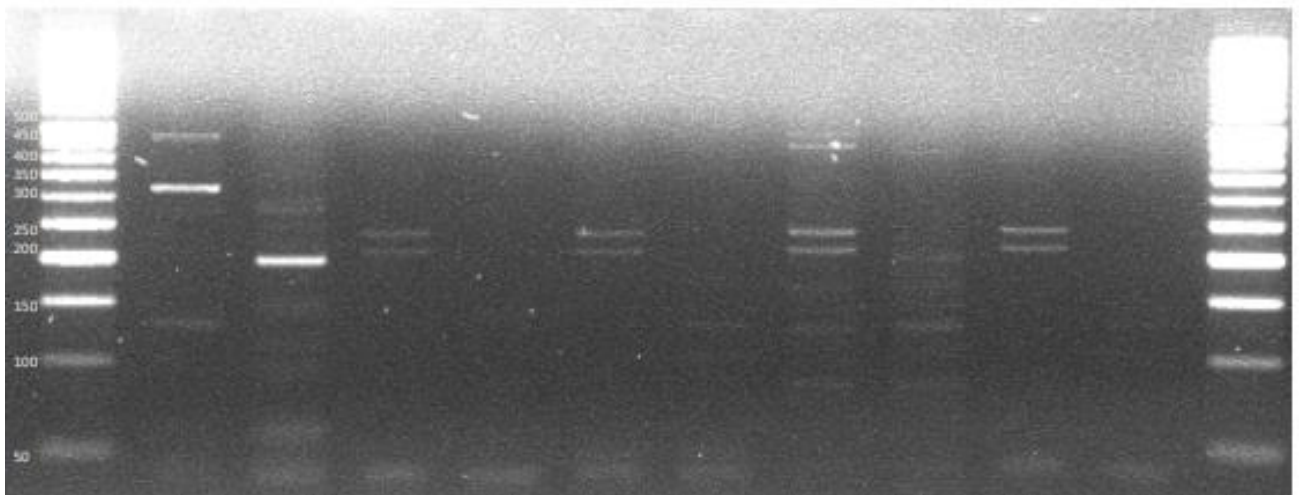


Figura 20 Electroforesis en gel agarosa 2%, MNT.

4.1.4 Prevalencia de TBB según las pruebas diagnósticas utilizadas.

Luego de realizar el diagnóstico mediante prueba de campo, laboratorio y análisis molecular se pudo observar que de 289 animales estudiados se obtuvo mediante inspección veterinaria un porcentaje de 43,25% (125/289) de muestras con lesiones compatibles, que posteriormente fueron confirmadas mediante diagnóstico de bacteriología resultando 8 muestras positivas dando una prevalencia de P= 2,77% (8/289) y se identificaron 5 cepas como *M. bovis* dando una prevalencia de P= 1,73% (5/289).

Tabla 13 Prevalencia de TBB.

	Diagnóstico		
	Inspección Veterinaria	Bacteriología	PCR
Número	125	8	5
Prevalencia	43,25%	2,77%	1,73%

4.1.5 Comparación de pruebas diagnósticas.

Según los resultados obtenidos 164 muestras fueron negativas a las 3 pruebas diagnósticas, solo 117 muestras positivas tenían lesiones compatibles con la TBB y fueron negativas para cultivo bacteriológico y PCR. Tres de las muestras resultaron positivas tanto a inspección veterinaria y cultivo bacteriológico. Además 5 muestras dieron positivo a las pruebas diagnósticas utilizadas.

Tabla 14 Comparación de pruebas diagnósticas directas para *M. bovis*.

Inspección veterinaria	Bacteriología	PCR	Observaciones
+	+	+	5
+	+	-	3
+	-	-	117
-	-	-	164
		Total	289

4.2. DISCUSIÓN

La inspección veterinaria de lesiones compatibles con la TBB resulta el diagnóstico más económico ya que es de fácil aplicación en camales, se inicia observando minuciosamente lesiones granulomatosas a nivel del pulmón y ganglios y posteriormente se hace una toma de muestras (Martínez, 2017), considerando que es complicado y difícil definir una lesión granulomatosa sin la debida capacitación y experticia; para completar el diagnóstico de la enfermedad se debe utilizar pruebas de laboratorio más sensibles y específicas como es el cultivo bacteriológico, pero que lastimosamente tiene el inconveniente de que tarda de 6 a 8 semanas (D.Collins, 2006). Además, si se requiere identificar el agente causal se puede recurrir a pruebas moleculares como PCR, que para el caso de la presente investigación permitió identificar el agente causal de la TBB en el camal de Tulcán como el *M. bovis*.

Lesiones compatibles con tuberculosis fueron encontradas en 125 bovinos a nivel del pulmón presentando formaciones de pequeños tubérculos, esto puede darse con mayor frecuencia en explotación lechera (Proaño-Pérez, *et al.*, 2011) y una de las actividades que más practica la población de la provincia del Carchi es la producción lechera, teniendo una amplia densidad en ganado por lo que facilitaría a la TBB propagarse, la prevalencia de inspección veterinaria en el camal es de 43,25% (125/289) para la zona de Tulcán, cabe recalcar que la inspección veterinaria no es 100% confiable para la erradicación de esta enfermedad (Echeverría, 2011), por lo que se debe realizar un diagnóstico con técnicas de confirmación, para un futuro control de esta enfermedad (Cushicóndor, 2014).

El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia del agente causal de la TBB, mediante el aislamiento microbiológico, el cual para ser llevado a cabo se siguió una serie de procedimientos. Se utilizó la técnica de inspección veterinaria para diagnosticar las lesiones compatibles con la enfermedad, esta técnica una vez capacitada no resulta de mayor complejidad, sin embargo, su baja sensibilidad de 28,2% (Biffa, Bogale & Skjerve, 2010) causa una reducida identificación debido a que la enfermedad puede encontrarse en sus primeros días de infección y el animal puede tener lesiones muy pequeñas que a simple vista no se puede diferenciar (Canal, 2013), al igual que en la inspección veterinaria no se cuenta con el tiempo suficiente para examinar detenidamente los órganos. Por otra parte, la especificidad de esta técnica es de 99,3% (Biffa, Bogale & Skjerve, 2010), sin embargo, las lesiones también pueden

estar causadas por micobacterias ambientales u otras enfermedades que atacan al pulmón causando lesiones similares a las de TBB.

Teniendo en cuenta que estos factores afectan la sensibilidad y la especificidad de la inspección veterinaria se obtienen resultados falsos negativos o falsos positivos (Milián Suazo, *et al.*, 2010), por lo que la prevalencia en esta fase de estudio puede estar subestimada o sobreestimada a la verdadera dimensión del problema (Cushicóndor, 2014), cabe recalcar que la TBB es una enfermedad endémica por lo que su prevalencia varía de acuerdo a la ubicación geográfica y el tamaño de explotación ya sea de leche o carne de acuerdo a la zona, dificultando los programas de control y erradicación en caso de que se utilice este diagnóstico.

Los diferentes países o regiones encajan en una de las tres categorías, en función a la prevalencia de la enfermedad: inferior al 0,1%, baja; entre el 0,1% y el 1%, intermedia; mayor que 1%, alta (de Kantor & Ritacco, 2006; Ritacco *et al.*, 2006); el Ecuador se encuentra en la categoría alta al 1% o desconocida (Ritacco *et al.*, 2006), debido a la falta de reportes en diferentes zonas del país mediante la aplicación de diferentes métodos de laboratorio (Echeverría, 2011). La prevalencia a nivel de lesiones compatibles de este estudio resulta muy alta, en comparación con otros estudios realizados en el Ecuador con una prevalencia de 4,43 (25/578) en camales de Pelileo y Cayambe (Echeverría, 2011), 1,01% (4/395) (Cushicóndor, 2014) y 2,3% (33/1390) para el matadero del cantón Mejía (Proaño-Pérez, *et al.*, 2011) que son valores considerados altos, Santo Domingo de los Tsáchilas (0,21% 6/2.778) (Coloma, 2000; citado en Proaño-Pérez *et al.*, 2011; Cushicóndor, 2014) valor considerado intermedio y en comparación con otros países como: Argentina 0,9% (116.798/13.483.515) en 2009 (Torres, 2009 citado en Cushicóndor, 2014) y Minas-Gerais, Brasil [0,71% (681/954.640)] (Baptista *et al.*, 2004 citado en Cushicóndor, 2014) mostrando una prevalencia intermedia.

La diferencia de los resultados puede ser por el tamaño de la muestra, debido a que el área de muestreo de este estudio es reducida a diferencia de los otros estudios, además que el diagnóstico por inspección veterinaria tiene una sensibilidad baja ya que muchas veces no se presentan lesiones visibles en los órganos a inspeccionar (Biffa, Bogale & Skjerve, 2010). Por otro lado las lesiones pueden resultar similares a otras enfermedades como: Actinomicosis, Actinobacilosis y Leucosis que han sido diagnosticadas en el matadero de Machachi (Cushicóndor, 2014), información que se corrobora con la investigación de Martínez, (2017).

La prevalencia de *M.bovis* mediante el diagnóstico bacteriológico es de 2,77 (8/289) teniendo similitud con otro estudio realizado en el matadero del cantón Mejía, con un resultado de 1,52% (6/395), no hay otros estudios realizados de prevalencia mediante bacteriología (Cushicóndor, 2014), que hayan sido confirmados de lesiones compatibles en Ecuador, atribuido esto el tiempo que se toma para poder observar los resultados, sin embargo, en un estudio en Buenos Aires dio como resultado en tejidos 36,5% (38/104), seguido de leche 10,7% (23/214) y, por último, de secreciones nasales 3,9% (10/254), el autor especifica que el cultivo de tejidos compatibles con la TBB tuvo mayor efectividad para la confirmación de la enfermedad (Garbaccio S, *et.al.*, 2016).

El porcentaje de prevalencia del *M.bovis* mediante la aplicación de métodos de Biología Molecular (PCR), resultó de 1,73% en animales (5/289) indicando la presencia de la enfermedad para el camal del cantón Tulcán, cabe recalcar que este es el primer estudio realizado con técnicas moleculares e identificando el agente causal de la tuberculosis bovina, un estudio similar realizado por Echeverria (2011) mediante la técnica de nested-PCR tiene como resultado una prevalencia de 4,325% (25/578) en los camales de Pelileo y Cayambe, indicando un porcentaje alto de *M.bovis* y donde explica que 5,35% es el porcentaje de origen de animales provenientes de Carchi.

En otros estudios realizados en las diferentes zonas de la provincia del Carchi indican la presencia de la enfermedad en bovinos pero se desconoce si la infección es causada por el *M.bovis*, sin embargo existe la presencia de TBB en Carchi, para la parroquia Santa Martha de Cuba existe una prevalencia de 0,54% en animales (2/368) (Paillacho, 2015), para el cantón Tulcán una prevalencia de 1,05% a nivel de animales (4/380) para el año 2019 (Orbe, 2019) y 1,28% (15/783) para el año 2020 (Palacios & Acosta, 2020) estudios que no estiman mayor diferencia en comparación a los resultados de esta investigación, sin embargo, indica el aumento del porcentaje de prevalencia de la enfermedad en los últimos años para la provincia del Carchi. Palacios & Acosta, (2020) indican que la enfermedad está en aumento debido a la amplia densidad de animales que contienen los hatos ganaderos y como factor de riesgo para el aumento es el desconocimiento de la enfermedad de los dueños, por lo que dificulta que realicen pruebas de diagnóstico a sus animales.

Para el estudio se realizó el cultivo bacteriológico de las 125 muestras de lesiones compatibles con la TBB obtenidas en el camal y procesadas en el medio sólido Stonebrink y Löwenstein-

Jensen en donde solo en 8 muestras se observó crecimiento de colonias (tabla 10). Estos resultados no coinciden con lo que han reportado otros autores, en donde afirman que aproximadamente el 70% de las muestras provenientes de lesiones visibles con la TBB, resultan positivas a *M. bovis* cuando se cultivan en medio sólido (Patiño, 2015), a pesar de que el medio utilizado proporciona los requerimientos suficientes para diagnosticar la infección, puede que haya una cantidad de bacilos escasa. Es importante tener en cuenta el límite de detección propio del ensayo bacteriológico, el cual requeriría valores superiores a 10 o 100 microorganismos viables para lograr un resultado positivo (T. Barry, *et.al*; 1993), esta cantidad de microorganismos se asocia generalmente a una etapa avanzada de la enfermedad, por lo que, en estadios tempranos, no serían detectables (J. Bates, *et.al.*, 1986). Algunas de las muestras procesadas podrían haber contado con una baja carga micobacteriana (L.D. Stewart, *et.al*, 2013) al igual que se ha demostrado que los ciclos de congelación-descongelación disminuyen la viabilidad de las micobacterias (Proaño-Pérez, *et.al.*, 2006) que asociada al límite de detección bacteriológico pueden originar disparidad en los resultados obtenidos.

La identificación de micobacterias mediante PCR estuvo sujeta al protocolo propuesto por el CIZ, utilizando el cultivo bacteriológico, la tradicional tinción de Zielh-Neelsen, pruebas bioquímicas y morfología colonial hasta técnicas moleculares como es la de PCR-multiplex y electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teniendo como objetivo la identificación del *M. bovis* y *M. tuberculosis* sea el caso, debido a que esta enfermedad es antropozoonótica. El 2,77% (8/289) resulta positivo para bacteriología y se identifica como micobacterias, posteriormente se realiza la tinción ZN que resulta factible para detectar casos de TBB, sin embargo, la sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo bacteriológico es de 43,5% y 94,4% respectivamente (Proaño-Pérez, *et al.*, 2011). En Burundi, Rigouts y otros aislaron *M. bovis* de 15 de los 82 bovinos muestreados; 78% de los aislados crecieron en medio Stonebrink, que mostró la preferencia de *M. bovis* para este medio (Rigouts L, *et.al.*, 1996).

La comparación analizada entre pruebas, de los 289 bovinos inspeccionados *post-mortem* 164 resultaron negativos para inspección veterinaria ya que no se encontraron lesiones compatibles con la TBB, diferentes autores indican que las partes más afectas por la TBB es el sistema respiratorio (Aponte, 2019) debido a que la principal vía de contagio es la respiratoria (Boukary, *et. al.*, 2012), por lo que fueron evaluados los pulmones y ganglios linfáticos, anteriormente estos bovinos no habían sido diagnosticados por las pruebas simples de tuberculina ni con otros métodos de diagnóstico, por lo que se utilizó el método de observación para verificación de

lesiones compatibles con la TBB, esto se atribuye a que el microorganismo en el hospedador establece una forma de vida intracelular, siendo esta la forma en la que se encuentran en los tejidos blancos (Garbaccio, 2006), cabe recalcar que la sensibilidad y especificidad de esta prueba son bajas al igual que afecta el estado en que se podría encontrar la enfermedad, debido a que si estaba en un estado inicial, se dificulta observar las lesiones.

De las 125 muestras con lesiones compatibles que fueron expuestas a el cultivo bacteriológico, 3 muestras resultaron positivas, la comparación de métodos moleculares con técnicas de rutina como el aislamiento en el diagnóstico de la tuberculosis bovina es difícil, ya que el número y la viabilidad de las micobacterias requeridas en ambas técnicas son diferentes (Estrada-Chávez, *et.al.*, 2004). El cultivo bacteriológico es también conocido como prueba Gold estándar, debido a que mediante esta prueba se confirma la presencia de TBB en bovinos que han sido expuestos anteriormente a las pruebas de tuberculina realizadas en campo (Garbaccio, 2006), tiene una sensibilidad y especificidad de 53% y 88% respectivamente (Biffa, Bogale & Skjerve, 2010) para las micobacterias, por lo cual no se recomienda su empleo como prueba única para el diagnóstico de la TBB, sin embargo, 3 de las 8 muestras resultaron pertenecer al MNT, indicando falsos positivos al *M.bovis*, posiblemente debido a la escasez de microorganismos viables como anteriormente se había mencionado, esto fue confirmado por la técnica de PCR. El cultivo en medio Stonebrink demuestra que es una prueba que tiene altas tasas de detección y confirmación de positivos, teniendo una concordancia moderada con otras técnicas, la desventaja es que requiere de mucho tiempo, pero se puede complementar con otros métodos que favorezcan la eficiencia del diagnóstico acortando los tiempos de respuesta (Patiño, 2015), (Corner L. & Trajstman A., 1998).

Los resultados positivos obtenidos por las pruebas antes mencionadas han sido confirmadas por PCR, indicando así que 5 de las muestras resultaron positivas para las tres pruebas de diagnóstico que fueron utilizadas en este estudio (tabla 11), la técnica molecular (PCR) tiene una sensibilidad y especificidad alta por lo que facilita diferenciar el *M. bovis* de microorganismos que son evolutivamente muy cercanos (Gail, 2020) que estuvieron presentes en las muestras que resultaron positivas para el cultivo bacteriológico, por lo que se corrobora que las sospechas de lesiones *post mórtem* no son necesariamente causadas por *M. bovis* ya que resultan ser causadas por otras micobacterias patógenas (Proaño-Pérez, *et. al.*2006), como lo es *M. avium* que fue encontrada en dos muestras y *M. immunogenum type* encontrada en una

muestra (figura 15), estos hallazgos se relacionan con las micobacterias atípicas que se encuentran normalmente en el ambiente.

El diagnóstico mediante PCR al ser utilizada a partir de colonias aisladas muestra mayor sensibilidad (Rodríguez *et al.* 1999; Sakamoto 1997). Las técnicas de PCR utilizadas para la identificación de MTBC, también han sido utilizados en investigaciones de Proaño-Pérez *et al.* (2006) en la detección de este grupo a partir de tejido en bovinos del camal de Pichincha, además se han empleado en estudios de Ortega (2014) para la identificación de MTBC y MNT que mediante PCR, hubo una gran significancia, por otra parte, Echeverría (2011) determinó una alta Sensibilidad (89.7%) y Especificidad (97.6%) en la detección de este grupo en tejido animal, esto concuerda con otro estudio de Roa (2015) realizado a partir de muestras de leche e indica la alta sensibilidad y especificidad mediante PCR y que corresponde con los cebadores similares a esta investigación.

Las tres pruebas tuvieron concordancia positiva entre sí, confirmando el *M. bovis*, esto quiere decir que, combinando estas pruebas, la sensibilidad de detección aumenta debido a la obtención de resultados positivos en los métodos de esta investigación. En cuanto a la eficiencia, los diferentes métodos sobresalieron cada uno en parámetro diferente, siendo la PCR la prueba más eficiente. Los cultivos, aunque resulten ser más fácil de manipular y más económicos comercialmente, Patiño, (2015), indica que “su costo aumenta al considerar que deben permanecer más de dos meses en incubación” y las colonias deben ser confirmadas por PCR. Sin embargo, cada método demuestra eficiencia al diagnóstico de TBB. De acuerdo a lo descrito en distintos trabajos (Garbaccio *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2008), el cultivo seguido de la tipificación molecular permite avanzar en la resolución de situaciones específicas, brindando además información complementaria y la incorporación de PCR directa de tejido mejora la sensibilidad como así también disminuyendo el tiempo de laboreo requerido para la bacteriología (2 días versus 60 días) (Garbaccio, 2006).

Las herramientas que fueron empleadas en esta investigación, ayudan a localizar animales que no han sido detectados por el método tradicional, sobre todo en explotaciones en donde aparentemente la infección está controlada (Estrada-Chávez, *et.al.*, 2004). Esta investigación ha demostrado la presencia de *M. bovis* en el camal de la ciudad de Tulcán y que podría aportar con el perfeccionamiento del Plan Nacional de control y erradicación de la TBB.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El uso de PCR multiplex permitió la identificación del *M. bovis* en el camal de la ciudad de Tulcán.
- Mediante la inspección veterinaria se encontró 125 lesiones compatibles con la TBB de un total de 289 animales inspeccionados en el camal de Tulcán, provincia del Carchi, dando como resultado una prevalencia de 43,25%.
- El cultivo bacteriológico permitió obtener una prevalencia de 2,77% con 8 muestras positivas de las 125 obtenidas mediante inspección veterinaria.
- Mediante PCR multiplex se obtuvo una prevalencia de 1,7 %, con 5 cepas positivas a *M. bovis*.

5.2. RECOMENDACIONES

- La secuencia de estas tres pruebas empleadas, son eficientes y mejoran la identificación de *M. bovis*, a parte que reducen costos.
- Utilizar el medio de cultivo Stonebrink para un óptimo crecimiento de *M. bovis*.
- Emplear PCR multiplex, para la identificación de *M. bovis* provenientes de cultivos bacteriológicos.
- Realizar eventualmente la prueba de tuberculina, para identificar animales infectados a que posteriormente se debería faenar.
- Realizar más estudios con técnicas moleculares a nivel provincial y en diferentes zonas del país para tener un mayor conocimiento de la presencia de la TBB.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCALIDAD. (2020). Obtenido de GOB.EC: <https://www.gob.ec/arcfz/tramites/solicitud-certificacion-recertificacion-predios-libres-tuberculosis>
- Aníbal Domínguez Odio¹, Rafael Pérez Polanco², Isbel González Marrero³, Raiselys Toirac Proenza⁴, Yanelis Riquenes Garlobo, Yudit Rodríguez Coipel, Isis Acosta Guevara. (2016). *Bionatura*. Obtenido de Mycobacterium bovis: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria: <http://revistabionatura.com/mycobacterium-bovis.html>
- Barrera, L. (2008). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis*. Obtenido de <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/tuberculosis/tb-labs-cultivo> [2].pdf
- Cajal, A. (s.f.). *lifeder*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/investigacion-de-campo/>
- Canal, A. M. (2013). *Tuberculosis bovina: vigilancia epidemiológica en mataderos de la provincia de Santa Fe (Argentina) y evaluación de la respuesta inmune en lesiones granulomatosas de animales infectados*. Obtenido de <https://www.visavet.es/data/tesis/tuberculosis-bovina-vigilancia-epidemiologica-mataderos-santa-fe-argentina-respuesta-inmune-lesiones-granulomatosas-animales-infectados.pdf>
- Cartes, J. C. (2013). *Revista Médica De Costa Rica Y Centroamérica LXX (605) 145-150, 2013*. Obtenido de Breve historia de la tuberculosis: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc131z.pdf>
- Castro, E. (2017). *Análisis de los reportes de resultados de la aplicación de la prueba de tuberculina ano-caudal, en la región de Los Ríos entre los años 2010-2015*. Valdivia-Chile. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2017/fvc355p/doc/fvc355p.pdf>
- Centro de Diagnóstico Veterinario*. (1995).
- Ciro Estrada-Chávez, Fernando Díaz Otero, Camila Arriaga Díaz, Nicolás Villegas-Sepúlveda, Rafael Pérez González, Dante González Salazar. (2004). *Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2004/vm043f.pdf>
- CRESA. (2015). Obtenido de <http://www.cresa.es/granja/tuberculosis.pdf>
- CRESA. (16 de 04 de 2020). Obtenido de SESC: <http://www.cresa.cat/blogs/sesc/lesions-tuberculoses-per-que-cal-confirmar-el-diagnostic/?lang=es>

- Cristina Prat Aymerich, Josep Domínguez Benítez y Vicenç Ausina Ruiz. (s.f.). *Mycobacterium bovis*. SEIMIC. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micobacterias/Mbovis.pdf>
- Cushicóndor, D. (2014). *Prevalencia de tuberculosis bovina (tbb) mediante inspección post-mortem y cultivo bacteriológico en el matadero municipal del cantón Mejía (Pichincha)*. Quito.
- Cynthia W. Brasher, Angelo DePaola, Daniel D. Jones & Asim K. Bej. (1998). *Detection of Microbial Pathogens in Shellfish with Multiplex PCR*. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s002849900346>
- D.Collins, J. (2006). *Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113505004098?via%3Dihub>
- de Kantor I. & Ritacco V. (2006). *An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries*. *Vet Microbiol.* 112(2-4): 111–118.
- Delgado, A. (2013). *Engormix*. Obtenido de La prueba de tuberculina: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/135-prueba_de_tuberculina.pdf
- Demelash Biffa, Asseged Bogale & Eystein Skjerve. (2010). *Springer Link*. Obtenido de Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2458-10-462>
- Dra. Lisset Méndez Fleitas, Dra. Yanet Carmona Denis, Dra. Carmen Escalona Robaina, Dr. Luis Moreno Peña, Dr. Juan Alberto Ortega Peñate. (marzo-abril de 2018). *Epidemiological behavior of tuberculosis*. Obtenido de Scielo: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242018000200010
- Elena Morán López y Yaima Lazo Amador. (2001). Scielo. Obtenido de Tuberculosis: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072001000100005
- Echeverría, G. (2011). *Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) mediante la aplicación de NESTED-PCR en bovinos faenados en los camales municipales de los cantones Cayambe (Pichincha) y Pelileo (Tungurahua)*. Sangolquí.
- Edgar Pérez-Barragán, Bulmaro Manjarrez-Tellezb. (2017). *Tuberculosis por Mycobacterium bovis*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2017/im175s.pdf>
- Fajardo-Gutiérrez. (2017). *Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto*. Obtenido de

- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-91902017000100109
- FAO. (2010). Obtenido de Manejo sanitario eficiente del ganado bovino: principales enfermedades: <http://www.fao.org/3/as497s/as497s.pdf>
- FAO. (2012). Obtenido de Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales: <http://www.fao.org/3/i2811s/i2811s.pdf>
- Feliciano Milián Suazo, Beth Harris, Camila Arriaga Díaz, Bruce Thomsen, Tod Stuber, Dante González Suárez, Genoveva Álvarez Ojeda, Marco A. Santillán Flores, Alberto Morales Loredó, Ciro Estrada Chávez. (2010). *Sensitivity and specificity of nested PCR and spoligotyping as quick diagnostic tests for bovine tuberculosis in fresh tissue.*
- Feliciano Milián Suazo, Beth Harris, Camila Arriaga Díaz, Bruce Thomsen, Tod Stuber, Dante González Suárez, Genoveva Álvarez Ojeda, Marco A. Santillán Flores, Alberto Morales Loredó, Ciro Estrada Chávez. (2010). *Sensitivity and specificity of nested PCR and spoligotyping as quick diagnostic tests for bovine tuberculosis in fresh tissue.*
- Flor Flores; Alfredo Delgado; Armando González Z. y Hermelinda Rivera. (2005). *Determinación de la presencia de tuberculosis bovina en la provincia de Canta, Lima.* Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172005000100009
- Flores, J. (2016). *Fisiología y estructura de las micobacterias.* Obtenido de <https://www.docsity.com/es/fisiologia-y-estructura-de-las-micobacterias-222/654158/>
- Freddy Proaño-Pérez, Leen Rigouts, Jef Brandt, Pierre Dorny, Jorge Ron, Maria-Augusta Chavez, Richar Rodriguez, Krista Fissette, Anita Van Aerde, Françoise Portaels, And Washington Benitez-Ortiz. (2006). *Preliminary observations on mycobacterium spp. In dairy cattle in Ecuador.*
- Freddy Proaño-Pérez; Washington Benítez-Ortiz; Françoise Portaels; Leen Rigouts; Annick Linden. (2011). Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. *Scielo.*
- Gail, M. (2020). *¿Cómo funcionan y en qué se diferencian las PCR y los test rápidos de coronavirus?* Obtenido de <https://gacetamedica.com/investigacion/como-funcionan-y-en-que-se-diferencian-las-pcr-y-los-test-rapidos-de-coronavirus/#:~:text=Las%20PCR%20tienen%20tres%20caracter%C3%ADsticas,en%20las%20primeras%20fases%20respiratorias.>

- Garbaccio. (2006). *Instituto de Patología-INTA*. Recuperado el 15 de mayo de 2019, de Diagnostico in vivo e in vitro de la tuberculosis bovina: http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/tbc/tbc.htm
- Gómez, A. (septiembre de 2009). Obtenido de Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente?: <https://www.analesdepediatria.org/es-micobacterias-no-tuberculosas-una-infeccion-articulo> S1695403309003920#:~:text=Actualmente%20la%20expresi%C3%B3n%20E2%80%9Cmicobacterias%20no,produciendo%20las%20enfermedades%20conocidas%20como%20E2%80%9C
- González, R. M. (noviembre de 2013). *Detección rápida de Mycobacterium tuberculosis complex y de la resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación*. Obtenido de https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/145469/RMG_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Graterol, R. (2011). Obtenido de Metodología de la Investigación: <https://jofillip.files.wordpress.com/2011/03/metodos-de-investigacion.pdf>
- Herrera, E. (2011). *Diagnóstico de tuberculosis bovina, mediante la prueba intradérmica Cervical Comparada en cinco hatos lecheros en la ciudad de Otavalo, provincia Imbabura*. Otavalo.
- I. Dorronsoro, L. Torroba. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Scielo*.
- I. N. de Kantor, P. A. LoBue, C. O. Thoen. (2010). *Human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis in the United States, Latin America and the Caribbean*. Obtenido de SERIALISED ARTICLE.
- ICA. (2016). *Instituto Colombiano Agropecuario*. Obtenido de Programa nacional de prevención, control y erradicación de tuberculosis bovina: <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/convocatoria-publica-de-autorizacion-en-el-diagnos/presentacion-oia-2016-tbb.aspx#:~:text=PRUEBA%20DE%20TUBERCULINA%20CERVICAL%20SIMPLE,de%20las%20pruebas%20mencionadas%20anteriormente>.
- Isabel N. De Kantor, Pedro M. Torres Nora Morcillo, María S. Imaz, María D. Sequeira. (2012). *La tuberculosis zoonótica en la Argentina*. Obtenido de <http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/23241296.pdf>
- Ivan Quinotoa & Juan Chicaiza. (2013). *Análisis de factores de riesgo y determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina utilizando técnicas bayesianas en las provincias de Cotopaxi, Carchi e Imbabura*. Quito.

- J. Bates, P. Brennan, W.G. Douglas, J.C. Feely. (1986). *Improvements in the diagnosis of tuberculosis*.
- Jeffrey Hoorfar y Nigel Cook. (2003). *Critical Aspects of Standardization of PCR*.
- Jesús Viñuelas-Bayóna, María Asunción Vitoriab, Sofía Samper. (2017). *Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia*. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.01.015
- Karina Palacios & Jessica Acosta. (2020). *Prevalencia de Tuberculosis Bovina (TBB) (Mycobacterium spp.) y factores de riesgo asociados, en la Provincia del Carchi.*”.
- Kaur D., Guerin M., Skovierová H., Brennan P., Jackson M. (2009). *Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbio*. 69: 23-78.
- Kiyokazu Murai, Paolo Tizzani, Lina Awada, Lina Mur, Neo J. Mapitse & Paula Caceres. (2019). *Tuberculosis bovina: distribución mundial y aplicación de medidas de prevención y control según los datos de WAHIS*. OIE. Obtenido de <https://oiebulletin.com/?panorama=wahis-tb-es&lang=es>
- Kleeberg, H. (27 de mayo de 1984). *Tuberculosis humana de origen bovino*. Obtenido de OIE: <https://www.oie.int/doc/ged/D12850.PDF>
- L.D. Stewart, J. McNair, L. McCallan, A. Gordon, I.R. Grant. (2013). *Improved detection of Mycobacterium bovis infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods*.
- Lawn SD, Zumla AI. (2011). *Tuberculosis Lancet*.
- Limberth Machado-Villarroel, Jesús Aníbal Acosta-Loya, Isaías Orozco-Andrade, Gregorio Bravo-Rodríguez, Diamanti Abraham Dimakis-Ramírez. (2015). *Determinación del interferón-gamma en tuberculosis: Principios básicos y utilidad*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462015000300007#:~:text=La%20prueba%20IGRA%20\(de%20ingl%C3%A9s,por%20linfocitos%20DT%20sensibilizados%20en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462015000300007#:~:text=La%20prueba%20IGRA%20(de%20ingl%C3%A9s,por%20linfocitos%20DT%20sensibilizados%20en)
- López L., Díaz F., Vallecillo A., Esquivel H., Gutiérrez J. (2005). *Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control*. *Rev Latinoam Microbiol*. 48(2): 173-178.
- López Luz, Díaz Fernando, Vallecillo Antonio, Esquivel Hugo. (2006). *Human and bovine tuberculosis in Latin America: From the studies about virulence to some tools for its control*. *Revista latinoamericana de microbiología* 48(2):173-8. Obtenido de

- https://www.researchgate.net/publication/6259270_Human_and_bovine_tuberculosis_in_Latin_America_From_the_studies_about_virulence_to_some_tools_for_its_control
- Luz María López Marín, Fernando Díaz Otero, Antonio Javier Vallecillo Maza. (2006). *Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control*. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062r.pdf>
- M. C. Bermejo, I. Clavera, F. J. Michel de la Rosa, B. Marín. (2007). *Scielo*. Obtenido de *Epidemiology of tuberculosis*: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000400002
- Mantilla G., Ortiz M., Acosta A., Acosta G., Souza J., (2014). *Diagnostico de tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o hispatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina*. Obtenido de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/Diagnostico-de-tuberculosis-bovina-por-aislamiento-bacteriologico-o-histopatologico-de-vacunos-reactivos-a-la-prueba-de-tuberculina.pdf>
- Martínez, G. C. (2017). *Evaluación de las pruebas de tuberculina y del test de interferón-gamma para el diagnóstico de la tuberculosis bovina y su manejo en los programas de control prueba-sacrificio*. Uruguay.
- Méndez, M. V. (diciembre de 2011). *Scielo*. Obtenido de *La Tuberculosis Pulmonar: Pasado, Presente y Futuro en Venezuela.*: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382011000300010
- Mendoza, E. (2004). *BIOLOGÍA DE LAS MICOBACTERIAS*. Obtenido de http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/pdf/02_biologia.pdf
- N.de Kantor, F. Paolicchi, A. Bernardelli, P.M. Torres, A. Canal, J.R. Lobo, M.A. Zollin de Almeida, L.A. Paredes Noack, J.F. López, A. Garín, A. López Insaurralde, M.L. Boschioli-Cara, A. Cataldi, M. Ambroggi. (2011). *La Tuberculosis Bovina en América Latina. Situación actual y recomendaciones*. Revista. Obtenido de <https://www.veterinariargentina.com/revista/2011/10/la-tuberculosis-bovina-en-america-latina-situacion-actual-y-recomendaciones/>
- Noel, N. (8 de junio de 2020). *Share4Rare*. Obtenido de ¿Por qué es tan importante conocer la historia natural de una enfermedad?: <https://www.share4rare.org/es/news/por-que-es-tan-importante-conocer-la-historia-natural-de-una->

enfermedad#:~:text=La%20importancia%20de%20conocer%20el,curso%20natural%20de%20la%20enfermedad.

- OIE. (2013). Obtenido de https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformati
- OIE. (2018). *Manual Terrestre de la OIE*. Obtenido de Tuberculosis bovina: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf
- OIE. (2019). Obtenido de <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/>
- OMS. (17 de octubre de 2019). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis#:~:text=Datos%20y%20cifras,muerte%20de%20personas%20VIH%2Dpositivas>.
- Onofre, E. (2016). *Evaluación de los medios de cultivo Löwenstein-Jensen y Stonebrink para estimular el crecimiento de Mycobacterium spp.* Sangolquí.
- Orbe, R. (2019). *Prevalencia de tuberculosis bovina en haciendas ganaderas de la Parroquia Tulcán*. Tulcán.
- Ortega, E. (2014). Evaluación del tipo de tejido y medio de cultivo como parámetros determinantes en el aislamiento de *Mycobacterium spp.* Quito.
- Ortiz, J. (s.f.). *Lifeder*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/investigacion-exploratoria/>
- Paillacho Pedro. (2015). *Prevalencia de tuberculosis bovina en la parroquia santa*. Tulcán.
- Panvet. (2008). *Memorias, Tuberculosis bovina*.
- Patiño, A. (2015). *Comparación de cuatro métodos para el diagnóstico de mycobacterium bovis*. Chile. Obtenido de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/145135/Comparacion-de-metodos-para-el-diagnostico-de-Mycobacterium-bovis-en-Chile.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pedro Abalos, Patricio Retamal. (enero de 2005). *Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente?* Obtenido de Researchgate: https://www.researchgate.net/publication/237515129_Tuberculosis_una_zoonosis_re-emergente
- Pedro N. Acha y Boris Szyfres. (2001). Obtenido de Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/709/9275315809.pdf>
- Phillips, C. J. C., Foster, C. R. W., Morris, P. A., & Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science*, 74(1), 1-15. *Research in Veterinary Science*. doi:[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00145-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00145-5)

- Proaño, F. (2005). *Preliminary observations on Mycobacterium SPP. In Dairy Cattle in Ecuador.*
- Proaño-Pérez F., Benítez-Ortiz W., Celi-Erazo M., Ron-Garrido L., Benítez-Capistros R., Portaels F, Rigouts L, Linden A. (2009). *Comparative Intradermal Tuberculin Test in Dairy Cattle in the North of Ecuador and Risk Factors Associated with Bovine Tuberculosis.* Obtenido de <https://scholar.google.com.ec/citations?user=N3SO2NgAAAAJ&hl=es>
- Proaño-Pérez, F., Benitez-Ortiz, W., Desmecht, D., Coral, M., Ortiz, J., Ron, L., Linden, A. (2011). *Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. Preventive Veterinary Medicine, 101(1-2), 65–72.*
- Ramos, E. (2017). *Determinación de prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de hatos ganaderos en la parte baja de la provincia Del Oro. Machala.*
- Ramos, Parra, Sanabria. (2004). *Prevalencia de la tuberculosis bovina, liberación y recertificación de hatos lecheros en Portachuelo.* Obtenido de http://190.186.110.75/sistemabibliotecario/doc_tesis/JULIO%20SANABRIA-20101123-164341.pdf
- Reyes, P. (2012). *Tuberculosis bovina: la importancia de los factores de riesgo en la introducción y exposicion-diseminación de M. bovis en el rebaño bovino. SAG.gob.* Obtenido de https://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_15_I_semestre_2012/libros/monografia_TB_factores_riesgo_PReyes.pdf
- Rigouts L, Maregeya B, Traore H, Collart JP, Fissette K, Portaels. (1996). *Use of DNA restriction fragment typing in the differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from animals and humans in Burundi.*
- Roa, J. E. (2015). *Estudio de la prevalencia de tuberculosis bovina en ganaderías bovinas del cantón Loja. Loja.*
- Robin A. Skuce, M. Siobhan Hughes, Malcolm J. Taylor y Sydney D. Neill. (2003). *Detection of Pathogenic Mycobacteria.*
- Rodríguez, G. (2008). *Mycobacterias.* Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>
- Romero, B. (2010). *Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implantación en sanidad animal y salud pública.* Obtenido de

- <https://www.visavet.es/data/tesis/tuberculosis-bovina-epidemiologia-molecular-implicacion-sanidad-animal-salud-publica.pdf>
- Sachse, K. (2004). *Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens*. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1385/MB:26:1:61>
- Sebastián Méndez-Álvarez, Eduardo Pérez-Roth. (2004). *Multiplex PCR in clinical microbiology*. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027>
- SENASA. (2014). Obtenido de MANUAL ILUSTRADO EN TUBERCULOSIS para el personal en la inspección veterinaria en frigoríficos y mataderos bovinos: file7896-manual_tuberculosis_en_faena_2014%20(1).pdf
- SENASA. (2019). *Protocolo de vigilancia y control de tuberculosis*. Costa Rica.
- Sergio Rivera P., José Francisco Jiménez y Jacobus Deward. (2009). *Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del estado Zulia, Venezuela*. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000600003
- Szyfres, B. (2001). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=L8XcAflAuVcC&pg=PA271&lpg=PA271&dq=El+bovino+es+sumamente+resistente+a+M.+tuberculosis,+y+este+no+suele+ocasionarle+lesiones+anatomopatol%C3%B3gicas.+En+varios+pa%C3%ADses+se+ha+podido+aislar+M.+tuberculosis+de+los+gan>
- T. Barry, M. Glenon, T. Smith, F. Gannon. (1993). *Detection of Mycobacterium bovis in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods*.
- Terreno, F. (2014). *PCR para vigilancia epidemiológica de Tuberculosis bovina*. INTA. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/864/86431785002.pdf>
- Torres, P. (2015). SENASA. Obtenido de Pruebas de diagnóstico de campo: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1012-9.pdf
- Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguec C., Wölbeling F., Kubica T., Kremer K., van Soolingen D., Rüsche-Gerdes S., Loch C., Brisses S., Meyer A., Supply P., Niemann S. (2008). *Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex*. *PLoS Pathog.*

- World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation. (2017). *Roadmap for zoonotic tuberculosis*. Obtenido de https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Tuberculosis/Roadmap_zoonotic_TB.pdf
- Yuenlab*. (2020). Obtenido de <http://yuenlab.com/pcr-2/>
- Z. Rahim J. Thapa Y. Fukushima A. G. M. van der Zanden S. V. Gordon Y. Suzuki C. Nakajima. (2016). *Tuberculosis Caused by Mycobacterium orygis in Dairy Cattle and Captured Monkeys in Bangladesh: a New Scenario of Tuberculosis in South Asia*. doi:<https://doi.org/10.1111/tbed.12596>
- Zumárraga M, Meikle V., Bernardelli A., Abdala A., Tarabla H., Romano M., Cataldi A. (2005). *Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity detection of Mycobacterium bovis*.

V. ANEXOS

Anexo 1: Certificado o Acta del Perfil de Investigación



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO



ACTA

DE LA SUSTENTACIÓN DE PREDEFENSA DEL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN

NOMBRE Rosas Tapia Jéssica Pamela
NIVEL/PARALELO: 0

CÉDULA DE IDENTID 0401628219
PERIODO ACADÉMICO nov 2020 - Marzo 2021

TEMA DEL TIC: "Prevalencia de Tuberculosis bovina TBB mediante el uso de aislamiento microbiológico de lesiones compatibles de la enfermedad en animales faenados en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi"

Tribunal designado por la dirección de esta Carrera, conformado por:

PRESIDENTE: DR. BALAREZO URRESTA LUIS RODRIGO
DOCENTE TUTOR: MSC. IBARRA ROSERO EDISON MARCELO
DOCENTE: MSC. CAMPOS VALLEJO ROLANDO MARTIN

De acuerdo al artículo 32: Una vez entregados los documentos; y, cumplidos los requisitos para la realización de la pre-defensa el Director/a de Carrera designará el Tribunal, fijando lugar, fecha y hora para la realización de este acto:

EDIFICIO DE AULAS 0 **AULA:** virtual

FECHA: lunes, 15 de marzo de 2021

HORA: 16H00

Obteniendo las siguientes notas:

1) Sustentación de la predefensa: 5,20

2) Trabajo escrito 2,60

Nota final de PRE DEFENSA 7,80

Por lo tanto: **APRUEBA CON OBSERVACIONES** ; debiendo acatar el siguiente artículo:

Art. 36.- De los estudiantes que aprueban el informe final del TIC con observaciones.- Los estudiantes tendrán el plazo de 10 días para proceder a corregir su informe final del TIC de conformidad a las observaciones y recomendaciones realizadas por los miembros del Tribunal de sustentación de la pre-defensa.

Para constancia del presente, firman en la ciudad de Tulcán el lunes, 15 de marzo de 2021



**LUIS RODRIGO
BALAREZO
URRESTA**

DR. BALAREZO URRESTA LUIS RODRIGO

PRESIDENTE



**EDISON MARCELO
IBARRA ROSERO -
1002419873**

**MSC. IBARRA ROSERO EDISON MARCELO
DOCENTE TUTOR**



**ROLANDO MARTIN
CAMPOS VALLEJO**

**MSC. CAMPOS VALLEJO ROLANDO MARTIN
DOCENTE**



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
FOREIGN AND NATIVE LANGUAGE CENTER

Informe sobre el Abstract de Artículo Científico o Investigación.

Autor: Jéssica Pamela Rosas Tapia

Fecha de recepción del abstract: 22 de marzo de 2021

Fecha de entrega del informe: 22 de marzo de 2021

El presente informe validará la traducción del idioma español al inglés si alcanza un porcentaje de: 9 – 10 Excelente.

Si la traducción no está dentro de los parámetros de 9 – 10, el autor deberá realizar las observaciones presentadas en el ABSTRACT, para su posterior presentación y aprobación.

Observaciones:

Después de realizar la revisión del presente abstract, éste presenta una apropiada traducción sobre el tema planteado en el idioma Inglés. Según los rubrics de evaluación de la traducción en Inglés, ésta alcanza un valor de 9, por lo cual se validó dicho trabajo.

Atentamente



EDISON PEÑAFIEL ARCOS
EDISON PEÑAFIEL ARCOS
PEÑAFIEL ARCOS

Ing. Edison Peñafiel Arcos MSc
Coordinador del CIDEN

Anexo 3: Palpación de lesiones compatibles.



Anexo 4: Inspección Veterinaria.



Anexo 5 Inspección de lesiones compatibles.



Anexo 6 Incubación de muestras.



Anexo 7 Cultivo Stonebrink

