

LUIS
AGUSTIN
CONDOLO
ORTIZ

Firmado digitalmente por LUIS
AGUSTIN CONDOLO ORTIZ
DN: cn=LUIS AGUSTIN
CONDOLO ORTIZ c=EC
l=RIOBAMBA
Motivo: Soy el autor de este
documento
Ubicación:
Fecha: 2020-09-01 21:40:05:00



CESAR
ANTONIO
CAMACHO
LEON

Firmado digitalmente
por CESAR ANTONIO
CAMACHO LEON
Fecha: 2020.09.02
09:48:50 -05'00'

CALIFICACIÓN 20/20

CALIFICACIÓN 20/20

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“DETERMINACION DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS
BOVINA MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE
POLIMERASA EN EL CAMAL MUNICIPAL DE RIOBAMBA”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA ZOOTECNISTA

AUTOR: BRENDA PAMELA GUANANGA GUTIERREZ

DIRECTOR: DR. LUIS AGUSTIN CONDOLO ORTIZ. M.Sc.

Visto Bueno

MARCELO
EDUARDO
MOSCO
GOMEZ

Firmado digitalmente por MARCELO
EDUARDO MOSCO GOMEZ
DN: cn=MARCELO EDUARDO
MOSCO GOMEZ c=EC
o=SECURITY DATA S.A. 1
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
INFORMACION
Motivo: Soy el autor de este documento
Ubicación:
Fecha: 2020-09-10 17:06:05:00

Riobamba – Ecuador
2020

**WILSON
VITALIANO
ONATE**

Firmado digitalmente por WILSON
VITALIANO ONATE VITERI
DN: cn=WILSON VITALIANO
ONATE VITERI c=EC
o=SECURITY DATA S.A. 1
ou=ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE
INFORMACION
Motivo: Soy el autor de este

DIRECTOR ZOOTECNIA

VITERI

documento
Ubicación: Riobamba
Fecha: 2020-09-16 09:01:05:00

© 2020, **Brenda Pamela Guananga Gutiérrez**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, **Brenda Pamela Guananga Gutiérrez**, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

Riobamba, 19 de noviembre del 2020

Brenda Pamela Guananga Gutiérrez
060394440-6

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo: Proyecto de Investigación, “**DETERMINACION DE LA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DEPOLIMERASA EN EL CAMAL MUNICIPAL DE RIOBAMBA**”, de responsabilidad de la señorita: **BRENDA PAMELA GUANANGA GUTIERREZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
	ANTONIO VINICIO MURILLO RIOS <small>Firmado digitalmente por ANTONIO VINICIO MURILLO RIOS Fecha: 2021.01.08 05:50:14 -05'00'</small>	19-11-2020
Dr. Antonio Vinicio Murillo Rios PRESIDENTE DE TRIBUNAL		
	LUIS AGUSTIN CONDOLO ORTIZ <small>Firmado digitalmente por LUIS AGUSTIN CONDOLO ORTIZ DN: cn=LUIS AGUSTIN CONDOLO ORTIZ c=EC l=RIOBAMBA Motivo: Soy el autor de este documento Ubicación: Fecha: 2021-01-07 11:40-05:00</small>	19-11-2020
Dr. Luis Agustín Condolo Ortiz. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		
	CESAR ANTONIO CAMACHO LEON <small>Firmado digitalmente por CESAR ANTONIO CAMACHO LEON Fecha: 2021.01.07 09:35:50 -05'00'</small>	19-11-2020
Dr. Cesar Antonio Camacho León MIEMBRO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a cada uno de los miembros de mi familia; padres, hermanas, tíos y primos, quienes han hecho de mi la persona que soy ahora, y estaré eternamente agradecida por eso.

Brenda Pamela Guananga Gutiérrez.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a toda mi familia y amigos más cercanos por alentarme en los momentos más difíciles de mi carrera, pero especialmente a mi abuela Grecia Antonieta Díaz Andrade, quien con todo su amor y paciencia me ha sabido mantenerme a flote en las peores circunstancias, y a Santiago Cáceres quien durante toda la carrera ha sabido ser amigo, pareja y una persona espectacular. El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Carrera de Ingeniería Zootécnica, por permitirme cursar por sus aulas brindándome conocimientos fundamentales para mi vida profesional. A mis maestros y asesores externos que formaron parte de este camino, y que aportaron con sus conocimientos para poder alcanzar esta meta.

Brenda Pamela Guananga Gutiérrez.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I

1.	MARCO TEORICO REFERENCIAL.....	3
1.1.	Tuberculosis bovina	3
1.1.1.	<i>Definición</i>	3
1.1.2.	<i>Genero Mycobacterium</i>	3
1.1.2.1.	<i>Clasificación del género Mycobacterium.....</i>	4
1.1.2.2.	<i>Micobacterias de crecimiento rápido.....</i>	4
1.1.2.3.	<i>Micobacterias de crecimiento lento</i>	5
1.1.3.	<i>El complejo Mycobacterium tuberculosis (MTC)</i>	5
1.1.4.	<i>Especie Mycobacterium bovis.....</i>	6
1.1.4.1.	<i>Morfología y caracterización</i>	7
1.1.4.2.	<i>Naturaleza de la envoltura de M. bovis.....</i>	8
1.1.4.3.	<i>Genética.....</i>	8
1.1.4.4.	<i>Diferencias entre M. tuberculosis y M. bovis.....</i>	8
1.1.4.5.	<i>Mycobacterium bovis en humanos</i>	9
1.1.4.6.	<i>Mycobacterium tuberculosis en el ganado bovino.....</i>	10
1.1.5.	<i>Factores predisponentes en bovinos.....</i>	11
1.1.6.	<i>Patogenia.....</i>	11

1.1.6.1.	<i>Proceso patológico.....</i>	<i>13</i>
1.1.7.	<i>Transmisión.....</i>	<i>14</i>
1.1.8.	<i>Síntomas y lesiones.....</i>	<i>15</i>
1.1.8.1.	<i>Lesiones post mortem</i>	<i>15</i>
1.1.9.	<i>Técnicas de diagnóstico</i>	<i>16</i>
1.1.9.1.	<i>Diagnóstico Clínico.....</i>	<i>16</i>
1.1.9.2.	<i>Diagnóstico diferencial</i>	<i>16</i>
1.1.9.3.	<i>Pruebas Intradérmicas de PPD.....</i>	<i>17</i>
1.1.9.4.	<i>Prueba de Tuberculina.....</i>	<i>17</i>
1.1.9.5.	<i>Prueba intradérmica comparativa</i>	<i>18</i>
1.1.9.6.	<i>Macroscópica</i>	<i>18</i>
1.1.9.7.	<i>Prueba de ELISA</i>	<i>18</i>
1.1.9.8.	<i>La tinción de Ziehl Neelsen</i>	<i>19</i>
1.1.9.9.	<i>Cultivo in vitro.....</i>	<i>19</i>
1.1.9.10.	<i>Reacción en cadena de polimerasa</i>	<i>20</i>
1.1.9.11.	<i>PCR múltiplex.....</i>	<i>21</i>
1.1.10.	<i>Tratamiento</i>	<i>21</i>
1.1.11.	<i>Prevención, Control y erradicación.....</i>	<i>22</i>
1.1.12.	<i>Pérdidas económicas.....</i>	<i>23</i>
1.1.13.	<i>Epidemiología.....</i>	<i>24</i>
1.1.13.1.	<i>Tuberculosis bovina en seres humanos a nivel mundial</i>	<i>24</i>
1.1.13.2.	<i>Tuberculosis bovina en seres humanos en el Ecuador.....</i>	<i>25</i>
1.1.13.3.	<i>Tuberculosis bovina en ganado bovino a nivel mundial</i>	<i>25</i>
1.1.13.4.	<i>Tuberculosis bovina en ganado bovino a nivel del Ecuador.....</i>	<i>26</i>

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO REFERENCIAL.....	29
2.1.	Localización y duración del experimento	29
2.2.	Unidades experimentales.....	29
2.3.	Materiales, equipos y reactivos	30
2.3.1.	Materiales	30
2.3.1.1.	<i>Materiales de campo</i>	<i>30</i>
2.3.1.2.	<i>Materiales de laboratorio.....</i>	<i>31</i>
2.3.2.	Equipos	31

2.3.3.	Reactivos	32
2.3.3.1.	<i>Reactivos para el cultivo in vitro</i>	32
2.3.3.2.	<i>Reactivos Para PCR multiplex</i>	32
2.4.	Tratamiento y diseño experimental	32
2.5.	Mediciones experimentales	32
2.6.	Análisis estadístico y pruebas de significancia	33
2.7.	Procedimiento experimental	33
2.7.1.	Toma de muestras	33
2.7.1.1.	<i>Procesamiento de las muestras en el laboratorio</i>	34
2.7.1.2.	<i>Descontaminación</i>	34
2.7.1.3.	<i>Preparación de medios de cultivo para micobacterias</i>	35
a.	<i>Procedimiento LOWENSTEIN-JENSEN</i>	35
b.	<i>Procedimiento STONEBRINK</i>	35
2.7.2.	Siembra	36
2.7.3.	Baciloscopia	36
2.7.4.	Extracción de DNA	36
2.7.5.	PCR multiplex	37
2.7.6.	Electroforesis	38
2.8.	Metodología de evaluación	39
2.8.1.	<i>Descripción de la toma de muestras</i>	39
2.8.2.	<i>Identificación del complejo Mycobacterium tuberculosis por cultivo bacteriológico</i>	41
2.8.3.	<i>Identificación de la cepa M. bovis por PCR multiplex</i>	42
2.8.4.	<i>Análisis de la TBB con las variables independientes (edad, sexo y procedencia)</i>	42
2.8.5.	<i>Prevalencia de Tuberculosis bovina</i>	43

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
3.1.	Prevalencia de tuberculosis bovina	44
3.2.	ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS DE ASOCIACIÓN DE CHI-CUADRADO	46
3.2.1.	<i>Análisis de la tuberculosis bovina de acuerdo a la edad</i>	46

3.2.2.	<i>Análisis de la tuberculosis bovina de acuerdo al sexo.....</i>	49
3.2.3.	<i>Análisis de la tuberculosis bovina de acuerdo a la procedencia.....</i>	51
3.2.3.1.	<i>Provincia</i>	51
3.2.3.2.	<i>Cantón</i>	53
CONCLUSIONES		56
RECOMENDACIONES		57
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía y principales huéspedes del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Tabla 2-1:	Porcentajes de prevalencia de Tuberculosis bovina en Ecuador, basado en investigaciones aisladas realizadas desde el año 2008 hasta el 2019	27
Tabla 1-2:	Condiciones meteorológicas de la ciudad de Riobamba.....	29
Tabla 2-2:	Bandas de identificación y secuencia de primers utilizados para el master mix	37
Tabla 3-2:	Reactivos utilizados para el master mix.....	38
Tabla 4-2:	Parámetros ingresados en el termociclador.....	38
Tabla 5-2:	Muestras positivas al cultivo bacteriológico y tinción Ziehl Neelsen	42
Tabla 6-2:	Muestras positivas al PCR multiplex	42
Tabla 1-3:	Prevalencia de tuberculosis bovina en el camal municipal de Riobamba	44
Tabla 2-3:	Tabla de Chi-cuadrado entre la edad de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina.....	47
Tabla 3-3:	Tabla de Chi-cuadrado entre el sexo de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina.....	49
Tabla 4-3:	Tabla de Chi-cuadrado entre la provincia de procedencia de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina	51
Tabla 5-3:	Tabla de Chi-cuadrado entre el cantón de procedencia de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Situación epidemiológica de la Tuberculosis bovina en el Ecuador, en base a investigaciones aisladas realizadas desde el año 2008 al 2019	28
Gráfico 1-2:	Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba por edad	39
Gráfico 2-2:	Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba por sexo	40
Gráfico 3-2:	Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba según su procedencia por provincia.....	40
Gráfico 4-2:	Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba según su procedencia por provincia.....	41
Gráfico 1-3:	Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según la edad de los bovinos muestreados	47
Gráfico 2-3:	Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según el sexo de los bovinos muestreados	49
Gráfico 3-3:	Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según la provincia de procedencia de los bovinos muestreados.....	51
Gráfico 4-3:	Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según el cantón de procedencia de los bovinos muestreados	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Porcentaje de todos los casos de tuberculosis.....	25
Figura 2-1:	Distribución mundial de la tuberculosis bovina en 2017 y el primer semestre del 2018 Fuente: (Murai et al., 2019, pág. 3)	26

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A.** Registro de muestreo - Tuberculosis bovina
- ANEXO B.** Recolección de muestras ganglionares y de pulmón de bovinos faenados en el Camal Municipal de Riobamba
- ANEXO C.** Registro de los bovinos muestreados
- ANEXO D.** Procesamiento de las muestras tomadas en el laboratorio de microbiología (CIZ)
- ANEXO E.** Preparación de medios de cultivos (Stonebrink y Lowestein Jensen) y siembra de las muestras
- ANEXO F.** Crecimiento de mycobacterias en los medios de cultivo
- ANEXO G.** Tinción Zeinhn Nelsen y observación de los bacilos
- ANEXO H.** Procesamiento de las muestras en el laboratorio de biología molecular(CIZ)
- ANEXO I.** Electroforesis y verificación del segmento de ADN amplificado
- ANEXO J.** Reporte de resultados

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la prevalencia de Tuberculosis bovina (TBB) en base a la identificación de su agente etiológico *M.bovis*, en bovinos faenados en el Camal Municipal de Riobamba, a través de la técnica molecular Reacción en cadena de polimerasa (PCR) realizado en el laboratorio de biología molecular del Centro Internacional de Zoonosis. El estudio consistió en tomar muestras de; pulmón, tejido mamario, y ganglios linfáticos de 384 bovinos, e identificar la edad, sexo y procedencia de cada uno de ellos para que a través de la prueba Chi-cuadrado (X^2) se determine si existe o no una asociación estadística significativa entre dichas variables y la presencia de TBB. Las muestras fueron sometidas a un aislamiento microbiológico y a baciloscopia para identificar la presencia de *Mycobacterium spp.* (bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*) y mediante PCR para confirmar la especie *M. bovis*. Los resultados obtenidos fueron; dos muestras positivas a *Mycobacterium spp* y en ambas se confirmó la presencia de la especie *M. bovis*, es decir, se obtuvo una prevalencia de TBB en el Camal Municipal de Riobamba del 0.52% (2/384), los casos positivos pertenecían a la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, eran hembras y se encontraban en un rango de edad entre (24-36) y (50-62) meses. Sin embargo no se encontró asociación estadística significativa entre la presencia de la enfermedad y las variables mencionadas. Descartando así una posible zoonosis en el camal de estudio, no obstante, se recomienda realizar pruebas moleculares como diagnóstico de la enfermedad en muestras de bovinos provenientes de la misma zona, para validar esta técnica como herramienta de control y vigilancia epidemiológica.

Palabras clave:

<TUBERCULOSIS BOVINA>, < REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA>, <GANGLIOS LINFÁTICOS>, <BACTERIA (*Mycobacterium bovis*)>, < *MYCOBACTERIUM SPP.*>, < PREVALENCIA>, < AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO>, <BACILOSCOPIA>, < EPIDEMIOLOGICA>, <ZOOONOSIS>

LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS

Firmado digitalmente por
LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Nombre de
reconocimiento (DN):
c=EC, l=RIOBAMBA,
serialNumber=060276697
4, cn=LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Fecha: 2020.09.17 10:19:15
-05'00'



0294-DBRAI-UPT-2020

ABSTRACT

The purpose of this work was to determine the prevalence of Bovine Tuberculosis (TBB) based on the identification of its etiological agent *M.bovis*, in cattle slaughtered in the Camal Municipal de Riobamba, through the molecular technique Polymerase chain reaction (PCR) performed in the molecular biology laboratory of the International Center for Zoonoses. The study consisted of taking samples from; lung, mammary tissue, and lymph nodes of 384 bovines, and identify the age, sex and origin of each one of them so that through the Chi-square test (X²) it is determined whether or not there is a significant statistical association between these variables and the presence of TBB. The samples were subjected to microbiological isolation and smear microscopy to identify the presence of *Mycobacterium spp.* (bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex) and by PCR to confirm the species *M. bovis*. The results obtained were; Two samples positive for *Mycobacterium spp* and the presence of the *M. bovis* species was confirmed in both, that is, a TBB prevalence was obtained in the Camal Municipal de Riobamba of 0.52% (2/384), the positive cases belonged to the Chimborazo province, Riobamba canton, were female and were in an age range between (24-36) and (50-62) months. However, no significant statistical association was found between the presence of the disease and the mentioned variables. Thus ruling out a possible zoonosis in the study slaughterhouse, however, it is recommended to carry out molecular tests to diagnose the disease in samples of bovines from the same area, to validate this technique as a tool for epidemiological control and surveillance.

Keywords:

<BOVINE TUBERCULOSIS>, <POLYMERASE CHAIN REACTION>, <LYMPHATIC
GANGLIA>, <BACTERIA (Mycobacterium bovis)>, <MYCOBACTERIUM SPP.>,
<PREVALENCE>, <MICROBIOLOGICAL ISOLATION>, <BACILOSCOPIA>,
<BACILOSCOPIA> ZOONOSIS>

INTRODUCCIÓN

La actividad ganadera en el Ecuador constituye una alternativa financiera importante, ofreciendo productos como carne, leche y sus derivados, en sustento a la alimentación humana y aportando a la solución de problemas socioeconómicos, culturales, migratorios, entre otros; que son originados a causa de un acelerado crecimiento poblacional, especialmente en el sector rural. Sin embargo, al igual que otras actividades pecuarias, esta se encuentra sujeta a factores limitantes como la baja eficiencia productiva, provocada principalmente por la presencia en el medio de enfermedades infectocontagiosas como es el caso de la tuberculosis bovina.

La tuberculosis bovina, es una enfermedad distribuida ampliamente en todo el mundo, y varios autores afirman la existencia de su género hace aproximadamente 150 millones de años. El agente etiológico es el *Mycobacterium bovis*, y su principal hospedador es el ganado bovino, aunque también ha llegado a infectar a seres humanos hasta provocar su muerte, razón por la que es considerada una enfermedad de carácter zoonótica que compromete la salud pública y la seguridad alimentaria (Crispell et al., 2019 pág. 12).

Existen evidencias de Tuberculosis bovina en el Ecuador, basándose en pruebas diagnósticas *in vivo*, principalmente la de la tuberculínica, realizadas en fincas por diferentes estudiantes de universidades, e *in vitro* con pruebas de laboratorio más sensibles y específicas como el cultivo y baciloscopia realizadas con muestras obtenidas en camales municipales donde llegan animales de diferentes cantones y parroquias de la provincia de estudio. También existen investigaciones en cuanto al desarrollo y aplicación de pruebas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad, como el PCR, que sirve para amplificar una sección específica de ADN y así poder identificar y diferenciar las bacterias presentes en las muestras (Lorente et al., 2019 pág.5).

El estudio de la prevalencia de la TBB toma relevancia en la ganadería, al ser una enfermedad de declaración obligatoria según la Organización Mundial de Sanidad Animal, causando pérdidas económicas en la producción, restricciones comerciales, muerte del animal y puede permanecer en la vida silvestre afectando así a todo el ecosistema, y los ganaderos al conocer las medidas de contingencia que deben tomarse con dicha enfermedad, evitan notificar a las autoridades respectivas por miedo a las pérdidas y limitaciones de su producción (Bryne et al., 2017 pág. 11).

En base a lo mencionado anteriormente, el crecimiento anual de bovinos en el país, el limitado uso de pruebas de laboratorio, poca eficacia en la inspección post-mortem y falta de vigilancia sanitaria, han llevado a que la enfermedad se disemine con rapidez y facilidad, complicando la aplicación de un sistema de control y de vigilancia epidemiológica en el país.

Al ser esta una enfermedad que no cuenta con registros adecuados de animales positivos a las diferentes pruebas ante-mortem y post-mortem en camales, y desconociéndose la situación epidemiológica en la provincia, se ha tomado la decisión de utilizar la Reacción en Cadena de

Polimerasa en muestras obtenidas del Camal Municipal de Riobamba, lo cual permitirá la detección rápida y segura de bovinos afectados por Tuberculosis bovina, ya que es un método que logra diferenciar entre el género de *M. bovis* y *M. tuberculosis hominis*, bacterias que comparten el 99.95% de similitud en su genoma, lo que pruebas de tuberculización y análisis microbiológicos no logran determinar con certeza absoluta, y al ser estas las pruebas utilizadas con mayor frecuencia se corre el riesgo de presentar reacciones cruzadas y un aislamiento de baja sensibilidad (Michelet et al., 2018 pág. 7).

Es así como en base a este método molecular se logrará descartar falsos positivos y evitar pérdidas económicas innecesarias en la producción, así como falsos negativos que comprometan la salud pública. Por lo expuesto anteriormente los objetivos fueron:

- Determinar la prevalencia de Tuberculosis Bovina por medio de la técnica de Reacción en cadena de Polimerasa (PCR) en el Camal Municipal de Riobamba
- Diagnosticar los casos de Tuberculosis en bovinos mediante el aislamiento microbiológico utilizando muestras de pulmón, tejido mamario y ganglios linfáticos
- Determinar la especie de *Mycobacterium tuberculosis* presente en los casos de Tuberculosis en bovinos a través de la técnica molecular de PCR.
- Analizar posibles relaciones entre edad, sexo, y procedencia del ganado con presencia y/o ausencia de Tuberculosis Bovina.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

1.1. Tuberculosis bovina

1.1.1. *Definición*

La tuberculosis bovina, es una enfermedad infectocontagiosa, zoonótica, cuyo agente etiológico es la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), su principal hospedero es el ganado bovino; aunque también se lo ha identificado en animales salvajes, domésticos y en el ser humano, destacándose así su relevancia en la salud pública. Provoca deterioro paulatino de la salud animal, manifestándose varios años después con problemas respiratorios, digestivos y por último la muerte, su particularidad sintomática es la manifestación de granulomas en ganglios linfáticos, cuyo diámetro es aproximadamente de 1 a 2 cm o también tubérculos formados a partir del crecimiento y calcificación de uno o varios de ellos. El *M. bovis* tiene una morfología bacilar, es ácido alcohol resistente, de crecimiento lento en medios de cultivo, y aerobio estricto. Al ser una enfermedad de declaración obligatoria e inmediata ante organizaciones gubernamentales, provoca pérdidas significativas para el sector agropecuario (Nuques, 2019 pág. 4).

1.1.2. *Genero Mycobacterium*

Su nombre significa bacilo similar a un hongo, el cual proviene del griego <<myces>> que significa hongo y <<bakterium>> pequeña varilla. *Mycobacterium* es un género de bacterias Gram positivas con forma bacilar, encorvados o rectos, miden entre 0,2 a 0,6 x 1 a 10 µm, carecen de movimiento, no crean esporas, y necesitan de oxígeno para sobrevivir (Carrol y Jawetz, 2016; citado en Cruz y Pozo, 2019 pág. 5)

La característica destacable del género es que su pared celular, posee un contenido de entre (20-60%) de lípidos, y en mayor cantidad ácidos micólicos. Se ha identificado también la presencia de una capa serosa que provee a la membrana plasmática características de hidrofobicidad,

solidez, resistencia a la desecación y a microorganismos, la lenta tasa de crecimiento también se incluye entre una de sus características, sin embargo, son altamente sensibles a la radiación ultravioleta, luz solar, calor y por ende a la pasteurización (Albéitar, 2012 pág. 72).

1.1.2.1. *Clasificación del género Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* abarca aproximadamente a 120 especies reconocidas, que en su gran mayoría son de carácter patógeno y oportunista, desarrollando enfermedades tales como la lepra, úlcera de Buruli y tuberculosis, las cuales se manifiestan en una amplia gama de hospederos, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Durnez et al., 2008; citado en Echeverría, 2011 pág. 5).

Se han desarrollado múltiples clasificaciones de este género a lo largo de los años, tomando en cuenta principalmente aquellas características fenotípicas, como la elaboración de pigmentos bajo condiciones de luz y/u oscuridad, y no es sino hasta finales del siglo pasado que se consideró también características genotípicas. La clasificación más fácil y generalizada es aquella que divide las micobacterias en dos grupos: micobacterias no cultivables o difícilmente cultivables (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y cultivables. Esta última abarca una subdivisión conformada por micobacterias de crecimiento rápido (aquellas que desarrollan colonias visibles en menos de 7 días), y las de crecimiento lento (aquellas que tardan más de 7 días en producir colonias visibles) (Romero , 2012 pág. 3).

1.1.2.2. *Micobacterias de crecimiento rápido*

Este grupo comprende gran parte de las especies saprofitas, también llamadas “micobacterias atípicas”, “micobacterias ambientales” o “micobacterias no tuberculosas”, encontrándose ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Algunas de estas especies son poco patógenas, mientras que otras al ser menos difusas presentan un alto valor predictivo de enfermedad; existen otras que no tienen relevancia clínica aun conocida y cada vez es más frecuente encontrar nuevas especies no identificadas previamente (Dorrnsoro y Torroba, 2007 pág. 67).

Se distinguen más de 500 cepas las cuales presentan mayor frecuencia de aislamiento, como la *M. aquae* con las variedades a, b, c, seguidas de *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. vaccae* y *M. scrofulaceum* (Rodríguez ,2010; citados en Paccha, 2012 pág. 8).

1.1.2.3. *Micobacterias de crecimiento lento*

A este grupo pertenece el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), que contiene a todas las especies que causan tuberculosis en humanos y en mamíferos como es el caso de la *Mycobacterium bovis*. El complejo *Mycobacterium avium* (MAC), que también forma parte de este grupo, posee una alta relevancia en el área veterinaria y en medicina humana (Romero 2012 pág. 4).

El *M. avium* puede infectar tanto a bovinos y como a suinos, sin causar ningún tipo de sintomatología clínica, generando problemas al momento de establecer programas de erradicación de la enfermedad (Cordero y Salas 1994; citados en Paccha, 2012 pág. 8).

1.1.3. *El complejo Mycobacterium tuberculosis (MTC)*

Son algunas las micobacterias que juegan un papel relevante dentro de la salud animal: como la *Mycobacterium bovis*, cuyo hospedero principal es el ganado bovino; *M. avium* (*M. avium subsp.*) la cual ocasiona tuberculosis en aves y en varios mamíferos más; *M. johnei* (*M. avium subsp. paratuberculosis*), agente etiológico de la paratuberculosis y *M. caprae* responsable de la tuberculosis en cabras (Aranaz et al., 2003; citado en Suquilanda, 2015 pág. 8).

Varios de los patógenos que conforman este grupo prevalecen en los seres humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. Canetti*) o infectan roedores (*M. microti*), debido a su potencial zoonótico, y es por esta razón que presentan una alta relevancia en la salud pública, también consiguen transmitirse por el medio ambiente hacia la vida silvestre, involucrando a varios países desarrollados y sub desarrollados. La taxonomía y clasificación del complejo MTC se indican en la tabla 1-1 (Biet et al., 2005; citado en Suquilanda 2015 pág. 9).

Tabla1-1: Taxonomía y principales huéspedes del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Reino	Bacteria	
Filum	Actinobacteria	
Clase	Actinobacteria	
Subclase	Actinobacteridae	
Orden	Actinomycetales	
Suborden	Corynebacterineae	
Familia	Mycobacteriaceae	
Género	<i>Mycobacterium</i>	
<hr/>		
Especie	<i>M. africanum</i>	TB en humanos en África (de Jong <i>et al.</i> , 2010)
	<i>M. tuberculosis</i>	TB en humanos
	<i>M. bovis</i>	TB en bovinos y humanos
	<i>M. canettii</i>	TB en humanos menos virulencia que <i>M</i>
	<i>M. microti</i>	Tuberculosis (Somoskovi <i>et al.</i> , 2009)
	<i>M. pinnipedii</i>	TB en roedores pequeños (Burthe <i>et al.</i> , 2008)
	<i>M. caprae</i>	TB en focas (Cousins <i>et al.</i> , 2003)
		TB en cabras (Aranaz <i>et al.</i> , 2003)

Fuente: (Echeverría, 2011 pág. 7)

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

Las bacterias del complejo *M. tuberculosis* concuerdan entre ellas con >99,9% de similitud en su genética, y con idénticas secuencias de genes de ARN 16S ribosomal. Las diferencias secuenciales en su estructura genética proponen que el patógeno se ha diseminado a nivel mundial hace relativamente poco tiempo bajo términos evolutivos (Sreevatsan *et al.*, 1997; citado en Suquilanda 2015 pág. 9).

La identificación de estas especies se ha realizado generalmente basándose en sus características patógenas y fenotípicas, desarrollándose así una amplia gama de pruebas bioquímicas, como la reducción de nitratos, la producción de niacina, o la resistencia a la piracinamida, y según las propiedades del medio de cultivo que permite diferenciar entre varias especies de micobacterias (Romero, 2012 pág. 7).

1.1.4. *Especie Mycobacterium bovis*

Fue identificada por primera vez en animales domésticos, incluyendo una gran variedad de especies de mamíferos, motivo por el cual es considerado uno de los bacilos tuberculosos con el rango de hospedadores más amplio en comparación con los otros miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente es reconocida por ser el principal agente causante de la TBB. La mayoría de los animales afectados por este bacilo forman parte de la familia Bovidae (bóvidos), subfamilia Bovinae (bovinos) y, dentro de ésta en la tribu Bovini, que engloba distintos

géneros: Bubalus (búfalos), Bos (bueyes), o Bison (bisontes). Este patógeno también se ha logrado aislar en otros bóvidos de interés zootécnico, como cabras y ovejas (Romero, 2012 pág.9).

1.1.4.1. Morfología y caracterización

Generalmente son rectos, pero en ocasiones se doblan en forma de club, al teñirse aparecen con frecuencia cuentas de aspecto granular, no presentan movilidad, y tampoco crean esporas, poseen un tamaño de entre 0,6 - 1,0 x 1,0 - 10 μm , tienen la capacidad de adquirir diversas formas (pleomórfica), y pueden desarrollar ramificaciones o filamentos, impiden la formación de un micelio auténtico ya que se fragmentan a la mínima alteración (Suquilanda, 2015 pág.11-12).

La presencia de una cápsula formada por el patógeno es controversial. Evidentemente los bacilos, principalmente en el huésped, se encuentran privadas de la cápsula clásica lo que evita su adherencia a la célula con la suficiente fuerza como para ser observada por técnicas simples, tales como la tinta china y tinción negativa. Es un bacilo que se mantiene mejor en un Ph de 5.8 a 6.9, y su crecimiento en el cultivo microbiológico es relativamente lento, le toma aproximadamente entre 2 a 8 semanas poder observar colonias en desarrollo (Ettinger & Feldman , 2007; citado en Echeverria, 2011 pág. 31).

Este bacilo ha demostrado poder sobrevivir durante largos periodos de tiempo y bajo condiciones favorables fuera de un huésped y en el medio ambiente. Son muy resistentes a variaciones ambientales, sobreviven hasta 13 días en los pastos y heces bovinas, y en el estiércol dentro de establos oscuros desde 100 hasta 150 días; exponiéndose a la luz solar resisten alrededor de 5 horas, a luz difusa entre 5 a 7 días, y solo de 30 a 40 días si están incluidas en mucosidad pulmonar. No obstante, la presencia del ácido láctico en la leche, solo pueden sobrevivir 15 días y mueren al calentarla a 65°C durante 30 minutos (Gibbons,1983; citado en Suquilanda, 2015 pág.12-13).

En los quesos cuya maduración requieren de 4 –5 meses no se han identificado bacilos tuberculosos vivos, sin embargo, pueden sobrevivir en la mantequilla dulce hasta 4 semanas, pero en la muy salda y acida mueren a los 10 días. Temperaturas entre 1 –8°C bajo cero no los mata ni después de los 120 días, y con el desecado al vacío bajo estado de congelación pueden durar hasta 18 años. El bacilo es sensible a la sosa cáustica al 2%, formalina, ácido cresolsulfónico y desinfectantes clorados al 3 o 4%, así como también al ácido sulfúrico (Gibbons, 1983; citado en Suquilanda 2015 pág. 12-13).

1.1.4.2. *Naturaleza de la envoltura de M. bovis*

El bacilo tuberculoso presenta una envoltura celular diversa y compleja, constituida por carbohidratos, lípidos, arabinogalactano y proteínas de una matriz de peptidoglicano y ácidos micólicos que se encuentran entremezcladas. Está acondicionada para proveer soporte y protección, por lo que ha desarrollado mecanismos que facilitan el intercambio de sustancias con el medio ambiente, dándole la capacidad no solo de sobrevivir dentro del huésped, sino también de reproducirse en un medio hostil como el macrófago. La producción de diversos lípidos como los ácidos micólicos, cuya característica es ser ácidos grasos excepcionalmente largos, contribuye a discernir el género *Mycobacterium* de las demás procariontas, dicho esto, sus tres componentes principales son: la membrana plasmática, la pared celular y la membrana externa (Echeverría, 2011 pág. 11).

1.1.4.3. *Genética*

A pesar de la semejanza genómica entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, la supresión de genes a lo largo del tiempo ha conllevado a la reducción del tamaño del genoma *M. bovis* AF2122/97, el cual contiene: DNA circular, 4245492 pb, 4001 genes, 3918 proteínas codificantes, 65 % G-C, 50 RNAs estructurales, y 33 pseudogenes (NCBI, 2011b). Además, se reconoce que el agente causal de la TBB no presenta genes únicos, con excepción de algunas mutaciones específicas, lo que explicaría la gran cantidad de tropismos existentes en humanos y bovinos debido a la expresión genética diferencial (Echeverría, 2011 pág. 15).

Se ha logrado identificar un operón ribosomal ARN (rrm) localizado en 1,5 Mbp desde el inicio de su replicación. La posición alejada de rrm, ha determinado ser un factor contribuyente a la característica fenotípica de lento crecimiento del bacilo. Otra cualidad estudiada del bacilo es la presencia y distribución de sus secuencias de inserción (IS), particularmente IS6110, de la familia IS3 que ha sido propuesto a lo largo de los años para caracterizar las cepas basándose en epidemiología molecular (Echeverría, 2011 pág. 15)

1.1.4.4. *Diferencias entre M. tuberculosis y M. bovis*

La *M. bovis* comparte su 99,95% de identidad genómica con *M. tuberculosis*, destacando su semejanza en características como grado de patogenicidad, composición química y crecimiento. Las enfermedades causadas por estos agentes etiológicos tienen tratamientos diferentes, debido a

que la pirazinamida no es eficiente contra la mayoría de las cepas de *M. bovis*, por haber desarrollado resistencia (Scorpio & Zhang, 1996; citado en Suquilanda 2015 pág. 10).

Las principales diferencias entre estas dos micobacterias es la capacidad que tienen de metabolizar glicerol en piruvato, varios estudios han confirmado que los genes necesarios para este proceso metabólico no se activan ni funcionan en *M. bovis*, por lo que el bacilo se desarrolla mucho mejor en presencia de una fuente de carbono como la sal de piruvato (Echeverría, 2011 pág.19)

Se han identificado diferencias relevantes en varios genes que afectan y regulan forzosamente la expresión génica, como *alkA*, el cual codifica una proteína que repara el ADN en *M. tuberculosis*, por otro lado, en *M. bovis* este gen dirige la síntesis de una proteína estancada, alterando negativamente la respuesta del patógeno al estrés nitrosativo. Investigaciones han demostrado también variaciones genómicas de regiones específicas que codifican a las moléculas secretadas y a la pared celular, como las proteínas de las familias PE-PGRS y PPE, proponiendo que dichas alteraciones influirían en los tropismos del huésped o los tejidos. (Garnier et al., 2003 pág.7880)

1.1.4.5. *Mycobacterium bovis* en humanos

Los datos publicados sobre la tuberculosis zoonótica en personas en su mayoría provienen de estudios en diferentes entornos epidemiológicos (por ejemplo, sitios en los que la enfermedad, es o no endémica), no existe estandarización de variables en cuanto al tamaño de muestra, diseño de estudio, criterios de inclusión del paciente, demografía de la población y los métodos de laboratorio empleados para aislar y diferenciar *M. bovis*. Comúnmente los casos de tuberculosis zoonótica se reportan como parte del número total de casos de tuberculosis humana. En lugares en que la tuberculosis bovina es endémica, y las personas viven en circunstancias favorables al contacto directo con animales infectados, el riesgo de enfermedad es aún mayor (Olea et al., 2017 pág. 2-3).

La principal vía de contagio en los seres humanos, es por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar, y supone un riesgo hipotético el consumo de carne de un animal contagiado, sin embargo, el riesgo se relaciona con el término de cocción de la carne, ocasionando una infección extra pulmonar como linfadenitis, siendo muy fácil de confundir con tuberculosis ocasionada por *M. Tuberculosis*, de no realizarse un diagnóstico previo. Es un riesgo para la salud pública la producción de yogurt y quesos con leche no pasteurizada. Una variable de alta importancia para el contagio de *M. bovis* es el contacto directo con animales infectados en camales o fincas (ya sea por inhalación de secreciones respiratorias de ganado infectado o en raras ocasiones por heridas

cutáneas); La probabilidad de contagio directo de una persona infectada a otro ser humano, al toser o estornudar, no es descartada (MSP, 2010 pág. 11).

La causa principal de transmisión de tuberculosis zoonótica es mediante el consumo de alimentos, como ya se ha mencionado, por lo tanto, la dinámica de transmisión, la epidemiología y su tratamiento, difieren del medio de transmisión por aire de *M. tuberculosis*. Al considerarse posible la transmisión aérea entre personas, es de alta importancia evaluar en una investigación secundaria este caso particular (Olea et al., 2017 pág. 2-3).

1.1.4.6. *Mycobacterium tuberculosis en el ganado bovino*

A principios del siglo pasado, la infección de animales domésticos con la bacteria humana ya fue descrita, al encontrarse lesiones en ganado bovino expuesto a residuos hospitalarios de centros destinados al tratamiento de pacientes con tuberculosis (Kraus, 1942; citado en Romero, 2012 pág. 25).

Son dos las razones por las que durante años la tuberculosis en animales ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis*, ha sido catalogada de insignificante: 1) Es imposible distinguir clínica o patológicamente la enfermedad causada por *M. tuberculosis* y *M. bovis*; 2) Es de alta dificultad identificar o diferenciar ambas familias, especialmente en países faltos de la ineludible metodología. Además, la probabilidad de que los animales sean contagiados de *M. tuberculosis* a partir de un ser humano infectado es supuesta como despreciable, debido a que la bacteria no está adaptada en animales. Sin embargo, el riesgo radica en la relación de la base de prevalencia, es decir, cuanto mayor sea la prevalencia de la enfermedad en el hombre, mayor es el riesgo de contagio en animales; razón por la cual la mayor parte de tuberculosis humana en animales se ha identificado en los continentes de Asia y África (Fetene et al., 2009; citado en Romero, 2012 pág. 25).

El número de bovinos contagiados por *M. tuberculosis* en países en vía de desarrollo parece estar en aumento, aunque la infección haya sido considerada despreciable (Chen et al., 2009; citado en Romero, 2012 pág. 25).

El acrecimiento en estos países puede ser debido a dos factores: El incremento en la interacción directa entre personas con el ganado o el mejoramiento en el uso de técnicas moleculares para la detección de la enfermedad, que, en consecuencia, identifica con mayor eficacia los especímenes infectados. La incidencia de la enfermedad en los últimos años ha aumentado en los países de Indonesia, India, Nigeria, China, Paquistán, Sudáfrica, Bangladesh y Etiopía, según el informe sobre el control global de la tuberculosis en humanos, presentado en el año 2009 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Si se suma este hecho a la intensificación de la

producción de las ganaderas en países en vías de desarrollo, el peligro de transmisión entre el ser humano y el ganado, es alto, ya sea de *M. tuberculosis* o de *M. bovis* (World Health Organization, 2009; citado en Romero, 2012 pág. 25).

1.1.5. Factores predisponentes en bovinos

Los factores que predisponen la aparición de la enfermedad es el confinamiento de los bovinos, escasa ventilación, descarga y pérdida de fluidos corporales como residuos uterinos y contenido nasal, acumulación de heces, y siendo las menos habituales la monta natural y la alimentación a terneros con leche contaminada a través de una madre infectada (Medina, 2012; citado en Nuques 2019 pág. 7).

Otros factores predisponentes que se deben tomar en cuenta son: el sistema de producción que se maneja en el hato (intensivo/extensivo), prácticas de manejo, medio ambiente, nutrición, alimentación, genética, sexo, edad, enfermedades infecciosas y metabólicas, estado fisiológico, grado de estrés, parto, lactancia entre otros (Nuques, 2019 pág. 7).

El aglomeramiento y hacinamiento de los bovinos es considerado uno de los factores principales por el cual existe diseminación del patógeno, específicamente cuando se trata de una permanencia prolongada de animales jóvenes y viejos en un mismo corral de manejo. Agrocalidad en su manual de buenas prácticas pecuarias en producción de leche sugiere que para el diseño de corrales se debe manejar un área de 1.8 a 3 m³ por vaca y así evitar estrés, abortos, peleas y golpes (Vizcaino y Betancourt, 2013; citado en Nuques, 2019 pág. 7).

1.1.6. Patogenia

Los síntomas clínicos de la enfermedad están influenciados por factores como: 1) la cantidad viral del bacilo tuberculoso, 2) la dosis que recibe el hospedador, 3) la ruta de infección o inoculación, 4) la eficiencia de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador (Neill et al., 1994; citado en Romero, 2012 pág. 26).

El animal se contagia principalmente por vía erógena, debido a la exposición de este a varios tipos de aerosoles dentro de las instalaciones, y es así como se considera esta la ruta más frecuente de infección en bovinos. No obstante, la transmisión por vía oral también ocurre y es ocasionada por el consumo de material contaminado, bajo estas condiciones la presencia de la infección puede estar ligado a climas templados, ya que facilitan y favorecen la expansión y supervivencia de *M. bovis* en suelos y pastos. (Goodchild y Clifton, 2001; citados en Romero, 2012 pág. 26).

Encontrar lesiones granulomatosas en el área intestinal no es muy frecuente en países donde ejercen con disciplina los protocolos de control y erradicación de la enfermedad asegurando la eliminación de bovinos positivos a TBB antes de la expansión del patógeno. La transmisión por vía cutánea no es muy frecuente en animales, y cuando ocurre es principalmente por contagio de lesiones primarias con las bacterias tuberculosas a través de los ganglios linfáticos y punto de entrada de la zona involucrada. La edad del bovino, el sistema de producción o su comportamiento son factores predisponentes en la patogénesis de la infección, como aquellos bovinos jóvenes, quienes presentan lesiones más infecciosas que los adultos (Hernando et al., 2007; citado en Romero, 2012 pág. 27).

En las producciones de ganado de carne es posible encontrar animales contaminados principalmente por la alta morbilidad, y si ingresan animales enfermos y comparten las mismas instalaciones. Por otro lado, los bovinos destinados a producción lechera tienden a presentar un mayor número de casos positivos por el sistema de producción intensivo (Collins, 2001; citado en Romero, 2012 pág. 27).

El grado de virulencia que presenta la bacteria en un cierto porcentaje está asociado a los lípidos de la pared celular, el cual ayuda a neutralizar las defensas del hospedador, reproduciéndose en el área de entrada previo a la diseminación del bacilo hacia más órganos. La multiplicación rápida del patógeno en los pulmones es proporcional al nivel de virulencia de la cepa, a pesar de crear resistencia en otros órganos. La cantidad de bacilos ingresados en el hospedador también influye en cuanto a la distribución y toxicidad de las lesiones. La vía de transmisión influye en cuanto a la dosis mínima necesaria para crear la infección. Estudios realizados en cobayas dejaron en evidencia que para transmitir la enfermedad por vía oral se necesitan un mayor número de bacilos que las requeridas por aerosoles. De hecho, dosis de entre 1-5 bacilos puede desencadenar la infección mediante vía respiratoria, mientras que por vía oral se requieren aproximadamente 10⁶ bacilos para generar la enfermedad (Johnson et al., 2007; citados en Romero, 2012 pág.27).

Sin embargo, cabe destacar que en ciertas ocasiones el bacilo persiste en estado de latencia dentro del hospedador sin comenzar con un proceso patológico. Es relevante especificar los conceptos de animal infectado y animal enfermo. Un animal infectado es aquel que ha tenido algún tipo de contacto más de una vez con cualquier especie de micobacteria del grupo MTBC y por consecuencia ha desarrollado una respuesta inmunológica frente a los antígenos de estas micobacterias, por ejemplo, cuando se realiza la prueba de la tuberculina. Un animal enfermo es aquel que ha desarrollado síntomas clínicos como lesiones granulomatosas propias de TBB y, por ende, podría estar diseminando la bacteria y transmitiendo la enfermedad a otros animales. Una

reacción inmunológica del bovino frente a pruebas inmunológicas indica infección y no específicamente desencadenamiento de la enfermedad (Romero, 2012 pág. 27).

1.1.6.1. Proceso patológico

M. bovis se infiltra en el individuo por dos procesos que son: el complejo primario y el complejo secundario. El primer proceso determina el daño que la bacteria genera a nivel de órganos y ganglios linfáticos regionales, a través de este proceso la bacteria tiene dos formas de ingresar al huésped ya sea por vía aerógena y por vía intracelular, al ingresar mediante el sistema respiratorio su destino final serán los alveolos, en donde los macrófagos como primera línea de defensa los fagocitaran y destruirán en su interior junto con la ayuda de los fagosomas y lisosomas, una vez destruida, las micro partículas bacterianas podrán ser reconocidas como antígeno ante otras células del sistema inmune. Cabe destacar que no siempre el sistema inmunológico puede contener la propagación de la bacteria ya que es un patógeno intracelular que probablemente pueda afrontar con facilidad estos mecanismos de defensa, desarrollándose un crecimiento bacilar en el interior del macrófago y expandiéndose cuando éste muere. Esta hipersensibilidad celular genera muerte y destrucción de tejido local (SENASA,1993; citado en Abdala, 2014 pág.19-20).

Los macrófagos del sistema inmune no se encuentren activados adecuadamente cuando un individuo infectado posee un sistema inmunológico comprometido y débil, bajo estas circunstancias el bacilo oportunista se sigue reproduciendo y reclutando a más macrófagos para fagocitarlos y parasitarlos, así, el área infectada continúa acumulando exudado hasta crear un centro caseoso. La migración de macrófagos contaminados hacia los nódulos linfáticos favorece el establecimiento de varios sitios de infección, a lo que se conoce como complejo primario (Thoen y Chiodini, 1993; citado en Abdala, 2014 pág. 19-20).

Una vez realizado el complejo primario, la diseminación de los bacilos a través del sistema linfático ocasiona la formación de granulomas en cualquier tejido y órgano, ocasionando clínica variada con cuadros patológicos como la tuberculosis perlada, miliar y cavitaria, denominándose este proceso de diseminación complejo secundario (Radostitis et al., 2002; citado en; Ramos, 2017 pág. 20)

Durante el periodo de latencia, la infección se disemina tanto por vía linfática, contacto seroso o sanguíneo, visualizándose el inicio de la lesión a nivel orgánico a los 8 días y la calcificación de la misma dos semanas después del ingreso de las bacterias al organismo. (Romero, 2012 pág. 28)

La distribución de los granulomas en el organismo, se destaca por presentar zonas necróticas purulentas dadas por la respuesta inmunológica de los macrófagos; pero el organismo con el

objetivo de defenderse genera tejido fibroso para retener a los bacilos encapsulándolos, evitando la diseminación de la enfermedad (Román y Chávez, 2014 pág. 53)

Debido a que la principal vía de contagio es la aerógena, el complejo primario en su mayoría se encuentra en el ganglio linfático bronquial y pulmones de los bovinos, cuando las terneras ingieren la leche, por ejemplo, el bacilo en su mayoría se ve ubicado en ganglios faríngeos o mesentéricos con lesiones en hígado de forma secundaria (Ebrahim 2017, citado en; Ramos, 2017 pág. 20).

1.1.7. Transmisión

La transmisión directa es producida por aerosoles, es decir por vía aerógena, siendo la más frecuente en ganado bovino, facilitándose su transmisión aún más cuando el animal infectado se encuentra en hacinamiento, en el ordeño y alimentándose, ya que estos eliminan el bacilo por medio de las heces, leche, esputo, secreciones vaginales, uterinas, orina y ganglios linfáticos periféricos abiertos, ocasionando así el contagio entre el ganado (Arcelles, 2004 pág. 8).

Dentro de otras vías de contagio está la forma indirecta, que consiste en contraer la infección mediante el consumo de alimento como pienso, agua y pastos contaminados ya sea con sangre, heces u orines de un animal infectado. El bacilo tiene la capacidad de sobrevivir hasta un año en este tipo de secreciones a una temperatura de 12 a 14 ° C y bajo sombra. Si este se expone a una temperatura mayor de entre 24 - 43 ° C junto a la exposición solar, la vida del bacilo disminuye significativamente a partir del día 18. En los terneros que se alimentan de leche cruda la vía digestiva es la principal forma de transmisión, del 1 al 2% de vacas infectadas tienen la capacidad de eliminar el microorganismo a través de la leche. Otras vías de contagio poco probables son la congénita, genital y cutánea (Gonzales, 2020)

La vía congénita ocurre en un 1% de vacas infectadas, se produce a través del cordón umbilical entre madre y feto. Un 5% de vacas expuestas a la infección por vía genital podrían desarrollar metritis tuberculosa y el 1-2% presentar mastitis tuberculosa, a pesar de ser vías menos comunes (Blood, 1992; citado en Arcelles, 2004 pág. 9).

El uso de semen contaminado también podría ser un detonante, al momento de la inseminación, o al utilizar pipetas uterinas infectadas, también por vía intramamaria debido al uso de pezoneras o sifones de pezón infectadas de las ordeñadoras (Brown et al, 1994; citado en Arcelles 2004 pág. 9).

1.1.8. Síntomas y lesiones

La tuberculosis es una enfermedad que se caracteriza por ser de tipo crónico, pudiendo presentar sintomatología incluso después de años de contraída la infección, este tiempo varía en función a la patogenicidad de la enfermedad. Si el bacilo se albergara en pulmón la sintomatología sería tos seca intermitente ocasionada por el aumento de presión intra traqueal y también por los cambios de temperatura. Cuando la enfermedad se encuentra en su fase más avanzada, el aumento de tamaño en los ganglios linfáticos provoca disneas, obstrucción del tracto alimentario e incluso oclusión de vasos sanguíneos. Entre los órganos afectados están; los ganglios linfáticos mediastínicos, bronquiales, retro faríngeos y mesentéricos, hígado, pulmones, riñones y bazo (Romero, 2012 pág. 28).

Entre la sintomatología se encuentra la menor producción de leche y malestar general. Clínicamente la enfermedad se presenta mediante:

- Debilidad progresiva
- Pérdida de peso
- Fiebre en picos
- Tos seca
- Taquipneas
- Disnea
- Anorexia
- Ruidos sobreañadidos en la auscultación y percusión.
- Ganglios linfáticos grandes y prominentes a la larga, muerte (Bohorquez, 2011).

La bacteria puede permanecer en estado de latencia dentro del hospedador sin diseminarse por completo, y al necrosarse las lesiones tuberculosas calcificadas son de tipo abundante, precoz, amarillento y de consistencia pastosa, aunque depende mucho del grado de calcificación de la lesión (Vinuesa 2015 pág. 15)

1.1.8.1. Lesiones post mortem

La ubicación y tamaño de los tubérculos varia, llegando incluso a ser imperceptibles por el ojo humano; pueden encontrarse nódulos cabeza y tórax ubicados en los ganglios linfáticos de las zonas respectivas, también pueden hallarse en órganos como hígado, bazo, pulmones y alrededor

de cavidades corporales. La forma de evitar un consumo de carne contaminada es la inspección veterinaria minuciosa de la misma, incluso en animales supuestamente sanos (Ramos, 2017 pág. 23)

En la carne se puede evidenciar la presencia de granulomas purulentos, envueltos en tejido fibrótico y a veces el foco de lesión se encuentra calcificado; se observa también granulomas generalizados en toda la carcasa. Al realizar un examen físico adecuado y exhaustivo enfocado en los seis pares ganglionares; mediastínicos, retro faríngeos, cervical caudal, bronquial, inguinal superficial y parotídeos, así como pulmones, podemos asegurar un 95% de efectividad en la captación de animales infectados (Gonzales et al., 2012; citado en Ramos, 2017 pág.24)

Ecuador ha presentado investigaciones realizadas por veterinarios a nivel de mataderos; donde indican que las lesiones producidas por *M. bovis* en su mayoría se encuentran en ganglios linfáticos mediastínicos, retrofaríngeos, hepáticos y traqueobronquiales (Román y Chávez, 2014 pág. 54)

1.1.9. *Técnicas de diagnóstico*

1.1.9.1. *Diagnóstico Clínico*

Existen algunas deficiencias en cuanto al diagnóstico clínico de la enfermedad en campo, ya que deben considerarse los síntomas, seguimiento sanitario e historia clínica del animal, lo que es muy difícil de determinar ya que los signos específicos de la infección tardan meses e incluso años en manifestarse. Cuando el animal sufre cuadros de estrés excesivo, o se encuentra en edades muy avanzadas resulta complicado presentar un diagnóstico estable, y debido a esto es común encontrarse con pruebas de rutina, e inspecciones veterinarias en camales municipales con el objetivo de reforzar dicho diagnóstico (Ecuvet Servicios Veterinarios del Ecuador , 2016).

1.1.9.2. *Diagnóstico diferencial*

El diagnóstico diferencial es utilizado cuando existen escasos indicios para poder verificar al 100 % que la infección que adquirieron los bovinos es TBB, por lo que se toma a consideración síntomas generales tales como la baja producción, anomalías respiratorias, pérdida de peso, entre otras. Se reconoce a las neumonías bacterianas como parte de otra índole, por ejemplo, la *Pasteurella*, y la neumonía por parásitos u otros agentes virales. Como lo hemos ya mencionado anteriormente en el ambiente existen bacterias que son atípicas y que no causan ninguna afección, pero que al introducirse en el organismo del bovino generan respuestas positivas al diagnóstico de la tuberculina. (Nuques, 2019 pág. 15)

La actinomicosis y la actinobacilosis bovina son enfermedades que cursan con lesiones macroscópicas similares a las de la tuberculosis y son zoonóticas produciendo lesiones granulomatosas supurativas que podrían interferir con el diagnóstico clínico de la TBB en campo o mataderos municipales. Existen investigaciones donde al tomar muestras de estos supuestos granulomas y realizar pruebas bacteriológicas dan como resultado negativo para TBB. (Dubarry et al., 2004 pág. 35)

1.1.9.3. *Pruebas Intradérmicas de PPD*

Las 3 pruebas de tuberculina que se utilizan en bovinos son; la Prueba Ano Caudal de rutina (PAC), con derivado proteico purificado (PPD bovina), elaborada a partir de *Mycobacterium bovis* (cepa AN5) atenuada con una sensibilidad aproximada de 68-96,8% y una especificidad de 96-98,8%, la Prueba Cervical Simple de saneamiento (PCS), con PPD bovina, presenta una sensibilidad de 80-91% y especificidad de 75,5-96,8% y la Prueba Cervical Comparada (PCC), también elaborada con PPD bovina y el derivado proteico purificado aviar (PPD) elaborada con una cepa de *Mycobacterium avium* (cepa D4), tiene una sensibilidad de 55,1-93,5% y una especificidad de 88,8-100% aproximadamente (SENASE, 2013 pág. 1).

La sensibilidad y la especificidad de dichas pruebas se ven alteradas por factores como; presencia de micobacterias ambientales, manejo técnico para la inoculación del reactivo, estado fisiológico del animal como el post parto y edad de los bovinos, forma de conservación del PPD, entre otros. Existen evidencias de que la prueba Cervical Simple tiene una sensibilidad superior a la del pliegue ano-caudal, utilizándose en fincas donde existieron reactores positivos a *M. bovis*, y que, para proseguir con la eliminación de bovinos sospechosos, se repitió la prueba 60 días después en los mismos animales (Schiller et al., citado en ; Ramos 2017 pág. 23).

1.1.9.4. *Prueba de Tuberculina*

Las lecturas de las pruebas de tuberculina se basan en observar el crecimiento del espesor del pliegue cutáneo. La lectura se considera:

- Negativa cuando se observa una hinchazón con un crecimiento de no más de 2 mm y sin signos clínicos aparentes, como granulomas exudados o calcificados, dolor, inflamación o hinchazón de los ganglios linfáticos en el área de inoculación (Román y Chávez, 2014 pág.54).
- Inconcluyente si el aumento del pliegue cutáneo es superior a los 2 mm, pero inferior a los 4 mm sin observarse ningún signo aparente (Román y Chávez, 2014 pág.54).
- Positiva si se observan los signos clínicos propios de la enfermedad como se ha mencionado anteriormente, o si hay un crecimiento en el espesor del pliegue cutáneo que sea superior o igual

a 4 mm. Cuando el antígeno se inocula por vía intradérmica en un animal que ha sido expuesto anteriormente al agente etiológico, con la suficiente cantidad viral como para desarrollar una respuesta inmunitaria, se genera inmediatamente una reacción inflamatoria (Román y Chávez, 2014 pág. 54).

1.1.9.5. *Prueba intradérmica comparativa*

Esta prueba es utilizada para diferenciar entre bovinos posiblemente infectados con *M. bovis* de aquellos que han manifestado una reacción positiva al PPD por exposición a otras micobacterias. La reacción cruzada que se genera entre especies de micobacterias del mismo género causa problemas de sensibilidad en las otras pruebas diagnósticas, y es por eso que la prueba consta de inocular dos tipos de tuberculina: bovina y aviar en sitios diferentes de la tabla del cuello, con el objetivo de discriminar una respuesta inmunitaria causada por la tuberculina aviar, la lectura de los resultados se los obtiene después de 3 días (Vinueza, 2015 pág. 15).

1.1.9.6. *Macroscópica*

Es un método de diagnóstico que tiene como objetivo identificar a nivel de matadero las lesiones granulomatosas macroscópicas generadas por la infección, y forma parte de un procedimiento rutinario en la inspección veterinaria, debido a que este signo clínico en el animal es común en cualquier tipo de tuberculosis. Este examen en mataderos presenta una sensibilidad de 28.2% y una especificidad en la identificación de lesiones tuberculosas de 99.3% (Biffa et al., 2010; citado en Cushicóndor, 2014 pág. 32).

Se recomienda realizar un diagnóstico exhaustivo post-mortem, debido a que los granulomas varían frecuentemente en base a la localización anatómica y ruta de expansión. Estudios realizados en Ecuador, durante la inspección veterinaria a nivel de matadero, demostraron que las lesiones causadas por *M. bovis* se desarrollan generalmente en nódulos linfáticos mediastínicos, retro-faríngeos, traqueo-bronquiales y hepáticos dejando en evidencia que la ruta principal de transmisión en el ganado es por vía aerógena (Proaño y Pérez et al., 2011 citado en Echeverría 2011 pág. 30).

1.1.9.7. *Prueba de ELISA*

Esta prueba es comúnmente utilizada para detectar anticuerpos séricos, pero con baja sensibilidad, sin embargo, sirve muy bien para aquellos bovinos que no presentan ningún tipo de respuesta

inmunológica a pruebas de gamma-Interferón y tuberculina; desarrollando un factor de riesgo para el resto del ganado, es una de las pruebas más utilizadas a nivel de campo ya que encuentra una respuesta inmunológica a la posible exposición del bovino frente a los antígenos de *M. bovis* antes y después de realizarse la prueba intradérmica, motivo por el cual es utilizada en aquellos animales enérgicos al PPD o con reacción positiva dudosa (Acha y Szyfres, 2003; citado en Ojeda, 2017 pág. 10)

1.1.9.8. *La tinción de Ziehl Neelsen.*

La tinción se basa en colorear a los bacilos tuberculosos, ya que por tener la característica química de ácido alcohol resistentes (BAAR) reaccionan con facilidad ante el colorante carbolfucsina, el cual penetra en la pared de la bacteria y la colorea, resistiendo a una decoloración por ácido alcohol, se detecta en la microscopia bacilos teñidos de rojo con un fondo azul por el colorante azul de metileno usado como medio de contraste. La tinción Ziehl Neelsen presenta una sensibilidad de 43.5% y especificidad de 94.4% en comparación con el cultivo microbiológico (Koneman y Allen, 2008; citado en Cushicóndor 2014 pág.32).

Es una técnica de bajo costo, rápida y muy práctica, las deficiencias que presenta es que no diferencia entre especies del complejo Mycobacterium, y que la cantidad de bacilos necesarias para una tinción positiva debe ser mayor o igual a 1×10^4 en cada muestra, aunque esto se considera relativo ya que al procesar las muestras después de 10 minutos se incrementan los casos positivos (Cambanis et al.,2007; citado en Cushicóndor , 2014 pág.32).

1.1.9.9. *Cultivo invitro*

El cultivo in vitro es una de las pruebas más utilizadas directamente en laboratorio para el diagnóstico de la TBB ya que permite diferenciar e identificar especies en concreto de micobacterias, a pesar de esto, presenta una sensibilidad y especificidad relativamente bajas, con el 53% y 88% respectivamente, y es por eso que se sugiere que esta prueba vaya acompañada de una inspección post-mortem adecuada. Existen pasos a seguir en el procesamiento de las muestras, como la homogenización, descontaminación, e inoculación de las mismas. El principio fundamental para el crecimiento de las cepas es que exista una fuente de carbono como el piruvato en el medio Stonebrink o Lowenstein-Jensen (Echeverria, 2011 pág.32).

El crecimiento de las cepas toma aproximadamente 8 semanas a una temperatura de 37°C, los cultivos se inspeccionan paulatinamente durante las semanas de incubación hasta un crecimiento macroscópico. Existen deficiencias en este tipo de cultivo como en todas las pruebas de

diagnóstico mencionadas anteriormente, y entre las principales se encuentran; el procedimiento de descontaminación, tipos de cultivos utilizados, cantidad de bacilos en muestras digeridas, condiciones de la incubación, entre otras (Ojeda, 2017 pág. 10).

1.1.9.10. *Reacción en cadena de polimerasa*

Mediante el uso de PCR se puede identificar la presencia de microorganismos en un amplio tipo de muestras como son tejidos de animales, mucus nasal, leche, sangre, materia fecal y forrajes. Debido a que los microorganismos no necesitan ser viables, la amplificación de fragmentos específicos de ADN bacteriano resulta más sensible, rápida y flexible. Sus restricciones se ven reflejadas en la baja cantidad de bacilos presentes en la muestra, la esporádica eliminación de los mismos, la ineficiencia en la extracción de ADN y, la presencia de inhibidores en la muestra. A pesar de estas limitaciones, tanto la PCR como sus métodos complementarios, ofrecen un aporte bastante preciso en la identificación de especies de micobacterias y sus cepas. Las micobacterias contienen secuencias repetidas en su ADN cromosómico que pueden ser únicas de la especie o para determinadas cepas dentro de la misma especie (Abdala, 2014 pág. 25).

Las fracciones IS6110 e IS1081 son las secuencias de inserción de uso común en la detección de micobacterias del CMT, ya sea en muestras biológicas o en cultivos. Dependiendo de la especie bacteriana, el número de copias de estos fragmentos puede variar. Por ejemplo, *M. tuberculosis* presenta 25 múltiples copias del primer fragmento mientras que en *M. bovis* se encuentran pocas o solo una copia del fragmento (Butcher et al., 1996; citado en (Abdala, 2014 pág. 25-26).

Por esta razón, es necesario amplificar dos o más genes ya que, al analizar un solo gen, el objetivo puede estar ausente en la región amplificada lo que resulta en un falso negativo. Se sugiere el uso de PCR multiplex, técnica que amplifica varias regiones simultáneamente en una misma reacción (Bhembe et al; citado en Cruz y Pozo 2019 pág. 19).

Gran parte de las investigaciones realizadas en Argentina muestran que *M. bovis* presenta una única copia para el fragmento IS6110, mientras que, para el fragmento IS1081 presenta múltiples copias. A pesar de esto, el uso de la secuencia IS6110 resulta en una mayor sensibilidad y reproductividad en las pruebas de PCR (Jorge et al., 2005; citado en Abdala, 2014 pág. 25).

Por otro lado, estudios llevados a cabo en distintos países muestran que los fragmentos IS6110 e IS1081 están presente en la mayoría de cepas y en mayor número de copias de las micobacterias *M. tuberculosis* y *M. bovis*, respectivamente. Se requiere realizar estudios conclusivos para

reconocer el mejor biomarcador para la identificación de Tuberculosis bovina en lesiones compatibles (Quezada y Retamal, 2010 pág. 27)

1.1.9.11. PCR múltiplex

El objetivo de una PCR multiplex es la amplificación simultánea de distintas secuencias específicas en un mismo tubo. Tanto los reactivos como el programa empleado durante este test deben ser adecuados para permitir la detección de cada una de las dianas, sin inhibir la de las demás. Para lograr una correcta amplificación, se pueden realizar ajustes en los distintos parámetros como son; la concentración de magnesio; cebadores; el tipo y cantidad de ADN polimerasa (Méndez y Pérez, 2004 pág. 184).

Los cebadores y el programa empleado deben tener en cuenta varios indicadores como son; elección o diseño de oligonucleótidos que no interactúen entre sí para evitar la formación de oligómeros; temperaturas de anillamiento similares; cada pareja debe amplificar una secuencia diana y; las secuencias generadas deben tener distintos tamaños para separar y diferenciar correctamente los amplicones. En referencia a la cantidad y calidad del ADN molde, se debe partir de la menor concentración posible y de la ausencia de sustancias inhibitoras para evitar interferencias en la reacción. Dependiendo del tipo de muestra inicial, los protocolos de purificación pueden variar (Méndez y Pérez, 2004 pág. 185).

1.1.10. Tratamiento

Aquellos animales con pruebas positivas a TBB es poco probable que sean tratados, principalmente por ser un tratamiento muy largo y costo, corriendo el riesgo de extender más la infección, por tal motivo la mejor forma de erradicar y reducir la propagación del patógeno es mediante el sacrificio y decomiso total de aquellos animales positivos a pruebas de diagnóstico, y así poder establecer un control epidemiológico en la zona (Rodríguez, 2006 pág. 18).

La correcta pasteurización de la leche forma parte de las actividades esenciales que se deben realizar en la producción láctea para eliminar las Mycobacterias e impedir una zoonosis, ya que será utilizada para el consumo y elaboración de productos lácteos, sin embargo, existen estudios donde se indican casos específicos y poco frecuentes de contagio a través del consumo de carne y de heridas cutáneas (Rodríguez, 2006 pág. 18).

Como lo hemos mencionado anteriormente la tuberculosis en humanos es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* el cual se trata bajo diferentes dosis y con el uso simultáneo de

varios fármacos antimicrobianos durante todo el tratamiento, y con pequeños cambios, pero importantes si se tratara de un contagio por *Mycobacterium bovis* en humanos (Rodríguez, 2006 pág. 19).

Los fármacos antituberculosos se clasifican en 2 grupos en función a su eficacia, potencia, efecto tóxico y tolerabilidad. El primero incluye los llamados de primera línea, que se utilizan para el tratamiento inicial de la tuberculosis. El segundo lo forman los de segunda línea o de reserva, usados para las formas de tuberculosis resistentes a los anteriores o como alternativa en situaciones clínicas aisladas. Los fármacos de primera línea son rifampicina, isoniacida, pirazinamida, etambutol y estreptomina. El grupo de los de segunda línea lo forman protionamida, cicloserina, capreomicina, y clofazimina (Ayala, 2007 pág. 90).

1.1.11. Prevención, Control y erradicación

En Ecuador el control y prevención de la TBB tiene seguimiento a través de un programa voluntario supervisado por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), el protocolo de certificación para predios libres de tuberculosis bovina, tiene como objetivo crear un control epidemiológico en las áreas afectadas, y para esto se solicita a las ganaderías realizar dos pruebas de tuberculina año caudal a bovinos mayores de seis meses de edad, con un intervalo entre prueba y prueba de 120 y 180 días, todo esto bajo la supervisión del médico veterinario oficial (AGROCALIDAD, 2016; citado en Cruz y Pozo 2019 pág. 20)

La prueba cervical comparativa se la realiza siempre y cuando al menos una de las dos pruebas de tuberculina resulte positiva, con el objetivo de confirmar los posibles casos sospechosos, y así poder implementar el sistema de vigilancia para un correcto control sanitario, basado en el sacrificio de los bovinos hasta 30 días después de los resultados positivos, al mismo tiempo se recomienda enterrar a los bovinos sacrificados a una profundidad mínima de 1 m y cubrir con cal (AGROCALIDAD, 2016; citado en Cruz y Pozo 2019 pág.20).

Es necesario crear campañas de capacitación y concientización para que los productores aporten al cumplimiento del protocolo de regulación establecido por AGROCALIDAD y de esta forma implementar un control y erradicación eficaz de la enfermedad. Las entidades gubernamentales encargadas del seguimiento y asesoramiento agropecuario deberían buscar alternativas de compensación por el sacrificio de bovinos, ya que dicha actividad genera pérdidas cuantiosas al productor (Avila, 2018; citado en Cruz y Pozo 2019 pág.21).

Entre las ventajas de poseer predios libres de Tuberculosis, está el precio de los animales, el cual incrementa considerablemente, al igual que su carne, leche y derivados, también se cumple con uno de los requisitos para poder exportar dichos productos a varios países, y otra es que los trabajadores agropecuarios al igual que sus familias no corren riesgo de transmisión (AGROCALIDAD, 2008; citado en Vinueza, 2015 pág. 22).

Se han obtenido resultados positivos para contener la enfermedad siguiendo otros protocolos de erradicación, como el de minimizar el tiempo de permanencia en el hato de bovinos positivos, restringir la movilidad de animales enfermos, implementar la cuarentena en producciones donde se sospeche la presencia de bovinos infectados, o en animales nuevos que ingresan al hato, poner en práctica los protocolos de vigilancia epidemiológica en centros de faenamiento como es el caso de la inspección postmortem, considerar alimentar con leche pasteurizada a terneros, y todo esto acompañado de una trazabilidad eficaz (Cruz y Pozo 2019 pág. 23).

Actualmente la única vacuna disponible contra el *M. bovis* es la de Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), conformada por una cepa viva de *M. bovis* atenuada, con resultados variables debido a factores, como: protocolo de vacunación, exposición de micobacterias atípicas, y desarrollo de la vacuna. Cabe resaltar que aún no existe algún tipo de inmunización totalmente eficiente para prevenir la TBB, de hecho, está prohibida el uso de esta vacuna en varios países de la Unión Europea por generar reacción cruzada con la prueba de la tuberculina (OIE, 2008; citado en Pillacho, 2015 pág. 22).

Sin embargo, estudios realizados en animales salvajes ha demostrado que la vacuna puede reducir la carga bacteriana, el número y tamaño de granulomas evitando diseminación rápida de la enfermedad (Ramos, 2017 pág. 29).

1.1.12. Pérdidas económicas

La tuberculosis bovina genera grandes pérdidas no solo al sector agropecuario sino también a todo el sector productivo, abarcando tres aspectos diferentes:

1. Pérdidas Directas de Producción:

- Existe pérdida en la eficiencia productiva en aquellos bovinos que alcanzan el 10 % de ganancia en su peso corporal ya sea en kilos de carne como en producción de leche.

- Disminuye el pico de producción y duración de la lactancia a la mitad a partir de la séptima lactancia, es decir, el promedio de 270 días en la 1ª lactancia disminuye a 131 días.
- El porcentaje de fertilidad se reduce hasta en un 6%.
- Se pierde aproximadamente un 15% del peso normal de forma paulatina.
- Genera predisposición a otras enfermedades, por la reducción de la inmunidad.
- Vacas infectadas presentan una probabilidad del 5 al 10% de desarrollar esterilidad.

2. Comercio interior y exterior: el productor aprecia una gran diferencia de ingresos económicos en la compra y venta de productos y subproductos pecuarios, cuando son obtenidos de animales enfermos, y en mercados internacionales el seguimiento y regulación sanitaria influyen considerablemente en la adquisición de los productos.

3. Salud pública: disminución productiva por incapacidad parcial o total del personal vinculado a la zona láctea y ganadera, así mismo como veterinarios, trabajadores de mataderos, entre otros. Posiblemente lo esencial es evaluar la consecuencia de la patología en quienes demandan productos de origen tanto cárnicos como lácteos (INIA, 2004; citado en Vinuesa, 2015 pág.23-24).

1.1.13. Epidemiología

1.1.13.1. Tuberculosis bovina en seres humanos a nivel mundial

A nivel mundial, se registró aproximadamente 10 millones de personas que enfermaron de tuberculosis en 2018, variando enormemente la carga de morbilidad de un país a otro, desde menos de 5 a más de 500 nuevos casos por 100000 habitantes cada año. Basados en estas cifras la OMS reportó que 147 000 casos a nivel mundial eran causados por TBB y 12 500 muertes por dicha causa. (OMS, 2019 pág. 2)

Un estudio realizado en Estados Unidos, específicamente California en el año 2013 demostró que la tuberculosis por *M bovis* representó el 45% de los casos de tuberculosis en niños y el 6% de los casos de tuberculosis en adultos, y que la tasa de mortalidad durante el tratamiento fue más alta para los pacientes con *M bovis* que para pacientes con *M. tuberculosis*. Otros estudios demostraron la presencia de *M bovis* en subgrupos evaluados de pacientes con tuberculosis en México (28%), Nigeria (15%), Tanzania (16%), Etiopia (17%), India (9%), y Turquía (5%) (Olea et al., 2017 pág. 3)

La mayoría de los casos de tuberculosis de 2018 se registraron en las Regiones de la OMS de Asia Sudoriental (44%), África (24%) y el Pacífico Occidental (18%), con porcentajes menores

en el Mediterráneo Oriental (8%), las Américas (3%) y Europa (3%). Ocho países representaban dos tercios del total mundial: India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%). Estos países más los otros 22 de la lista OMS de los 30 países con alta carga de tuberculosis abarcaron el 87 % de los casos mundiales, como se puede observar en la figura 1-1 (OMS, 2019 pág. 2)

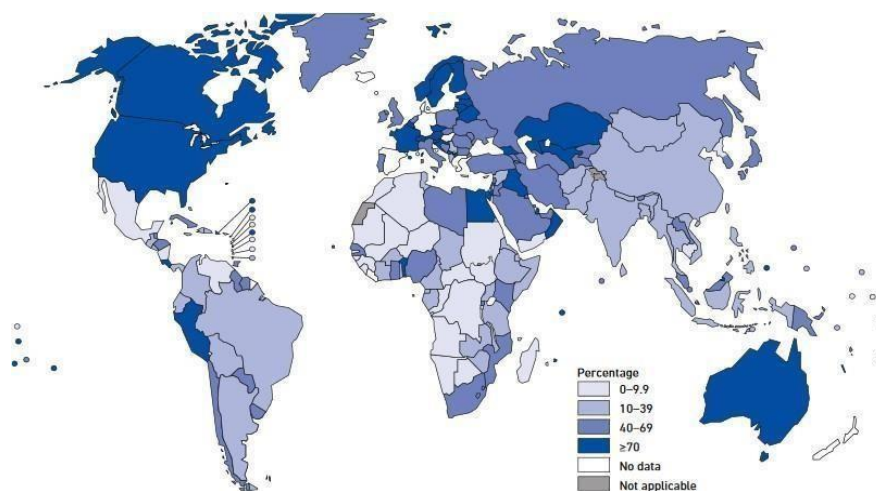


Figura 1-1: Porcentaje de casos de tuberculosis en humanos a nivel mundial

Fuente: (OMS, 2018 pág. 78)

1.1.13.2. *Tuberculosis bovina en seres humanos en el Ecuador*

Actualmente se desconoce la prevalencia de tuberculosis en humanos causada por *M. bovis* en Ecuador. Generalmente, el diagnóstico de esta enfermedad se realiza a través del examen directo del esputo (baciloscopia), mismo que no permite distinguir entre las especies *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Por otro lado, el diagnóstico mediante cultivo es una práctica escasa en Ecuador, sin embargo, cuando se realiza, no se llega a la identificación a nivel de especie. Es importante recalcar que el registro de datos de prevalencia perteneciente a las áreas rurales, donde se encuentra el mayor grupo de riesgo, se ve limitado gracias a la falta de laboratorios capacitados en estas zonas (Jacobus, 2005 pág. 366)

1.1.13.3. *Tuberculosis bovina en ganado bovino a nivel mundial*

Mundialmente, existe una amplia distribución de tuberculosis bovina, tanto en animales como en fauna silvestre. Durante enero del 2017 y junio del 2018, la OIE registro que 43,6% (82/188) de países y territorios se vieron afectados por Tuberculosis bovina; 35,4% (29/82) países registraron

presencia de la infección en ganado y fauna silvestre; 2,4% (2/82) países registraron infección solamente en la fauna silvestre; 62,2% (51/182) países registraron la enfermedad en ganado, finalmente; 80,5% (66/82) de los países proporcionaron datos cuantitativos sobre los brotes, como se indica en la figura 2-1. Dado que los animales silvestres actúan como reservorios y hospedadores secundarios, su potencial como vectores de transmisión dificulta el control de la infección en algunos países (Murai et al., 2019 pág. 3)

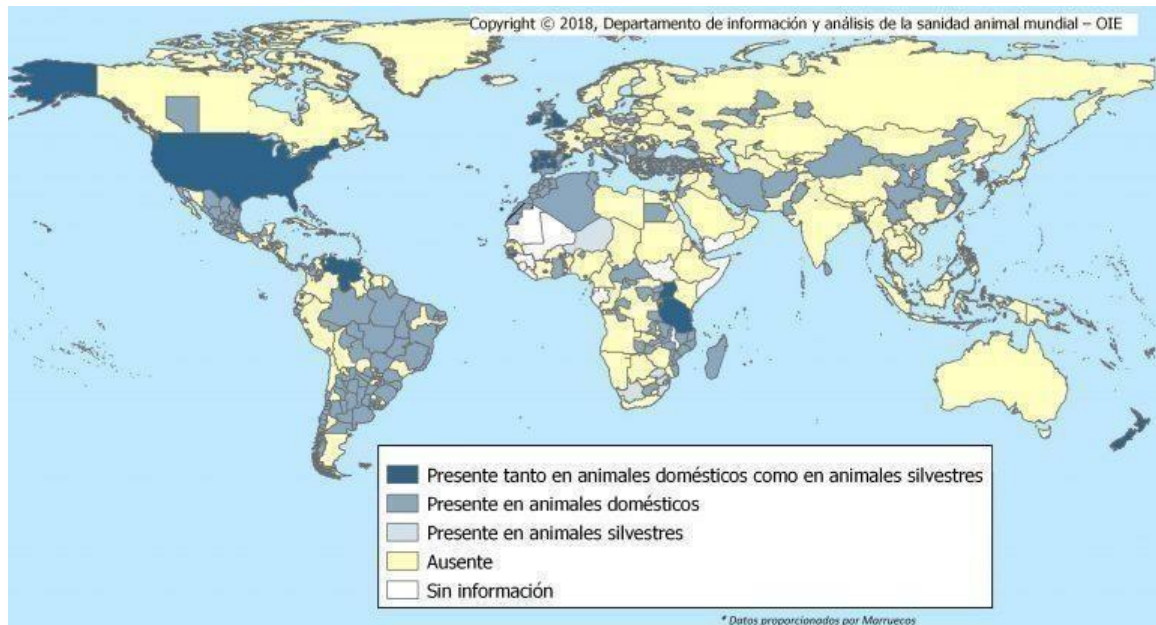


Figura 2-1: Distribución mundial de la tuberculosis bovina en 2017 y el primer semestre del 2018

Fuente: (Murai et al., 2019)

1.1.13.4. *Tuberculosis bovina en ganado bovino a nivel del Ecuador*

Ecuador no presenta registros de prevalencia de TBB a nivel nacional, sin embargo, se encuentra entre uno de los países de América Latina con una prevalencia relativamente alta, existen datos no bien reportados ni cuantificados, esto debido al uso limitado de pruebas diagnósticas y a una ineficiente y escasa inspección veterinaria en los camales municipales. los pocos registros sobre la enfermedad están basados en estudios aislados (Suquilanda, 2015 pág. 11-12).

En la tabla 2-1 se pueden observar los porcentajes de prevalencia de tuberculosis bovina en el Ecuador a partir del año 2008 hasta el 2019. Los datos han sido recopilados desde la web, clasificados y distribuidos en un mapa para un mejor entendimiento acerca de la epidemiología de la TBB en el país, como se indica en el gráfico 1-1

Tabla 2-1: Porcentajes de prevalencia de Tuberculosis bovina en Ecuador, basado en investigaciones aisladas realizadas desde el año 2008 hasta el 2019

Autor y año	Provincia	Cantón	Tipo de prueba	Prevalencia
Fuentes et al., 2008	Pichincha	Cutuglahua (Cantón Mejía)	Prueba de tuberculina	3,23%
Fuentes et al., 2008	Pichincha	Aloasí (Cantón Mejía)	Prueba de tuberculina	0,83%
Herrera, 2011	Imbabura	Otavalo	Prueba de tuberculina	6,9%
Echeverría, 2011	Pichincha	Cayambe	Nested PCR	4,059%
Echeverría, 2011	Tungurahua	Pelileo	Nested PCR	4,56%
Paccha, 2012	Loja	Hoya (Loja)	Prueba de tuberculina	6%
Guamán, 2012	Chimborazo	Tunshi (Riobamba)	Politécnica Prueba de tuberculina	7,69%
Guamán, 2012	Chimborazo	Molobog (Riobamba)	Prueba de tuberculina	7,77%
Zambrano, 2013	Los Rios	Quevedo	Prueba de tuberculina	12,86%
Quinatoa & Chicaiza, 2013	Cotopaxi	Latacunga	Prueba de tuberculina	8,47%
Quinatoa & Chicaiza, 2013	Carchi	Tulcán	Prueba de tuberculina	3,57%
Quinatoa & Chicaiza, 2013	Imbabura	Ibarra	Prueba de tuberculina	4,55%
Cushicóndor, 2014	Pichincha	Mejía	Inspección Macroscópica y Cultivo Bacteriológico	1,52%
Moyano et al., 2014	Napo	Carlos Julio Arosemena Tola	Prueba de tuberculina	0%
Suquilanda, 2015	Loja	Loja	Tinción por Ziehl Neelsen	27,56%
Hurtado, 2015	Esmeraldas	Esmeraldas, Eloy Alfaro y Quinindé	Prueba de tuberculina	22%
Paillacho, 2015	Carchi	Parroquia Santa Marta de Cuba (Cantón Tulcán)	Prueba de tuberculina	0,54%
Roa, 2015	Loja	Loja	Kit Pure Link Genomic y PCR	43,13%
Vinueza, 2015	Chimborazo	Chambo	Prueba de tuberculina	0,73%
Román & Chávez, 2016	Loja	Loja	Prueba de tuberculina	6,16%
Andrade, 2016	Santo Domingo de los Tsáchilas	Santo Domingo	Prueba de tuberculina	0%
Ramos, 2017	El Oro	Parte baja de la Provincia	Prueba de tuberculina	0%
Salazar, 2017	Santa Elena	Sur y Este de la provincia	Prueba de tuberculina	Sur= 6,33% Este= 3,19%
Palacios, 2018	Guayas	El Empalme	LAMP	33,15%
Nuques, 2019	Guayas	Bucay	Prueba de tuberculina	0%
Orbe, 2019	Carchi	Parroquia Tulcán (Cantón Tulcán)	Prueba de tuberculina	1,05%
Plúas, 2019	Los Rios	Buena Fe	LAMP	56,07%

Fuente: (Vitoner, 2020 pág. 32, 33,34)

Realizado por: Guananga, Brenda.2020

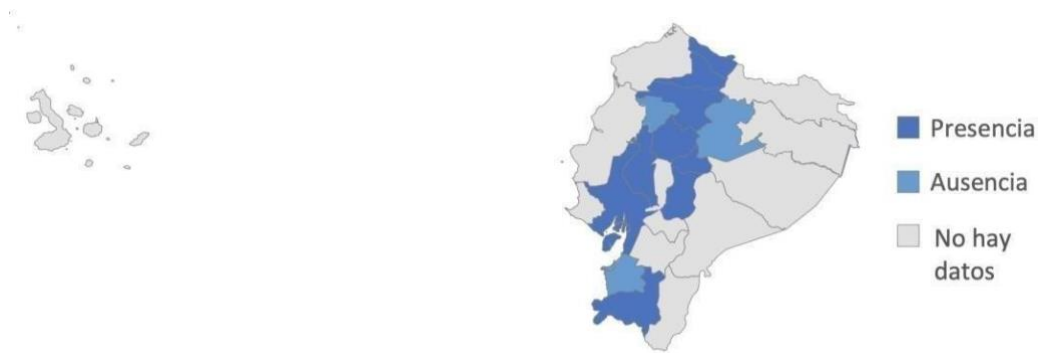


Gráfico 1-1: Situación epidemiológica de la Tuberculosis bovina en el Ecuador, en base a investigaciones aisladas realizadas desde el año 2008 al 2019

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO REFERENCIAL

2.1. Localización y duración del experimento

El trabajo de campo de la presente investigación se realizó en el Camal Municipal de Riobamba ubicado en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, al sur de la ciudad, en la Avenida Leopoldo Freire y Circunvalación. Mientras que el diagnóstico se lo realizó en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), ubicado en la Universidad Central del Ecuador, 3er Piso, Edificio del Servicio Médico, Ciudadela Universitaria. Quito-Ecuador.

El trabajo experimental tuvo una duración de 60 días los mismos que fueron distribuidos según las necesidades de tiempo para cada actividad, iniciando por la toma de muestras de ganglios linfáticos y pulmones de los bovinos faenados en el Camal Municipal de Riobamba y concluyendo con el procesamiento y diagnóstico de las muestras enviadas al Centro Internacional de Zoonosis.

Las condiciones meteorológicas en las que se encuentra la ciudad de Riobamba se describen a continuación en la tabla 1-2.

Tabla 1-2: Condiciones meteorológicas de la ciudad de Riobamba

PARAMETROS	VALORES
Precipitación promedio anual	561 mm
Temperatura media anual	14 °C
Humedad relativa	55 %
Rango altitudinal	2.754 msnm

Fuente: (CONAGOPARE, 2020)

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

2.2. Unidades experimentales

La población de estudio estuvo constituida por los bovinos faenados en el camal Municipal de Riobamba durante el mes de Setiembre del 2019, tomando en cuenta que no se han realizado estudios previos sobre esta enfermedad en el sitio.

Se trabajó con la muestra recomendada para determinar prevalencia estadísticamente significativa: 384 animales, tomados al azar, bajo un muestreo sistemático aleatorio. Calculada con la fórmula correspondiente para un intervalo de confianza del 95%.

$$n = \frac{1,96^2 P_{exp}(1 - P_{exp})}{d^2}$$
$$n = \frac{1,96^2 (0,5)(1-0,5)}{(0,05)^2} = 384 \text{ bovinos faenados.}$$

n = tamaño de la muestra

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

d = precisión absoluta (5%)

(Thrusfield, 2008)

2.3. Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron fueron los siguientes:

2.3.1. *Materiales*

2.3.1.1. *Materiales de campo*

- Mandil
- Delantal Pvc
- Mascarilla
- Cofia
- Guantes de látex
- Botas de caucho
- Cuchillo
- Cloro al 5% diluido
- Fundas Ziploc
- Cooler de espuma Flex
- Hielera
- Hojas de registro
- Guía de movilización de los bovinos

2.3.1.2. *Materiales de laboratorio*

- Mandil
- Bata quirúrgica
- Guantes
- Mascarillas
- Cofia
- Gradillas
- Bolitas de acero inoxidable
- Tijeras y pinzas
- Tubos de ensayo estériles
- Vasos de precipitación
- Matraz Erlenmeyer
- Probetas
- Porta y cubre objetos
- Juego de Pipetas calibradas
- Pipetas desechables
- Frascos con tapón de rosca diferentes tamaños
- Mechero de bunsen

2.3.2. *Equipos*

- Cabina de Bioseguridad (ESCO, Class II BSC)
- Centrífuga (SIGMA; 2-5)
- Autoclave (TRIDENT MEDICAL; EA-632)
- Incubadora (37°C) (memmert; 100-800)
- Refrigeradora (G. E.; TA04D04)
- Vortex (Fisher Scientific; 52BF)
- Termociclador (BIO RAD C 1000)
- Electroforesis (LABNEL)
- Microscopio
- Laptop
- Refrigeradora
- Licuadora

2.3.3. **Reactivos**

2.3.3.1. *Reactivos para el cultivo in vitro*

- Agua destilada estéril.
- Alcohol acido al 3% (HCL)
- HPC (cloruro de hexadecilpiridina) 0.75%
- Azul de metileno.
- Fucsina básica 2%
- Glicerol
- Piruvato de sodio
- Huevos frescos
- Base para el medio Lowenstein-Jensen (LJ) y Stonebrink (ST)

2.3.3.2. *Reactivos Para PCR multiplex*

- Agua ultra pura
- Gel de agarosa
- Buffer TE (Tris, EDTA)
- MgSO₄ (Sulfato demagnesio)
- dNTPs (Nucleósidotrifosfato)
- Taq polimerasa
- Primers para los fragmentos RD1 y RD9 de *M. bovis* y *M. tuberculosis*
- Marcadores de peso molecular de 100 pb (pares de bases)

2.4. **Tratamiento y diseño experimental**

El presente trabajo no dispone de tratamientos. Se manejaron resultados de presencia o ausencia (2 variables dependientes) de TBB y las variables edad, sexo y procedencia (3 variables independientes). Y por tratarse de un diagnostico evaluativo cualitativo, no se empleó un diseño estricto, sino más bien fue un muestreo el que determino la secuencia lógica del experimento.

2.5. **Mediciones experimentales**

Las mediciones que se tomaron en cuenta en la investigación fueron:

- Descripción de la toma de muestras (edad, sexo, procedencia) %
- Identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por aislamiento microbiológico (positivo/negativo)
- Identificación de *M.bovis* por PCR multiplex (positivo/negativo)
- Análisis de la TBB con las variables independientes (edad, sexo y procedencia)
- Prevalencia de TBB en %

2.6. Análisis estadístico y pruebas de significancia

Esta investigación es de diseño transversal descriptivo, y su significancia fue determinada a través de la prueba Chi-cuadrado (χ^2) del tipo; prueba de independencia, la cual permite establecer si existe o no una asociación estadística significativa entre la Tuberculosis bovina con respecto a la edad, sexo, y procedencia de los bovinos muestreados

$$X^2(df) = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde:

X²= Chi cuadrada

df = grados de libertad

Σ = suma

O= evento observado

E = eventos esperados

(Galindo, 2008, p.8)

2.7. Procedimiento experimental

2.7.1. Toma de muestras

Basados en el manual de procedimiento para la toma y envío de muestras para el cultivo

Microbiológico de Tuberculosis, principalmente en la directiva 64/432/ECC (VISAVET, 2017) se tomaron muestras de ganglios mediastínicos, traqueo bronquiales y muestras de pulmón, independientemente de la presencia y/o ausencia de lesiones compatibles.

- Se utilizó un cuchillo desinfectado con cloro al 10% y bajo medidas de asepsia adecuadas, se cortaron los ganglios identificados previamente.
- Las muestras de cada animal fueron recogidas en fundas herméticas estériles (ziploc), previamente identificadas con el correspondiente código
- Se transportaron las muestras en un cooler de espuma Flex, hasta un congelador previamente esterilizado.
- Las muestras fueron enviadas al laboratorio del CIZ en Quito, cada semana utilizando hielo dentro del cooler para mantenerlas frescas, y al llegar al laboratorio fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.
- Se utilizaron las guías de movilización emitidas por AGROCALIDAD para obtener datos en cuanto al sexo, edad y procedencia de los animales muestreados. Los datos fueron transcritos a la hoja de registro

2.7.1.1. *Procesamiento de las muestras en el laboratorio*

- El procesamiento de las muestras se llevó a cabo usando técnicas asépticas en el laboratorio microbiología nivel 3 de bioseguridad, en una cabina de seguridad biológica tipo 2B, para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y su posible riesgo biológico.
- Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente horas antes de su procesamiento
- Se tomó 1 gr de cada muestra utilizando una pinza y una tijera para cada toma, y se fueron colocando en tubos estériles de 12 ml codificados previamente con los códigos pertenecientes a cada muestra.
- Se colocó 5 ml de agua destilada y 6 esferas de acero en cada uno de los tubos
- Se utilizó el vortex para homogenizar 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 cada repetición se desechó la suspensión.
- Se colocó el agua destilada por cuarta vez, se homogenizó y se transfirió la suspensión a tubos más pequeños (3ml) para su utilización en el medio de cultivo Lowenstein-Jensen y Stonebrink, y el sobrante se almacenó en un tubo de 1.5 ml, a -20 °C

2.7.1.2. *Descontaminación*

- La descontaminación de las muestras se la realizó con HPC al 0.75% en un volumen de 1:2.

- La dilución fue homogenizada en el vórtex y se incubó a 37 °C por 20 minutos, con agitaciones intermitentes cada 5 min.
- Se colocaron los tubos en la centrifuga durante 20 minutos a (2000 a 3000rpm).
- Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 ul de H₂O.
- Los tubos se trasladan a la cabina de seguridad biológica para realizar la siembra

2.7.1.3. *Preparación de medios de cultivo para micobacterias*

Este instructivo de preparación es el utilizado por el instituto de investigación en zoonosis

a. *Procedimiento LOWENSTEIN-JENSEN*

- Suspender 37.2 g de agar Lowenstein Medium Base en 600 ml de agua destilada
- Anadir 12 ml de glicerol
- Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio hierva
- Autoclavar a 121°C durante 12 minutos
- enfriar aproximadamente a 50°C
- Mientras tanto lavar los huevos y sumergirlos en etanol al 70 % durante 10 minutos, batirlos y filtrarlos usando un embudo forrado con gas estéril hasta obtener 1000 ml que corresponden aproximadamente a 20 huevos
- Anadir 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.

b. *Procedimiento STONEBRINK*

- Suspender 37.2 g de agar Lowenstein Medium Base a en 600 ml de agua destilada
- Anadir 6 gr de piruvato de sodio
- Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio hierva
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos
- Enfriar aproximadamente a 50°C
- Mientras tanto lavar los huevos y sumergirlos en etanol al 70 % durante 10 minutos, batirlos y filtrarlos usando un embudo forrado con gas 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

2.7.2. *Siembra*

- La dilución se transfirió cuidadosa y homogéneamente en los tubos de ensayo con el medio ya solidificado, realizando un movimiento rotatorio suave
- Los tubos se incubaron a 37 °C con las tapas flojas y en posición inclinada durante una semana para un secado completo de la dilución en toda la superficie del medio, y a partir de la segunda semana en posición vertical.
- Los tubos fueron revisados de forma periódica durante 9 semanas.

2.7.3. *Baciloscopia*

En el presente estudio se utilizó la Tinción de Ziehl-Neelsen después de haber observado posibles crecimientos de micobacterias en el cultivo bacteriológico, bajo el siguiente procedimiento:

- Se tomó una muestra de las colonias de micobacterias desarrolladas en el medio, haciendo un barrido de estas en la porta objetos
- Se colocó sobre el soporte los porta objetos y fueron fijadas para conservar una distancia de al menos 1 cm entre ellos.
- Se cubrió totalmente la superficie con fucsina fenicada, dispersando el colorante suavemente
- Se utilizó un algodón empapado en alcohol como mechero para calentar por debajo del porta objetos con movimientos de vaivén hasta observar que empiece a evaporarse, aproximadamente 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 y puedan observarse bajo el microscopio con el lente 100 x de inmersión

2.7.4. *Extracción de DNA*

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

- Se colocó 5 colonias extraídas del medio de cultivo en 400 µl de buffer tampón TE (Tris-EDTA) durante 10 minutos a 100 ° C.

- Se espera 20 minutos a que exista una precipitación por gravedad y se toma el material genético en suspensión.

2.7.5. *PCR multiplex*

Se busca identificar un fragmento RD 9 y RD1 para *M. bovis* y *M. tuberculosis*, con el objetivo de 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 2-2

Tabla 2-2: Bandas de identificación y secuencia de primers utilizados para el master mix

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

Fuente: Parsons et al., 2002 pág. 2341

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

- 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 indica a continuación en la tabla 3-2

Tabla 3-2: Reactivos utilizados para el master mix

Reactivo	Concentraciones iniciales	Concentraciones finales	V1
H2O	-	-	14.40 µl
Buffer	10X	1X	2.5 µl
MgSO4	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl
RD1 (1)	100 mM	1.8 µmol/µl	0.45 µl
RD1 (2)	100 mM	0.6 µmol/µl	0.15 µl
RD9 (1)	100 mM	1.8 µmol/µl	0.45 µl
RD9 (2)	100 mM	0.6 µmol/µl	0.15 µl
Taq	5U/µl	2U/100 µl	0.20 µl

Fuente: (CIZ, 2020)

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

- 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 en la tabla 4-2

Tabla 4-2: 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

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

- El número de ciclos fue de 40

2.7.6. *Electroforesis*

- Las bandas se visualizaron en gel de agarosa al 2%, la cual fue preparada con 100 µl de buffer TBE y 2 gr de agarosa.
- Se colocó las muestras en el tanque de electroforesis, con el marcador de peso molecular (100 pb) a 100 voltios durante 45 minutos.
- Por último, se observó las bandas con luz uv en el transiluminador

2.8. Metodología de evaluación

2.8.1. Descripción de la toma de muestras

El número de animales muestreados en el Camal Municipal de Riobamba fue de 384, los cuales fueron clasificados según edad (Gráfico 1-2), sexo (Gráfico 2-2), y por lugar de procedencia; según la provincia (Gráfico 3-3) y según el cantón (Gráfico 4-2). Los rangos de edad establecidos se basan en las categorías zootécnicas aprobadas para faenamiento en camales, y en cuanto a la procedencia, al ser muestras tomadas directamente del camal municipal de Riobamba se tenía previsto que el mayor número de bovinos provendrían de la provincia de Chimborazo.

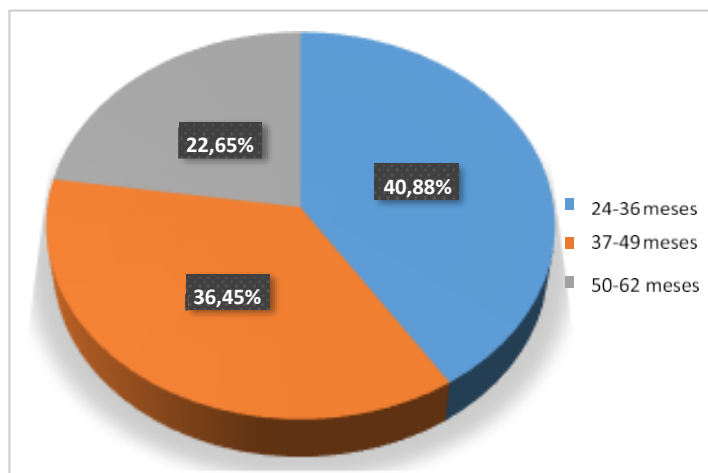


Gráfico 1-2: Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba por edad

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

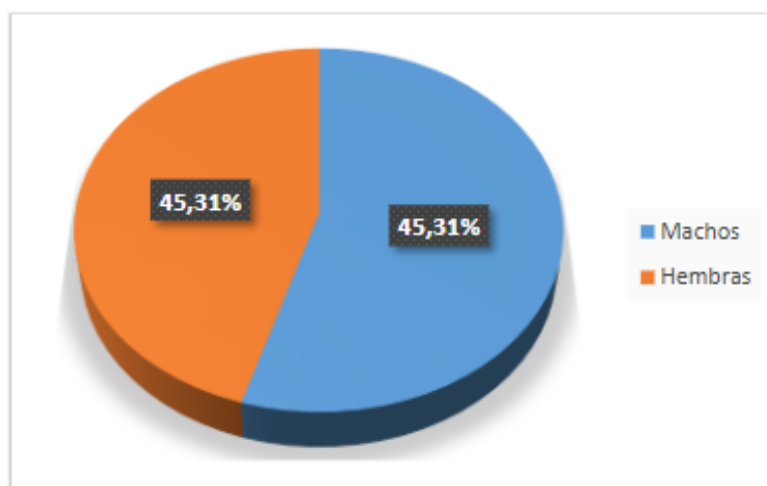


Gráfico 2-2: Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba por sexo

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

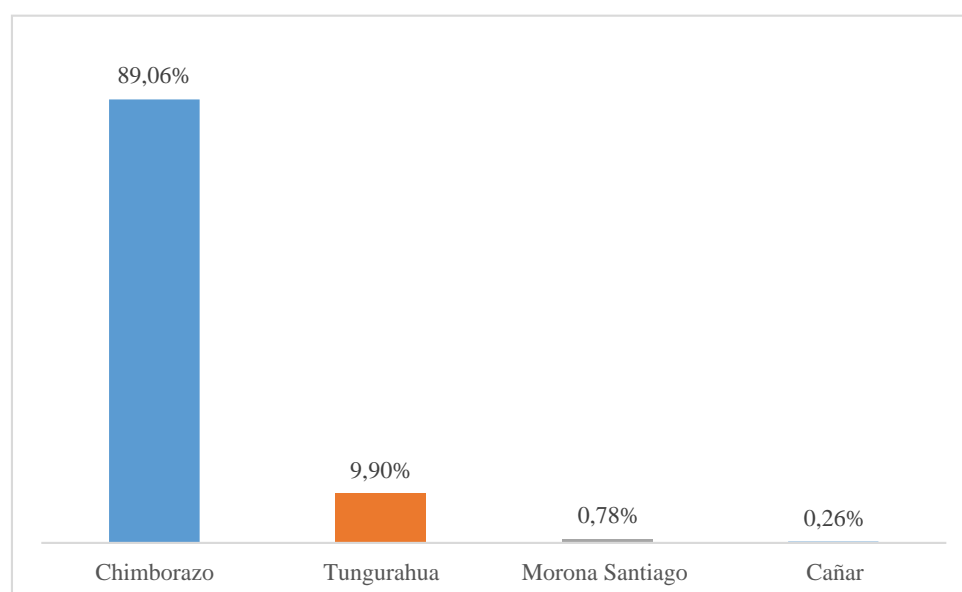


Gráfico 3-2: Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba según su procedencia por provincia.

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

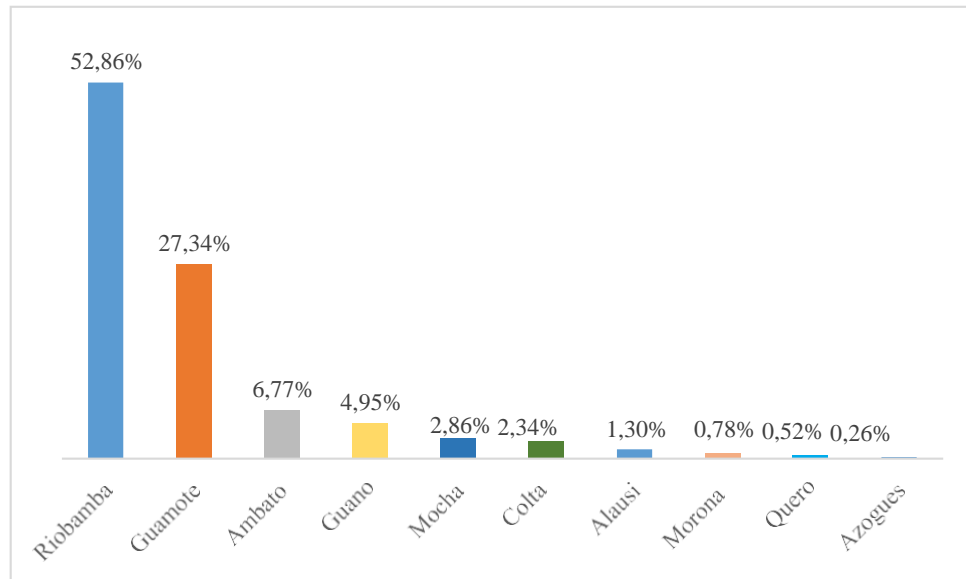


Gráfico 4-2: Distribución de los bovinos muestreados en el Camal Municipal de Riobamba según su procedencia por provincia

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

2.8.2. *Identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo bacteriológico*

Las muestras tomadas fueron descontaminadas y cultivadas en medios combinados (Stonebrink y Lowenstein-Jensen) para el crecimiento de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y fueron inspeccionadas periódicamente durante 9 semanas. Para identificar la presencia o ausencia de mycobacterias se observó la forma, color y número de colonias desarrolladas en el medio y se confirmó por tinción Zeinh Nelsen.

Dos muestras de las 384 tomadas del Camal Municipal de Riobamba presentaron material genético perteneciente al complejo *Micobacterium tuberculosis*, y los resultados se muestran en la siguiente tabla 5-2.

Tabla 5-2: Muestras positivas al cultivo bacteriológico y tinción Ziehl Neelsen

CODIGO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS			GENERO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	
	Color	Forma	Colonias	Cultivo	Ziehl Neelsen
			20 a 100		
R 317	Miel	Lisas	(+)	positivo	positivo
R 382	Miel	Lisas	(+)	positivo	positivo

Fuente: CIZ, 2020

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

2.8.3. Identificación de la cepa *M. bovis* por PCR multiplex

La Confirmación de la cepa *M. bovis* se la realizo utilizando PCR multiplex, ya que sirve como prueba diagnóstica y discriminatoria en el caso de existir otra cepa como *M. tuberculosis* en las muestras. El fragmento de ADN amplificado en cada biopsia positiva se observó mediante electroforesis, técnica que consiste en separar las moléculas de ácidos nucleicos en un campo eléctrico usando gel de agarosa al 2%. Se confirmó la presencia de *M. bovis* en las dos muestras positivas al cultivo bacteriológico y tinción Ziehl Neelsen, demostrado en la tabla 6-2

Tabla 6-2: Muestras positivas al PCR multiplex

CODIGO	GENERO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS		<i>M.bovis</i>
	Cultivo	Ziehl Neelsen	PCR
R 317	positivo	positivo	positivo
R 382	positivo	positivo	positivo

Fuente: CIZ, 2020

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

2.8.4. Análisis de la TBB con las variables independientes (edad, sexo y procedencia)

Los datos recolectados se tabularon en el programa Microsoft Excel y la asociación de la TBB con la edad, sexo y procedencia del ganado se lo realizó utilizando la prueba Chi-cuadrado mediante tablas dinámicas a través del paquete estadístico programa SPSS versión 22.

2.8.5. *Prevalencia de Tuberculosis bovina*

Para determinar esta medición experimental se tomó en cuenta los resultados obtenidos utilizando el PCR como prueba diagnóstica, aplicando la fórmula que a continuación se detalla.

$$P = \frac{\text{\# total de casos con TBB}}{\text{\# total de animales muestreados}} \times 100$$

(Esper y Machado, 2008)

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Prevalencia de tuberculosis bovina

En la tabla 1-3 se presenta la prevalencia de tuberculosis bovina en el Camal Municipal de Riobamba, el cual fue del 0.52 %

Tabla 1-3: Prevalencia de tuberculosis bovina en el camal municipal de Riobamba

	FRECUENCIA	P %
POSITIVO	2	0,52
NEGATIVO	382	99,47
TOTAL	384	100

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

Lo que significa que, por cada 384 bovinos muestreados, se presentó una prevalencia de TBB del 0.52%, en el mes de setiembre del 2019 en el Camal Municipal de Riobamba a través de la técnica molecular de PCR. Este resultado podría considerarse como bajo tomando en cuenta respecto al número de animales muestreados vs los casos positivos (2/384).

Resultado similar fue encontrado por Guardiola (2009) donde obtuvo una prevalencia del 0% utilizando la misma prueba molecular para el diagnóstico de la enfermedad, pero con previa inspección macroscópica post-mortem en el camal de Torreón México, asume el autor que pudo deberse a una inadecuada descontaminación de las muestras y problemas en la extracción de ADN. Caso similar a lo sucedido en la investigación de Cruz y Pozo (2019) en bovinos faenados en el camal de Daule Ecuador donde obtuvieron una prevalencia del 0% utilizando técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad, el investigador asume que puede deberse a la ausencia de bovinos provenientes de la región sierra, lugar de donde proviene un mayor porcentaje de bovinos de biotipo lechero de los cuales se ha obtenido prevalencias superiores con respecto a los bovinos de biotipo carnívoros ubicados con mayor frecuencia en la región costa.

Caso diferente lo sucedido en el estudio realizado por Echeverría (2011) en los mataderos de los cantones Cayambe y Pelileo en Ecuador, al utilizar la PCR como diagnóstico, determino una prevalencia del 4.33% (11/271) la cual considero alta en relación al tamaño de la muestra. Situación similar a lo descrito por Bermeo (2019), quien con la técnica de Lamp estableció una prevalencia del 61.5% en el Camal municipal de Quevedo, Ecuador. Suquilanda (2015) también obtuvo una prevalencia relativamente alta; 27.56% (35/127) en el cantón Loja Ecuador, pero utilizando la técnica de baciloscopia y tinción Ziehl-Neelsen.

Existen investigaciones realizados en otros países a nivel de camales, pero con resultados superiores a los obtenidos en el presente trabajo, como en Osorno Chile donde la prevalencia obtenida por Flores (2012) fue del 1.89%, similar al obtenido por Torres (2009) en Argentina, reportando 1.35% (128038/ 9472396) de prevalencia. Mientras que resultados a la par con la presente investigación se encontraron en Brasil, donde Baptista., et al (2004) determino una prevalencia del 0.07% y por Shitaye., et al (2006) en Etiopía, donde la prevalencia fue del 0.050% (699/1.336.266) utilizando el PCR como prueba diagnóstica.

La baja prevalencia del presente trabajo podría deberse a que los bovinos que ingresan al faenamiento en camales municipales son generalmente animales sanos, debido a que entidades gubernamentales como (AGROCALIDAD) en Ecuador exigen un control veterinario estricto y los productores pecuarios con animales enfermos evitan acudir a camales municipales, ya que, en caso de encontrar lesiones compatibles con TBB el médico veterinario encargado decomisa completamente la canal, generando pérdidas económicas para el productor, a consecuencia de esto se crean los camales clandestinos dentro de la ciudad, donde evidentemente no existe control veterinario y faenan animales enfermos. También debe considerarse que al ser el PCR una técnica molecular de alta sensibilidad y cualquier cambio o una mala práctica en el procedimiento podría alterar los resultados finales.

Diferentes estudios en el Ecuador han utilizado como diagnóstico de TBB la prueba de la tuberculina y muy pocos han utilizado pruebas moleculares para determinar la prevalencia, por tal motivo se ha considerado relevante el análisis de los mismos; como Guamán (2012) quien reporto una prevalencia del 2.36% (3/127) con la prueba de la tuberculina en el canto Riobamba Ecuador y Vinuesa (2015) una prevalencia del 0.73% (1/136) en la hacienda Pucate en el cantón Chambo del mismo país, resultados que probablemente se deban a la baja especificidad y sensibilidad que tiene dicha prueba en el diagnóstico de la enfermedad, y resultados aún más bajos obtenidos por Sánchez y Raul (2002) con el 0% de prevalencia en la provincia de Parinacochas Perú, utilizando también la prueba de tuberculina como diagnóstico. Sherwood (1985) menciona que es una prueba que debe considerar factores como; edad avanzada, baja sensibilidad, lugar de

aplicación y el estado de post-parto en bovinos como predisponentes hacia una respuesta alérgica negativa.

Durnez et al., (2008) describe al PCR como una prueba que permite la detección de falsos positivos y falsos negativos a la inspección veterinaria, e incluso al cultivo bacteriológico; ya que pueden existir pocas bacterias viables en las muestras por uso de conservantes o por porque no todas crecen a 37 °C, lo cual daría un falso negativo, o si crecen no pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (atípicas), dando un falso positivo, mientras que el PCR es más fiable al haber una amplificación de una región específica de ADN del patógeno, y probablemente por esta razón se obtuvo una prevalencia menor en este trabajo en comparación con aquellos estudios donde utilizaron solamente la prueba de la tuberculina, inspección veterinaria y cultivo bacteriológico como diagnóstico, y superior a otras investigaciones, quizá por el lugar de toma de muestras, que no fueron solo de ganglios sino también de pulmones, ya que Demelash., et al (2009) demuestra al pulmón izquierdo como el primer sitio que *M. bovis* infecta, es decir que se podría encontrar la enfermedad en estadios tempranos dependiendo de la muestra tomada. De igual forma Abalos y Retamal (2004) menciona que se debe considerar a la enfermedad como endémica y su prevalencia puede cambiar de acuerdo a la zona geográfica, tipo de producción (leche o carne) y manejo (intensivo u extensivo). Así es como la prevalencia podría estar subestimada o sobreestimada en las investigaciones mencionadas por falta de pruebas moleculares.

3.2. ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS DE ASOCIACIÓN DE CHI-CUADRADO

Los resultados a presentarse se obtuvieron del muestreo del ganado que se faeno en el mes de Setiembre del 2019 en el Camal Municipal de Riobamba

3.2.1. *Análisis de la tuberculosis bovina de acuerdo a la edad*

En la tabla 2-3 se demuestra el resultado de la prueba de Chi-cuadrado donde se indica que no está asociada la variable edad con la tuberculosis bovina. La frecuencia de los casos positivos y negativos según su edad es la siguiente; el 0.71% (1/139) perteneció a un bovino de entre (24-36) meses de edad y el otro bovino 1.15 % (1/86) a un rango de edad entre (50-62) meses, los bovinos de (37-49) meses no presentaron la enfermedad 0% (0 /157), como se indica en el gráfico 1-3.

Tabla 2-3: Tabla de Chi-cuadrado entre la edad de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina

Edad (meses) – Alternativas	Casos de Tuberculosis bovina				Total	Chi Cuad.
	Positivos	%	Negativos	%		
24-36	1	0,71	139	99,29	140	0,10
37-49	0	0,00	157	100,00	157	0,82
50-62	1	1,15	86	98,85	87	0,66
Total	2	0,52	382	99,48	384	
Chi Cal	1,59	ns				
Chi 0.05,2	5,99					
Chi 0.01,2	9,21					

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

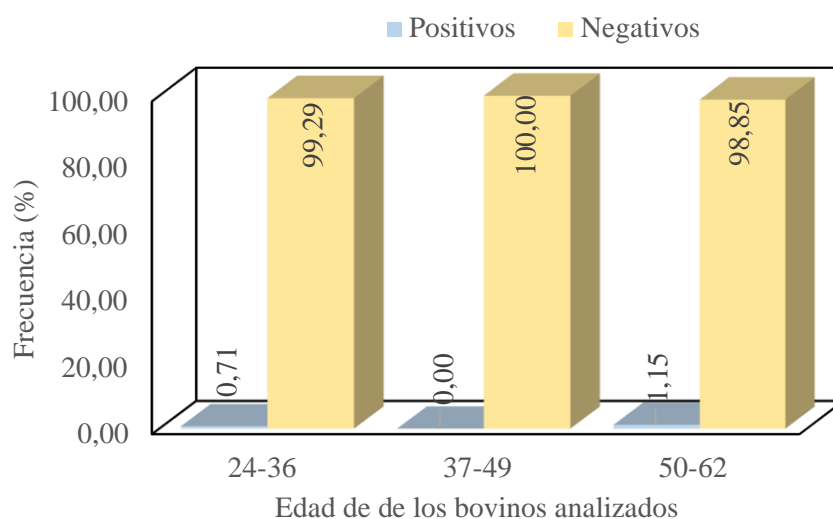


Gráfico 1-3: Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según la edad de los bovinos muestreados

Realizado por: Guananga, B. 2020.

En el Camal Municipal de Riobamba se logró determinar que estadísticamente no hay una asociación significativa entre la edad de los animales y la tuberculosis bovina, lo que significa que el camal en el que se realizó el muestreo, la edad no es un factor que influya en la aparición de la enfermedad. Resultados que concuerdan con los de Cushicóndor (2014) quien al realizar el diagnóstico de la enfermedad en el matadero municipal del cantón Mejía Pichincha, determino que la edad por sí sola no es un factor asociado directamente con los casos positivos de TBB, lo sucedido de igual forma en el estudio de Herrera (2011) donde la edad no resultó ser un factor de importancia, sin embargo a pesar de que el valor obtenido es no significativo, de sus pocos casos positivos, el 100% pertenecían a bovinos de entre 4 a 6 años de edad (48-72 meses). Caso similar a lo ocurrido en la presente investigación donde se obtuvieron dos casos positivos en

bovinos con edades entre (24-36) meses y (50-62) meses, lo que indica la presencia de la enfermedad en animales jóvenes que empiezan su vida productiva y en animales viejos al término de la misma.

Echeverría (2011) en su investigación en el camal del cantón Cayambe demuestra también no encontrar asociación entre las dos variables de estudio, pero el mayor porcentaje de bovinos positivos 90.91% (10/11) estuvieron en una edad menor a 6 años (< 74 meses), al igual que Roa (2015) quien menciona que de todos los casos positivos obtenidos en 3 ganaderías del cantón Loja el 50% (22/44) pertenecía a animales de entre 2 y 4 años de edad, demostrado así que bovinos de edades más tempranas presentan la infección también, probablemente por el manejo y la alimentación de los más jóvenes (terneros), Garro (2011) indica que los terneros presentan una elevada prevalencia de TBB en comparación de los adultos, debido a la obligada convivencia con posibles bovinos infectados y por ende al consumo de leche contaminada, a pesar de que algunos autores ignoran y desvaloran esta vía de contagio, nuevas técnicas más sensibles destacan su relevancia e importancia.

Caso contrario a lo sucedido en el estudio de Quinatoa y Chicaiza (2013) en las provincias de Cotopaxi, Carchi e Imbabura; donde indican que la edad si está asociada con la enfermedad, principalmente hacia bovinos adultos, y por Suquilanda (2015) en el camal frigorífico de Loja donde indica que el mayor porcentaje de bovinos positivos en su investigación fueron mayores a 6 años de edad, según Roa (2015) esto sucede porque en los bovinos existe una reducida capacidad protectora del sistema inmune en base al manejo proporcionado a lo largo de su vida, y también por estar expuestos a la enfermedad de manera más frecuente y persistente cuando se encuentran rodeados de animales infectados, o de forma directa cuando el patógeno está presente por mucho tiempo en el medio ambiente.

Sirve de acotación indicar que la mayoría de los animales faenados en camales municipales son rechazo de lechería, es decir vacas que han concluido su vida productiva, o que han presentado enfermedades reproductivas o metabólicas en edades tempranas, y toros sin intereses reproductivos y productivos, así como también bovinos que por las necesidades económicas de sus productores son faenados, lo cual hace que ingresen animales con rangos de edad muy diferentes, y razón por la cual existen resultados tan variables en cuanto a la presencia de la enfermedad en bovinos jóvenes y viejos, confirmando que la TBB está presente en todas las edades.

3.2.2. *Análisis de la tuberculosis bovina de acuerdo al sexo*

En la tabla 3-3 se demuestra el resultado de la prueba de Chi-cuadrado donde se indica que no está asociado el sexo del animal con la tuberculosis bovina. La frecuencia de los casos positivos y negativos según el sexo es la siguiente; el 1.15% (2/172) de hembras presentaron la enfermedad y el 0% (0/210) en machos, como se indica en el gráfico 2-3.

Tabla 3-3: Tabla de Chi-cuadrado entre el sexo de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina

Alternativas	Casos de Tuberculosis				Total	Chi Cuad.
	Positivos	%	Negativos	%		
Machos	0	0,00	210	100,00	210,00	1,10
Hembras	2	1,15	172	98,85	174,00	1,33
Total	2	0,52	382	99,48	384,00	
Chi Cal	2,43	ns				
Chi 0.05,1	3,84					
Chi 0.01,1	6,63					

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

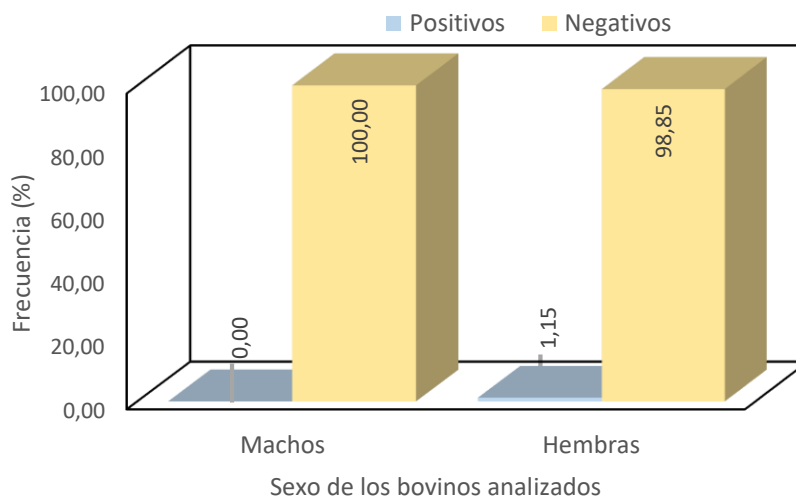


Gráfico 2-3: Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según el sexo de los bovinos muestreados

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

En el Camal Municipal de Riobamba se logró determinar que estadísticamente no hay una asociación significativa entre el sexo de los animales y la tuberculosis bovina, sin embargo de las muestras positivas (2/384), el 100% pertenecía a hembras, caso similar a lo obtenido por Cruz y Pozo (2019) en el camal del cantón Daule, al no encontrar diferencias estadísticas significativas

entre estas dos variables, sin embargo de los pocas casos positivos, 4 pertenecieron a la categoría hembras y 2 a machos, al igual que lo obtenido por Cushicóndor (2014) quien indica en su investigación hecha en el camal del cantón Mejía, que el sexo tampoco estuviera asociado a la probabilidad de presentarse *M.bovis* en los animales, y el 100 % de sus muestras positivas (6/385) fueron en hembras, Echeverría (2011) también presento resultados similares indicando que el sexo no es un factor influyente en la aparición de la enfermedad, pero de todas sus muestras positivas, 20 fueron hembras y 5 machos.

Por otro lado, estudios realizados en países extranjeros indican lo contrario, donde el género es considerado un factor de riesgo, como es el caso de Cadmus et al., (2010) quien indica que en Nigeria las hembras tuvieron un mayor riesgo de presentar la enfermedad, al igual que un estudio realizado en Etiopia central por Ameni y Erhikun (2007) donde hubo mayor número de casos positivos en hembras.

La mayoría de las investigaciones de TBB realizadas en el país, han demostrado tener un mayor número de casos positivos en hembras que en machos, lo que según Proaño et al., (2006) se debe al sistema de producción en la que se encuentran las hembras, (intensivo/extensivo) lo que hace que permanezcan estabuladas, en contacto directo con otros bovinos y bajo un estado de estrés constante debido al número de partos y rendimiento de producción láctea a lo largo de su vida, por la que su sistema inmunológico se ve comprometido volviéndose susceptibles al patógeno.

Existen muy pocos estudios donde el mayor número de casos positivos a la enfermedad fuera en machos, como en la investigación de Vanegas y Mora (2018) en un camal de la provincia del Guayas, probablemente por haber tomado más muestras en machos que en hembras, caso entendible ya que en camales se faenan en mayor cantidad a toros. Ramos (2017) indica que el sexo va a la par con el sistema de explotación, y que es muy frecuente encontrar la enfermedad en vacas de granjas lecheras, mientras que los toros que alcanzan una menor edad dentro de las explotaciones presentan pocos casos positivos. Kazwala et al., (2001) demostró que los machos podrían ser afectados por la enfermedad si son utilizados como bueyes. Estos resultados también dependen mucho del control sanitario a la que los bovinos son sometidos previo al ingreso a fincas de producción.

3.2.3. *Análisis de la tuberculosis bovina de acuerdo a la procedencia*

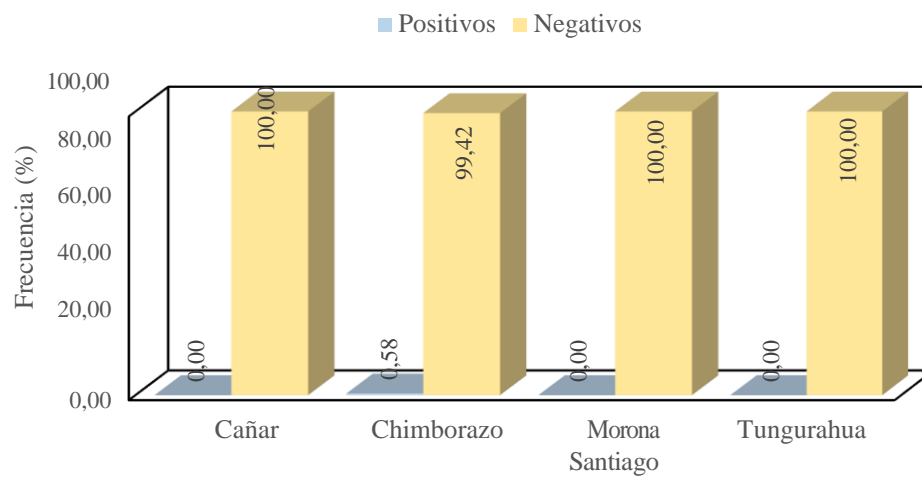
3.2.3.1. *Provincia*

En la tabla 4-3 se demuestra el resultado de la prueba de Chi-cuadrado donde se indica que no está asociada la provincia como procedencia del animal con la tuberculosis bovina. La frecuencia de los casos positivos y negativos según la provincia es la siguiente; el 0,58% (2/340) de los bovinos provenientes de Chimborazo presentaron la enfermedad y los bovinos provenientes de otras provincias no la presentaron, como se indica en el gráfico 3-3.

Tabla 4-3: Tabla de Chi-cuadrado entre la provincia de procedencia de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina

Alternativas	Casos de Tuberculosis				Total	Chi Cuad.
	Positivos	%	Negativos	%		
Cañar	0	0,00	1	100,00	1	0,01
Chimborazo	2	0,58	340	99,42	342	0,03
Morona Santiago	0	0,00	3	100,00	3	0,02
Tungurahua	0	0,00	38	100,00	38	0,20
Total	2	0,52	382	99,48	384	
Chi Cal	0,25	ns				
Chi 0.05,3	7,81					
Chi 0.01,3	11,34					

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020



Procedencia de los bovinos analizados (provincias)

Gráfico 3-3: Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según la provincia de procedencia de los bovinos muestreados

Como era lo esperado, el Camal Municipal de Riobamba recibe un mayor número de bovinos provenientes de la provincia de Chimborazo, seguido de Tungurahua, Morona Santiago y Cañar, entendible ya que son provincias que colindan y son cercanas entre ellas. Los dos casos positivos encontrados fueron en la provincia de Chimborazo, sin embargo, estadísticamente no hay una asociación significativa entre la procedencia según la provincia y la TBB, caso similar a lo sucedido en el estudio de Cushicóndor (2014) el cual tampoco encontró asociación entre estas variables, a pesar de haber detectado mayores casos positivos en el Cantón Mejía Pichincha. Ramos (2017) manifiesta que esto puede suceder en regiones en donde se maneja un sistema de producción extensivo y por ende al reducir la concentración animal también se disminuye la transmisión del patógeno a través de la vía respiratoria, bajando la prevalencia e incidencia en la zona.

Moyano et al., (2015) menciona que la región amazónica presenta una baja prevalencia de enfermedades infecciosas por tener un sistema campesino de producción, ofreciendo condiciones naturales de aislamiento y trasladando a sus animales directamente a centros de consumo localizados en el centro norte andino. Morales et al., (2009) explica que las provincias de Zamora y Morona Santiago realizan un manejo de animales al sogueo, que reduciría los riesgos de contagio de enfermedades infecciosas.

Sin embargo, Echeverría (2011) en su estudio demostró que esta variable si está asociada a la presencia de la enfermedad, principalmente la provincia de Imbabura, Tungurahua y Pichincha, con respecto a Carchi, , Proaño et al., (2006) explica que esto podría suceder por ser una enfermedad endémica en la zona de estudio, y a un mayor contacto entre animales o por no tener control adecuado del desplazamiento del ganado, y Garbaccio et al.,(2016) describe al patógeno como capaz de sobrevivir varios meses en el ambiente, y principalmente en lugares, oscuros, fríos y húmedos.

En el cantón Loja, Roa (2015) en su estudio de la prevalencia de TBB indica que también existe una asociación significativa entre dichas variables ya que de las dieciséis, catorce de las parroquias presentaron un gran número de casos positivos a la enfermedad, probablemente por un control sanitario deficiente al no utilizar pruebas de diagnóstico adecuadas , que permitan detectar a bovinos infectados para su descarté, y evitar la diseminación de el patógeno en diferentes hatos ganaderos de la provincia

3.2.3.2. *Cantón*

En la tabla 5-3 se demuestra el resultado de la prueba de Chi-cuadrado donde se indica que no está asociada el cantón como procedencia del animal con la tuberculosis bovina. La frecuencia de los casos positivos y negativos según el cantón es la siguiente; el 0.99% (2/203) de los bovinos provenientes de Riobamba presentaron la enfermedad y los bovinos provenientes de los demás cantones no la presentaron, como se indica en el gráfico 4-3.

Tabla 5-3: Tabla de Chi-cuadrado entre el cantón de procedencia de los bovinos muestreados y la Tuberculosis bovina

Alternativas	Casos de Tuberculosis				Total	Chi Cuad.
	Positivos	%	Negativos	%		
Alausí	0	0,00	5	100,00	5	0,03
Ambato	0	0,00	26	100,00	26	0,14
Azogues	0	0,00	1	100,00	1	0,01
Colta	0	0,00	9	100,00	9	0,05
Guamote	0	0,00	105	100,00	105	0,55
Guano	0	0,00	19	100,00	19	0,10
Mocha	0	0,00	11	100,00	11	0,06
Morona	0	0,00	3	100,00	3	0,02
Quero	0	0,00	2	100,00	2	0,01
Riobamba	2	0,99	201	99,01	203	0,84
Total	2	0,52	382	99,48	384	
Chi Cal	1,79		ns			
Chi 0.05,9	16,92					
Chi 0.01,9	21,67					

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

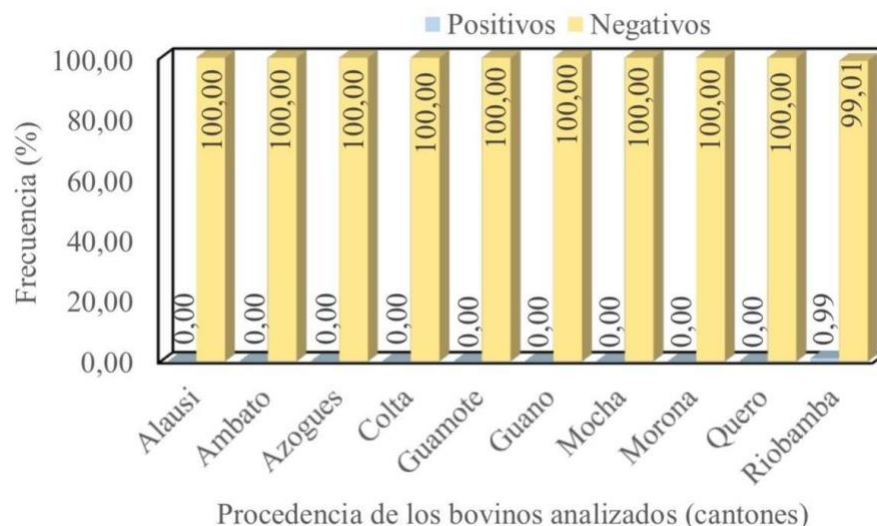


Gráfico 4-3: Frecuencia de casos positivos y negativos de TBB según el cantón de procedencia de los bovinos muestreados

Realizado por: Guananga, Brenda. 2020

En el Camal Municipal de Riobamba se logró determinar que estadísticamente no hay asociación significativa entre la procedencia de los bovinos de acuerdo al cantón con la TBB, debido a los pocos casos positivos encontrados. Ya que el presente trabajo fue hecho a nivel de camal y con el PCR como prueba diagnóstica, es poco comparable con aquellas realizadas a nivel de hatos donde utilizan a la tuberculina como diagnóstico de la TBB, sin embargo, al haberse realizado en la misma provincia se las ha considerado relevantes.

Guamán (2012) al diagnosticar la TBB con la prueba de la tuberculina en tres diferentes comunidades de la parroquia Licto cantón Riobamba indica no haber encontrado asociación entre ellas con la presencia de la enfermedad. Sus casos positivos fueron (3/127), de los cuales 2 pertenecieron a la comunidad Molobog y 1 a la Estación experimental Tunshi politécnica, su autora explica que previo a su investigación los animales habrían estado sometidos a la prueba de la tuberculina y se habrían ya eliminado los casos positivos.

También Espinoza (2016) en la hacienda Cierro viejo de la parroquia san Juan canto Riobamba al inocular a 45 vacas en producción de diferentes edades, obtuvo 0 casos positivos (0/45), dando a entender según la autora que el control sanitario que se lleva en la hacienda es el adecuado. Vinueza (2015) al diagnosticar la TBB con la prueba de la tuberculina en la hacienda Pucate del cantón Chambo provincia de Chimborazo, encontró un solo caso positivo (1/136) con una prevalencia del 0,73 % la cual considera como no significativa y por ende no influye de gran manera en el hato.

INEC (2016), determina que la provincia de Chimborazo presenta una media de 228,5 mil cabezas de bovinos, dato que ha ido en descenso desde la encuesta del 2002, y según Zambrano et al., (2017) se debe a una elevada fragmentación del territorio que genera una baja en la productividad y rendimiento de su cantonés, también destaca el hecho de existir poca industrialización en la zona, haciendo que los cantones manejen sus producciones de forma extensiva. Este factor es sin duda relevante al momento de considerar los pocos casos positivos encontrados en el camal de Riobamba y en las otras investigaciones realizadas en la misma provincia ya que al existir menos bovinos por cantones, existe menos hacinamiento del ganado y se reduce la propagación del patógeno.

Caso similar lo ocurrido también en la provincia de Cotopaxi, donde Burgasí (2014) al determinar la prevalencia de TBB en las comunidades Guantualó y Taxojaló del cantón Sigchos, no encontró asociación significativa entre la procedencia de los bovinos con la enfermedad, ya que todos dieron negativo a la prueba de la tuberculina (0/98).

CONCLUSIONES

- Se determinó en el Camal Municipal de Riobamba una prevalencia de tuberculosis bovina del 0.52%, por medio de la técnica molecular de PCR (reacción en cadena de polimerasa) en el mes de setiembre del 2019, cifra baja si se toma en cuenta que es una enfermedad altamente infecciosa y de carácter zoonótico.
- Al realizar el aislamiento microbiológico en los medios de cultivo Stonebrink y Lowenstein Jensen se diagnosticó la presencia de bacterias del complejo Mycobacterium Tuberculosis en 2 de las 384 muestras procesadas (2/384), es decir, 2 posibles casos de Tuberculosis bovina.
- Utilizando la técnica molecular de PCR en los casos positivos al microbiológico, se identificó la especie *M.bovis* en ambas muestras (2/384), lo que indica que a pesar de no encontrar lesiones compatibles con la enfermedad en el estado post mortem de los bovinos, la TBB está presente en estadios tempranos en el camal Municipal de Riobamba
- A través de la prueba Chi-cuadrado se determinó que las variables: edad, sexo y procedencia del ganado bovino no están estadísticamente asociadas con la enfermedad, indicando que no existe riesgo o una mayor probabilidad de presentarse la enfermedad en los bovinos faenados en el Camal Municipal de Riobamba. Sin embargo, los dos casos positivos que se encontraron fueron en animales de (24-36) y (50-62) meses de edad, y en hembras que provenían del cantón Riobamba provincia de Chimborazo, reconociendo la presencia de la enfermedad más en hembras que en machos y en bovinos relativamente jóvenes.

RECOMENDACIONES

- Es de suma importancia mejorar la trazabilidad del ganado bovino para poder llevar un control epidemiológico seguro y eficaz a nivel nacional, ya que las guías de movilización utilizados para recopilar datos en cuanto a la procedencia del animal son poco fiables y no siempre registran el verdadero lugar de origen.
- Realizar investigaciones en la misma zona de estudio con un tamaño de muestra mayor y utilizando pruebas de diagnóstico diferentes a la tuberculina, con el objetivo de actualizar y mejorar la información epidemiológica en la provincia de Chimborazo, ya que los estudios realizados son escasos y de hace 5 años.
- El diagnóstico de la TBB con pruebas moleculares debería ser en parte financiado por el gobierno y realizado periódicamente en hatos lecheros o camales municipales con el objetivo de cumplir con el plan nacional establecido por AGROCALIDAD para un eficiente control sanitario, y de esta forma incrementar los predios libres de tuberculosis bovina en el país.
- Es importante cuidar y mejorar los métodos de laboratorio establecidos para la toma, almacenamiento, envío y procesamiento de muestras con el objetivo de optimizar las pruebas tanto bacteriológicas como moleculares, asegurado así una diagnóstico eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABALOS, P., & RETAMAL, P.** Tuberculosis : ¿una zoonosis re-emergente?. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) [en línea], 2004, (Chile) Vol. 23(2), pp. 583–594. [Consulta: 07 julio 2020]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/237515129 Tuberculosis una zoonosis re-emergente](https://www.researchgate.net/publication/237515129_Tuberculosis_una_zoonosis_re-emergente)
2. **ABDALA, A.** Mycobacterium bovis en fauna silvestre de la cuenca lechera Santa fe – Córdoba (Argentina) [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Nacional de Rosario, Rafaela, Argentina. 2014. pp. 19-26. [Consulta: 2020-04-16]. Disponible en: <https://rephip.unr.edu.ar/handle/2133/11266>
3. **AMENI, G., & ERHIKUN, A.** Bovine tuberculosis in small-scale dairy farms in Adama Town, central Ethiopia, and farmers. Scientific and Technical Review of Office of International Epizootics awareness of the disease [en línea], 2007, (EE.UU) Vol. 26(3), pp. 711-719. [Consulta: 11 junio 2020]. ISSN 0253-1933. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/479c/49b9d547163e3ce3cf07e4a11a49f113b4c b.pdf>
4. **ANDRADE, D.** Situación actual de la brucelosis y tuberculosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. p. 42. [Consulta: 2020-07-07]. Obtenido de: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/5350/1/17T1383.pdf>
5. **ARANAZ, A.; et al.** Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp Caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology [en línea], 2003, (Spain) Vol. 53(6), pp. 1785–1789. [Consulta: 13 julio 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14657105/>
6. **ARCELLES, M.** Prevalencia de Tuberculosis bovina en el distrito de Vegueta, provincia de Huaura en los años 2001-2002 [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina

veterinaria) Universidad Nacional mayor de San Marcos, Lima, Peru. 2004. pp. 8,9.
[Consulta: 2020-04-13]. Disponible en:
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1534/Arcelles_pm.pdf?sequence=1&isAllowed=y

7. **AYALA, A. E.** Tuberculosis abordaje faraceutico. OFFARM [en linea], 2007, (España) Vol. 26(10), pp. 88-94. [Consulta: 15 abril 2020]. ISSN 0212-047X. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13112894>
8. **BAPTISTA, F.; et al.** Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [en linea], 2004, (Brasil) Vol. 56(5), pp. 577-580. [Consulta: 05 julio 2020]. ISSN 1678-4162. Disponible en: <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v56n5/a02v56n5.pdf>
9. **BERMEO , G.** Análisis basado en lamp (Amplificación isotérmica mediada por Loop) PARA LA detección de Mycobacteriumbovisenel camal municipal del cantón Valencia [En linea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2019. p. 38. [Consulta: 2020-06-20]. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3728/1/T-UTEQ-0039.pdf>
10. **BRYNE, A.; et al.** Bovine tuberculosis visible lesions in cattle culled during herd breakdowns: the effects of individual characteristics, trade movement and co-infection. BMC Veterinary Research [en linea]. Ireland, 2017. Vol.13. N°400, pp. 1–14. [Consulta: 24 de julio de 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12917-017-1321-z#citeas>
11. **BURGASÍ , E.** Determinación de la Prevalencia de las Principales Enfermedades Infecciosas y Endoparasitarias en Hatos Lecheros de Pequeños Productores, en las Comunidades de Taxojaló y Guantualó, del Cantón Sigchos provincia de Cotopaxi [En linea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2014. p. 127. [Consulta: 2020-06-15]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/3760/1/17T1228.pdf>
12. **BURTHER , S., BENNETT , M., & KIPAR , A.** Tuberculosis (Mycobacterium microti) in wild field vole populations. Parasitology [en linea], 2008, (Reino Unido) Vol.135(3), pp. 309-317. [Consulta: 01 julio 2020]. ISSN 0031-1820. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2966968/>

13. **CADMUS , S.; et al.** Factores de riesgo asociados con la tuberculosis bovina en algunos rebaños seleccionados en Nigeria. Trop Anim Health Prod [en línea], 2010, (Nigeria) Vol. 42(4), pp. 547-549. [Consulta: 13 mayo 2020]. ISSN 11250-009. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-009-9463-z>
14. **COUSINS , D.; et al.** Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol [en línea], 2003, (Great Britain) Vol.53(5), pp. 1305-1314. [Consulta:11 julio 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13130011/>
15. **CRISPELL, J.; et al.** Combining genomics and epidemiology to analyse bi-directional transmission of Mycobacterium bovis in a multi-host system. Elife. [en línea]. EE.UU, 2019. Vol.8. N°1, pp. 1–36. [Consulta: 19 de julio de 2020]. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/45833>
16. **CRUZ, L., & POZO, K.** Diagnóstico de mycobacterium bovis en bovinos faenados en el camal de daule durante el mes de noviembre del año 2018 [En línea]. (Trabajo de titulación). (Medicina veterinaria y zootecnia) Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. 2019. pp. 5,19,20,21,23. [Consulta: 2020-05-20]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39228/1/2019%20Cruz%20Molleturo%20Lissette%20y%20Pozo%20M%C3%A1rquez%20Kevin.pdf>
17. **CUSHICÓNDOR , D.** Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) mediante inspección post-mortem y cultivo bacteriológico en el matadero municipal del Cantón Mejía (Pichincha) [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina veterinaria y zootecnia). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. 2014. pp. 32,33. [Consulta: 2020-06-29]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6634/1/T- UCE-0014-010.pdf>
18. **DE JONG , B., ANTONIO , M., & GAGNEUX, S.** Mycobacterium africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. LoS Negl Trop Dis [en línea], 2010, (Francia) Vol.13(2), pp. e774. [Consulta: 08 julio 2020]. ISSN 1609-9117. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744>

19. **DEMELASH, B.; et al.** Prevalencia De Tuberculosis Bovina En Ganado Etíope De Masacre Basado En Examen Post-Mortem. Trop Anim Health Prod [en línea], 2009, (Etiopía) Vol.41(5), pp. 755–765. [Consulta: 18 julio 2020]. ISSN 11250-008. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19058024/>
20. **DORRONSORO, I., & TORROBa, L.** Microbiología de la tuberculosis. Anales del sistema de Navarra [en línea], 2007, (España), Vol. 30(2), pp. 67-85. [Consulta: 22 junio 2020]. ISSN 1137-6627. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original5.pdf>.
21. **DUBARRY, J.; et al.** Actinomicosis y Actinobacilosis: una causa frecuente de lesiones granulomatosas en los bovinos del Departamento Maracó de la provincia de La Pampa - República Argentina. Ciencia Veterinaria [en línea], 2004, (Argentina) Vol. 6(1), pp.34-41. [Consulta: 03 junio 2020]. ISSN 1515-1883. Disponible en: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1940>
22. **ECHEVERRIA, G.** Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina (tbb) mediante la aplicación de nested-pcr en bovinos faenados en los camales municipales de los cantones Cayambe (Pichincha) Y Pelileo (Tungurahua) [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, Ecuador. 2011. pp. 5,11,15,19,30,31,32. [Consulta: 2020-07-15]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/4982/T-ESPE-033021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. **ECUVET SERVICIOS VETERINARIOS DEL ECUADOR.** *Tuberculosis bovina en el Ecuador.* [blog]. 2016. [Consulta: 24 mayo 2020]. Disponible en: <http://ecuvet.blogspot.com/2016/04/>
24. **ESPER , R., & MACHADO , R.** La investigación en medicina: bases teóricas y prácticas. Elementos de bioestadística. Revista Argentina de Cardiología [en línea], 2008, (Argentina) Vol. 76(6), p. 495. [Consulta: 10 mayo 2020]. ISSN 0034-7000. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3053/305327093015.pdf>
25. **ESPINOZA , S.** Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina en el hato ganadero de la hacienda "Cerro viejo" de la parroquia San Juan, perteneciente al cantón Riobamba, provincia de Chimborazo [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. [Consulta: 2020-04-03]. Disponible en:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5325/1/17T1371.pdf>

26. **FLORES, H.** Prevalencia y pérdidas económicas provocadas por tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en una planta faenadora de la Región de Los Lagos, 2006 -2010 [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería Agronómica) Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. 2012. [Consulta: 2020-07-24]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5325>
27. **GALINDO, E.** *Problemas y Ejercicios de Probabilidad y Estadística* [en línea]. Ecuador: Universidad de las Américas, 2008. [Consulta: 08 mayo 2020]. Disponible en: [http://biblioteca.udla.edu.ec/client/es_EC/default/search/detailnonmodal/ent:\\$002f\\$002fSD_ILS\\$002f0\\$002fSD_ILS:24029/ada?qu=MUESTREO&ic=true&te=ILS&ps=300](http://biblioteca.udla.edu.ec/client/es_EC/default/search/detailnonmodal/ent:$002f$002fSD_ILS$002f0$002fSD_ILS:24029/ada?qu=MUESTREO&ic=true&te=ILS&ps=300)
28. **GARBACCIO, S.; et al.** Ensayo interlaboratorio: aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de lesiones granulomatosas en bovinos. Interlaboratory test: Isolation of *Mycobacterium bovis* from granulomatous lesions in bovine. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2016, (Argentina) Vol. 48(2), pp. 161-165. [Consulta: 04 junio 2020]. ISSN 1851-7617. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300025>
29. **GARNIER, T.; et al.** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [en línea], 2003, (EE.UU) Vol. 100(13), pp.7877-7882. [Consulta: 01 de julio de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/10723395_The_complete_genome_sequence_of_Mycobacterium_bovis
30. **GARRO, C.** Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo (Tuberculosis in calves: results of a prospective study). *REDVET* [en línea], 2011, (Argentina) Vol. 12(12), pp. 1-11. [Consulta: 01 julio 2020]. ISSN 1695-7504. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/6_tuberculosis_terneros.pdf
31. **GONZALES, K.** *Tuberculosis Bovina*. [blog]. 2020. [Consulta: 21 marzo 2020]. Disponible en: <https://zoovetespasion.com/ganaderia/enfermedades-bovinas/tuberculosis-bovina/>

32. **GUAMÁN, M.** Diagnostico de tuberculosis bovina mediante alerginizacion [En linea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2012. p. 36. [Consulta: 2020-06-24]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2126/1/17T1096.pdf>
33. **GUARDIOLA, J.** Detección de mycobacterium bovis en pulmón y nódulo linfático mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (pcr) [En linea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Torreón, México. 2009. p. 80. [Consulta: 2020-06-11]. Disponible en: http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2919/JOSE_FINA%20GUARDIOLA%20SANDOVAL.pdf?sequence=1
34. **HERRERA , E.** Diagnóstico de Tuberculosis Bovina, mediante la Prueba Intradérmica Cervical comparada en cinco hatos lecheros en la Ciudad de Otavalo, Provincia de Imbabura [En linea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad de las Americas, Otavalo, Ecuador. 2011. p. 44. [Consulta: 2020-05-11]. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2808/8/UDLA-EC-TMVZ-2011-12.pdf>
35. **HURTADO , M.** Diagnóstico de tuberculosis bovina mediante la prueba intradérmica caudal (tuberculinas) en los cantones de Esmeraldas, Eloy Alfaro y Quinde de la provincia de Esmeraldas [En linea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2015. p. 25. [Consulta: 2020-05-27]. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1543/1/T-UTEQ-0178.pdf>
36. **JACOBUS, H.** *Tuberculosis bovina Manual de ganaderia doble roosito* [en linea]. Venezuela: Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina, 2005. [Consulta: 02 junio 2020]. Disponible en: [http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online-ganaderia/seccion5/articulo14-s5.pdf](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo14-s5.pdf)
37. **LORENTE, V.; et al.** Validation of a Real-Time PCR for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Members in Bovine Tissue Samples. Vet Sci [en linea]. España, 2019. Vol.6. N°61, pp. 1–9. [Consulta: 12 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00061/full>
38. **MÉNDEZ, S., & PÉREZ, E.** La PCR múltiple en microbiología clínica. Elsevier [en linea], 2004, (España) Vol. 22(3), pp. 183 - 192. [Consulta: 19 junio 2020]. ISSN 0213-005X. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas->

39. **MONTES BOHORQUEZ, H. M.** *Curso virtual No 1 epidemiologia grado undecimo 2011*. [blog]. 2011. [Consulta: 28 junio 2020]. Disponible en: <http://cienciasagropecuariassucre.blogspot.com/2011/06/curso-virtual-no-1-epidemiologia-grado.html>
40. **MICHELET, L.; et al.** Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. PLoS One [en línea]. EE.UU, 2018. Vol.13. N°11, pp. 1–10. [Consulta: 15 de julio de 2020]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0207614>
41. **MOYANO, J.; et al.** Prevalencia de enfermedades infecciosas en la Amazonia del Ecuador. Memorias del XXXIX Congreso Nacional e Internacional de Buiatria [en línea], 2015, (México), Vol. 39(1), pp. 37-39. [Consulta: 12 junio 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Frank_Goyes/publication/312653150_Ganancia_de_peso_en_ovinos_alimentados_con_ensilajes_de_Pennisetum_purpureum_y_un_suplemento_proteico/links/58897635a6fdcc9a35c14c9c/Ganancia-de_peso-en-ovinos-alimentados-con-ensilajes-de-Pennisetum-purpureum-y-un-suplemento-proteico.pdf
42. **MURAI, K.; et al.** *Tuberculosis bovina: distribución mundial y aplicación de medidas de prevención y control según los datos de WAHIS* [en línea]. Francia: Bulletin de l'OIE, 2019. [Consulta: 17 julio 2020]. Disponible en: <https://oiebulletin.com/index.php?panorama=wahis-tb-es&lang=es&edition=7596&pdf=panorama&article=8602>
43. **NUQUES, C.** Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) en 3 hatos ganaderos del cantón General Antonio Elizalde (Bucay) [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. 2019. pp. 4,7,15. [Consulta: 2020-06-19]. Disponible en: <http://192.188.52.94:8080/bitstream/3317/12712/1/T-UCSG-PRE-TEC-CMV-65.pdf>
44. **OJEDA, F.** Prevalencia de tuberculosis bovina en hatos lecheros del distrito de Taraco [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. 2017. p. 10. [Consulta: 2020-07-08]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7183/Ojeda_Gutierrez_Fr

[ancisco_Vidal.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

45. **OLEA, F.; et al.** Zoonotic tuberculosis in human beings caused by Mycobacterium bovis- a call for action. *The Lancet Infectious Diseases* [en línea], 2017, (EE.UU) Vol. 17(1), pp. 21-24. [Consulta: 28 junio 2020]. ISSN 1473-3099. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(16\)30139-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(16)30139-6/fulltext)
46. **OMS, FAO, & OIE.** *Hoja de ruta contra la tuberculosis zoonótica* [en línea]. Francia: Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018. [Consulta: 15 mayo 2020]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Tuberculosis/Hoja_de_ruta_TB.pdf
47. **OMS.** *Informe mundial sobre la tuberculosis* [en línea]. Francia: Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019. [Consulta: 28 junio 2020]. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2019_ExecutiveSummary_es.pdf?ua=1
48. **OMS.** *Reporte global de tuberculosis* [en línea]. Francia: Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018. [Consulta: 06 mayo 2020]. Disponible en: <http://www.actbistas.org/wp-content/uploads/2019/02/9789241565646-eng.pdf>
49. **ORBE , G.** Prevalencia de tuberculosis bovina en haciendas ganaderas de la Parroquia Tulcán del Cantón Tulcán [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Tulcán, Ecuador. 2019. p. 53. [Consulta: 2020-05-19]. Disponible en <http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/830/1/361%20Prevalencia%20de%20tuberculosis%20bovina%20en%20haciendas%20ganaderas%20de%20la%20parroquia%20tulcan%20del%20canton%20tulcan.pdf>
50. **PACCHA , D.** Diagnóstico de tuberculosis bovina, por medio de la prueba cervical comparativa en hembras bovinas de la hoya de Loja [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Nacional de Loja, Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Loja, Ecuador. 2012. p. 8. [Consulta: 2020-06-20]. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5399/1/TESIS%20Darwin%20Aurelio%20Paccha%20Paccha%20DIAGN%20C3%293STICO%20DE%20TUBERCULOSIS%20BOVINA..pdf>

51. **PALACIOS, C.** Aplicación de la técnica de lamp en el estudio de (*Mycobacterium Bovis*) en el camal municipal del cantón El Empalme, provincia del Guayas 2018 [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2019. p. 46. [Consulta: 2020-05-10]. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3723/1/T-UTEQ-0033.pdf>
52. **PARSONS, L.; et al.** Rapid and Simple Approach for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by PCR Based Genomic Deletion Analysis. *American Society For Microbiology* [en línea], 2002, (EE.UU) Vol. 40(7), pp. 2339-2345. [Consulta: 11 mayo 2020]. ISSN 0095-1137. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/40/7/2339>
53. **PILLACHO, P.** Prevalencia de tuberculosis bovina en la parroquia santa martha de cuba del Cantón Tulcán [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Carchi, Ecuador. 2015. p. 22. [Consulta: 2020-05-20]. Disponible en: <http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/468/1/292%20prevalencia%20de%20tuberculosis%20bovina%20en%20la%20parroquia%20santa%20martha%20de%20cuba%20del%20caton%20tulcan.pdf>
54. **PLÚAS, L.** Técnica de LAMP (amplificación isotérmica mediada por Loop) para la detección directa de *Mycobacterium bovis* en el Camal Municipal del cantón Buena Fe [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2019. p. 38. [Consulta: 2020-07-03]. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3725/1/T-UTEQ-0035.pdf>
55. **PROAÑO, F.; et al.** Preliminary observations on *mycobacterium* spp. in dairy cattle in Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea], 2006, (Ecuador) Vol. 75(2), pp. 318-323.. [Consulta: 06 junio 2020]. ISSN 0002-9637. Disponible en: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2006.75.318>
56. **QUEZADA, N., & RETAMAL.** La tuberculosis bovina: el desafío sanitario de Chile. *TECNOVET* [en línea], 2010, (Chile) Vol. 16(1), pp. 26-29. [Consulta: 30 junio 2020]. ISSN 0718-1817. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/122617/la-tuberculosis-bovina-el-desafio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
57. **QUINATO A , I., & CHICAIZA, J.** Análisis de factores de riesgo y determinación de

la prevalencia de tuberculosis bovina utilizando técnicas estadísticas bayesianas en las provincias de Cotopaxi, Carchi e Imbabura [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. 2013. p. 23. [Consulta: 2020-06-05]. O Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1274/1/T-UCE-0014-34.pdf>

58. **QUISIGUANO , O., PAREDES, J., & MOSQUERA , J.** Prevalencia de brucelosis bovina en el periodo 2004-2012 y tuberculosis bovina en el periodo 2006-2012 en hatos lecheros del Cantón Mejía. Revista Científica Masakana [en línea], 2015, (Ecuador) Vol. 6(1), pp. 215-216. [Consulta: 01 julio 2020]. ISSN 2477-8893. Disponible en: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/683/597>
59. **RAMOS, N.** Determinación de prevalencia de tuberculosis bovina a nivel de hatos ganaderos en la parte baja de la provincia del Oro [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador. 2017. pp. 20,23,24,29. [Consulta: 2020-05-20]. Disponible en: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11718/1/DE00014_TRABAJO_DETITULACION.pdf
60. **ROA , J.** Estudio de la prevalencia de tuberculosis bovina en ganaderías bovinas del Cantón Loja [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador. 2015. p. 46,48. [Consulta: 2020-04-05]. Disponible en: <http://192.188.49.17/jspui/bitstream/123456789/11684/1/TESIS%20JUNIOR%20EDUARDO%20ROA%20ARMIJOS.pdf>
61. **ROMÁN, F., & CHÁVEZ, R.** Prospección de Tuberculosis en ganaderías lecheras y en bovinos faenados del Cantón Loja. Centro de Biotecnología [en línea], 2014, (Ecuador) Vol. 3(1), pp. 52-60. [Consulta: 11 mayo 2020]. Disponible en: https://www.academia.edu/14823770/PROSPECCION_DE_TUBERCULOSIS_EN_GANADERIAS_LECHERAS_Y_EN_BOVINOS_FAENADOS_DEL_CANTON_LOJA
62. **ROMERO, B.** Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implantación en sanidad animal y salud pública [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Complutense, Madrid, España. 2012. pp. 3,4,7,9,25,26,27,28. [Consulta: 2020-04-05]. Disponible en: <https://www.visavet.es/data/tesis/tuberculosis-bovina-epidemiologia-molecular-implicacion-sanidad-animal-salud-publica.pdf>

63. **SALAZAR , S.** Prevalencia de tuberculosis (*mycobacterium bovis*) mediante la aplicación de la prueba de tuberculina en el sector sur-este de la Provincia de Santa Elena [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería Agropecuaria) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2017. p. 31. [Consulta: 2020-06-20]. Obtenido de: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2711/1/T-UTEQ-0077.pdf>
64. **SANCHEZ, D., & RAUL , R.** Prevalencia de la Tuberculosis Bovina en la provincia de Parinacochas, Ayacucho. *Rev. investig. vet. Perú* [en línea], 2002, (Perú) Vol.13(2), pp.100-102. [Consulta: 05 de julio 2020]. ISSN 1609-9117. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172002000200017&lng=es&nrm=iso
65. **SENASE.** *Prueba de tuberculina.* 1era ed. Esperanza, Argentina: Esperanza Distribuciones, 2013, p. 1.
66. **SHERWOOD, D.** *An assessment of the bovine tuberculosis eradication programme in Peru.* UK, Reino Unido: The University of Reading Veterinary, 1985
67. **SHITAYE, J. E.** A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS 6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. *Veterinarni Medicina-PRAHA* [en línea], 2006, (Czech Republic) Vol.51(11), pp. 512–522. [Consulta: 08 julio 2020]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/fc9d/e0172bf483c00fa74b7863fc7792794229a9.pdf>
68. **SOMOSKOVI , A., DORMANDY , J., & MAYRER , A.** “*Mycobacterium canettii*” Isolated from a Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient: First Case Recognized in the United States. *Clinical Microbiology* [en línea], 2009, (United States) Vol.47(1), pp. 255-257. [Consulta: 03 julio 2020]. ISSN 0095- 1137. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/47/1/255>
69. **SUQUILANDA, R.** Prevalencia de tuberculosis bovina (TBB), en el Cantón LOJA mediante inspección postmortem en el camal frigorífico de Loja [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador. 2015. pp. 8,9,10,11,12,13. [Consulta: 2020-06-19]. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec:9001/jspui/bitstream/123456789/10242/1/TESIS-%20Rober%20Luciano%20Suquilanda%20Lude%c3%b1a.pdf>


70. **TORRES, M.** Sistema de vigilancia epidemiológica mediante la detección en faena de la Tuberculosis bovina para la caracterización epidemiológica y control de la enfermedad en la Provincia de Entre Ríos [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 2009. [Consulta: 2020-06-12]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/file3383-tuber-bovina-tesis.pdf>
71. **VANEGAS, E., & MORA , A.** Diagnostico de mycobacteriosis por tecnicas microbiologicas en animales faenados en un camal de la Provincia del Guayas [Enlinea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad de guayaquil, Guayaquil, Ecuador. 2018. p. 37. [Consulta: 2020-07-01]. Obtenido de: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/32934/1/2018-%20343%20Vanegas%20Guerrero%2C%20Eduard-Mora%20Trujillo%2C%20Ana.pdf>
72. **VINUEZA, S.** Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina en la hacienda pucate del cantón Chambo provincia de Chimborazo [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2015. pp. 15,22,23,24. [Consulta: 2020-05-23]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/5215/1/17T1301.pdf>
73. **VISAVET.** *Manual de procedimiento para la toma y envío de muestras para cultivo microbiológico y diagnóstico de tuberculosis* [en línea]. España: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente - Universidad Complutense Madrid, 2017. [Consulta: 18 mayo 2020]. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/manual-de-procedimiento-para-la-toma-y-envio-de-muestras-para-cultivo-microbiologico-y-diagnostico-de-tuberculosis/12=525/>
74. **VITONERA, R.** Tuberculosis bovina en animales faenados en el camal del Cantón Santa Rosa de el Oro [En línea] (Trabajo de titulación). (Medicina) Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador. 2015. pp. 32, 33, 34. [Consulta: 2020-05-07]. Disponible en: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15524/1/TTUACA-2020-MV-DE00008.pdf?fbclid=IwAR3-O0RWNkO6YHIM2YU3NIOoCPnbPl_SQi2s5ZytqHkAIjpKXCvkwD4jnU
75. **WARREN, R.; et al.** Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int J Tuberc Lung Dis [en línea], 2006, (Sudáfrica) Vol. 10(7), pp. 818-822. [Consulta: 11 mayo 2020]. ISSN 1027-3719. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/6934435> Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference

76. **ZAMBRANO , D., CASTILLO, E., & SIMBAÑA.** La producción de leche en Ecuador y Chimborazo: nuevas oportunidades e implicaciones ambientales. Yura: Relaciones internacionales [en línea], 2017, (Ecuador) Vol. 10(10), pp. 270 - 289. [Consulta: 19 junio 2020]. ISSN 1390-938x. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/322756060> La producción de leche en Ecuador y Chimborazo nuevas oportunidades e implicaciones ambientales
77. **ZAMBRANO , M.** Determinación de tuberculosis (mycobacterium bovis) con la prueba tuberculina en el área de influencia del cantón el Carmen [En línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad técnica estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2013. p. 27. [Consulta: 2020-06-22]. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/604/1/T-UTEQ-0096.pdf>

ANEXOS

ANEXO A. Registro de muestreo- Tuberculosis bovina

CENTRO INTERNACIONAL DE ZONOSIS (CIZ)							
REGISTRO DE TOMA DE MUESTRAS							
							
CAMAL MUNICIPAL DE RIOBAMBA							
ENCUESTADOR: BRENDA GUANANGA							
FECHA: 25 SEPTIEMBRE - 25 OCTUBRE							
Nº	CODIGO	EDAD (MESES)	SEXO (M/H)	CANTON	PROVINCIA	PULMON	G.MEDIASTINICOS Y BRONQUIALES
1	R1	37-49	M	Ambato	Tungurahua	X	X
2	R2	37-49	M	Ambato	Tungurahua	X	X
3	R3	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
4	R4	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
5	R5	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
6	R6	24-36	H	Ambato	Tungurahua	X	X
7	R7	50-62	M	Ambato	Tungurahua	X	X
8	R8	50-62	M	Ambato	Tungurahua	X	X
9	R9	24-36	H	Ambato	Tungurahua	X	X
10	R10	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
11	R11	24-36	H	Ambato	Tungurahua	X	X
12	R12	37-49	M	Ambato	Tungurahua	X	X
13	R13	37-49	M	Ambato	Tungurahua	X	X
14	R14	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
15	R15	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
16	R16	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
17	R17	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
18	R18	50-62	H	Ambato	Tungurahua	X	X
19	R19	24-36	M	Guano	Chimborazo	X	X
20	R20	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
21	R21	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
22	R22	37-49	H	Guano	Chimborazo	X	X
23	R23	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
24	R24	37-49	H	Ambato	Tungurahua	X	X
25	R25	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
26	R26	50-62	H	Morona	Morona Santiag	X	X
27	R27	50-62	H	Guano	Chimborazo	X	X
28	R28	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
29	R29	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
30	R30	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
31	R31	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
32	R32	50-62	H	Mocha	Tungurahua	X	X
33	R33	37-49	M	Colta	Chimborazo	X	X
34	R34	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
35	R35	37-49	M	Mocha	Tungurahua	X	X
36	R36	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
37	R37	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
38	R38	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
39	R39	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
40	R40	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
41	R41	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
42	R42	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
43	R43	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
44	R44	24-36	H	Guano	Chimborazo	X	X
45	R45	24-36	M	Guano	Chimborazo	X	X
46	R46	24-36	M	Guano	Chimborazo	X	X
47	R47	50-62	M	Guano	Chimborazo	X	X
48	R48	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
49	R49	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
50	R50	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X

51	R51	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
52	R52	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
53	R53	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
54	R54	37-49	M	Alausi	Chimborazo	X	X
55	R55	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
56	R56	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
57	R57	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
58	R58	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
59	R59	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
60	R60	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
61	R61	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
62	R62	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
63	R63	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
64	R64	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
65	R65	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
66	R66	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
67	R67	37-49	M	Mocha	Tungurahua	X	X
68	R68	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
69	R69	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
70	R70	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
71	R71	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
72	R72	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
73	R73	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
74	R74	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
75	R75	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
76	R76	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
77	R77	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
78	R78	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
79	R79	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
80	R80	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
81	R81	50-62	H	Guano	Chimborazo	X	X
82	R82	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
83	R83	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
84	R84	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
85	R85	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
86	R86	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
87	R87	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
88	R88	37-49	M	Guano	Chimborazo	X	X
89	R89	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
90	R90	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
91	R91	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
92	R92	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
93	R93	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
94	R94	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
95	R95	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
96	R96	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
97	R97	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
98	R98	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
99	R99	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
100	R100	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
101	R101	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
102	R102	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
103	R103	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
104	R104	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
105	R105	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
106	R106	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
107	R107	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
108	R108	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
109	R109	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
110	R110	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
111	R111	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
112	R112	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
113	R113	24-36	H	Guano	Chimborazo	X	X
114	R114	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
115	R115	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X

116	R116	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
117	R117	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
118	R118	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
119	R119	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
120	R120	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
121	R121	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
122	R122	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
123	R123	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
124	R124	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
125	R125	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
126	R126	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
127	R127	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
128	R128	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
129	R129	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
130	R130	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
131	R131	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
132	R132	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
133	R133	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
134	R134	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
135	R135	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
136	R136	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
137	R137	24-36	H	Guano	Chimborazo	X	X
138	R138	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
139	R139	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
140	R140	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
141	R141	37-49	H	Ambato	Tungurahua	X	X
142	R142	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
143	R143	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
144	R144	37-49	H	Ambato	Tungurahua	X	X
145	R145	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
146	R146	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
147	R147	37-49	M	Ambato	Tungurahua	X	X
148	R148	37-49	H	Ambato	Tungurahua	X	X
149	R149	37-49	H	Alausi	Chimborazo	X	X
150	R150	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
151	R151	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
152	R152	50-62	H	Colta	Chimborazo	X	X
153	R153	50-62	H	Guano	Chimborazo	X	X
154	R154	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
155	R155	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
156	R156	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
157	R157	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
158	R158	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
159	R159	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
160	R160	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
161	R161	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
162	R162	50-62	H	Guano	Chimborazo	X	X
163	R163	50-62	M	Ambato	Tungurahua	X	X
164	R164	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
165	R165	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
166	R166	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
167	R167	37-49	M	Guano	Chimborazo	X	X
168	R168	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
169	R169	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
170	R170	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
171	R171	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
172	R172	37-49	M	Guano	Chimborazo	X	X
173	R173	24-36	M	Azogues	Cañar	X	X
174	R174	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
175	R175	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
176	R176	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
177	R177	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
178	R178	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
179	R179	24-36	H	Mocha	Tungurahua	X	X
180	R180	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X

181	R181	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
182	R182	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
183	R183	50-62	M	Mocha	Tungurahua	X	X
184	R184	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
185	R185	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
186	R186	50-62	H	Colta	Chimborazo	X	X
187	R187	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
188	R188	50-62	H	Mocha	Tungurahua	X	X
189	R189	37-49	H	Colta	Chimborazo	X	X
190	R190	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
191	R191	24-36	M	Guano	Chimborazo	X	X
192	R192	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
193	R193	24-36	M	Mocha	Tungurahua	X	X
194	R194	24-36	M	Mocha	Tungurahua	X	X
195	R195	50-62	M	Guano	Chimborazo	X	X
196	R196	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
197	R197	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
198	R198	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
199	R199	50-62	M	Alausi	Chimborazo	X	X
200	R200	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
201	R201	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
202	R202	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
203	R203	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
204	R204	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
205	R205	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
206	R206	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
207	R207	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
208	R208	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
209	R209	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
210	R210	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
211	R211	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
212	R212	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
213	R213	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
214	R214	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
215	R215	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
216	R216	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
217	R217	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
218	R218	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
219	R219	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
220	R220	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
221	R221	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
222	R222	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
223	R223	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
224	R224	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
225	R225	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
226	R226	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
227	R227	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
228	R228	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
229	R229	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
230	R230	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
231	R231	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
232	R232	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
233	R233	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
234	R234	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
235	R235	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
236	R236	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
237	R237	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
238	R238	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
239	R239	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
240	R240	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
241	R241	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
242	R242	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
243	R243	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
244	R244	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
245	R245	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X

246	R246	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
247	R247	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
248	R248	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
249	R249	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
250	R250	50-62	M	Guamote	Chimborazo	X	X
251	R251	24-36	H	Guamote	Chimborazo	X	X
252	R252	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
253	R253	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
254	R254	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
255	R255	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
256	R256	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
257	R257	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
258	R258	24-36	M	Guamote	Chimborazo	X	X
259	R259	50-62	H	Guamote	Chimborazo	X	X
260	R260	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
261	R261	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
262	R262	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
263	R263	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
264	R264	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
265	R265	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
266	R266	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
267	R267	37-49	M	Guamote	Chimborazo	X	X
268	R268	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
269	R269	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
270	R270	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
271	R271	37-49	H	Morona	Morona Santiag	X	X
272	R272	37-49	H	Guano	Chimborazo	X	X
273	R273	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
274	R274	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
275	R275	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
276	R276	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
277	R277	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
278	R278	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
279	R279	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
280	R280	50-62	H	Alausi	Chimborazo	X	X
281	R281	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
282	R282	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
283	R283	37-49	H	Ambato	Tungurahua	X	X
284	R284	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
285	R285	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
286	R286	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
287	R287	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
288	R288	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
289	R289	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
290	R290	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
291	R291	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
292	R292	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
293	R293	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
294	R294	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
295	R295	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
296	R296	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
297	R297	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
298	R298	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
299	R299	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
300	R300	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
301	R301	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
302	R302	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
303	R303	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
304	R304	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
305	R305	24-36	H	Morona	Morona Santiag	X	X
306	R306	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
307	R307	37-49	H	Guamote	Chimborazo	X	X
308	R308	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
309	R309	24-36	H	Quero	Tungurahua	X	X
310	R310	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X

311	R311	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
312	R312	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
313	R313	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
314	R314	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
315	R315	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
316	R316	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
317	R317	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
318	R318	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
319	R319	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
320	R320	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
321	R321	50-62	M	Alausi	Chimborazo	X	X
322	R322	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
323	R323	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
324	R324	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
325	R325	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
326	R326	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
327	R327	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
328	R328	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
329	R329	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
330	R330	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
331	R331	24-36	M	Ambato	Chimborazo	X	X
332	R332	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
333	R333	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
334	R334	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
335	R335	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
336	R336	50-62	M	Ambato	Tungurahua	X	X
337	R337	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
338	R338	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
339	R339	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
340	R340	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
341	R341	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
342	R342	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
343	R343	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
344	R344	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
345	R345	50-62	H	Mocha	Tungurahua	X	X
346	R346	24-36	M	Colta	Chimborazo	X	X
347	R347	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
348	R348	24-36	M	Ambato	Tungurahua	X	X
349	R349	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
350	R350	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
351	R351	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
352	R352	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
353	R353	24-36	M	Guano	Chimborazo	X	X
354	R354	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
355	R355	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
356	R356	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
357	R357	50-62	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
358	R358	24-36	M	Colta	Chimborazo	X	X
359	R359	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
360	R360	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
361	R361	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
362	R362	24-36	M	Colta	Chimborazo	X	X
363	R363	37-49	H	Colta	Chimborazo	X	X
364	R364	24-36	M	Mocha	Tungurahua	X	X
365	R365	24-36	H	Colta	Chimborazo	X	X
366	R366	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
367	R367	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
368	R368	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
369	R369	24-36	H	Mocha	Tungurahua	X	X
370	R370	24-36	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
371	R371	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
372	R372	24-36	H	Quero	Tungurahua	X	X
373	R373	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
374	R374	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X

375	R375	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
376	R376	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
377	R377	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
378	R378	24-36	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
379	R379	37-49	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
380	R380	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
381	R381	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
382	R382	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X
383	R383	37-49	M	Riobamba	Chimborazo	X	X
384	R384	50-62	H	Riobamba	Chimborazo	X	X

ANEXO B. Recolección de muestras ganglionares y de pulmón de bovinos faenados en el Camal Municipal de Riobamba



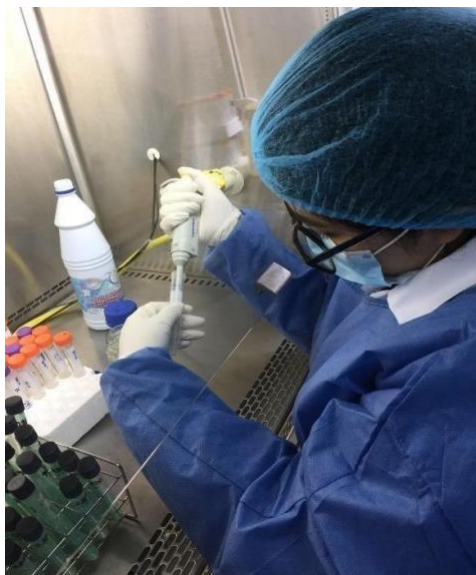


ANEXO C. Registro de los bovinos muestreados



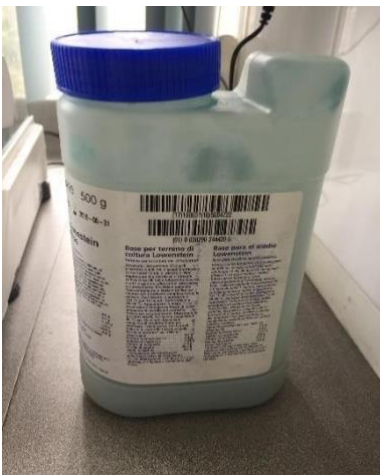


ANEXO D. Procesamiento de las muestras tomadas en el laboratorio de microbiología (CIZ)





ANEXO E. Preparación de medios de cultivos (Stonebrink y Lowestein Jensen) y siembra de las muestras

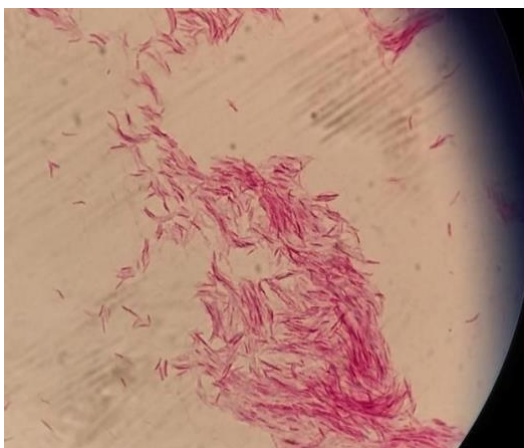




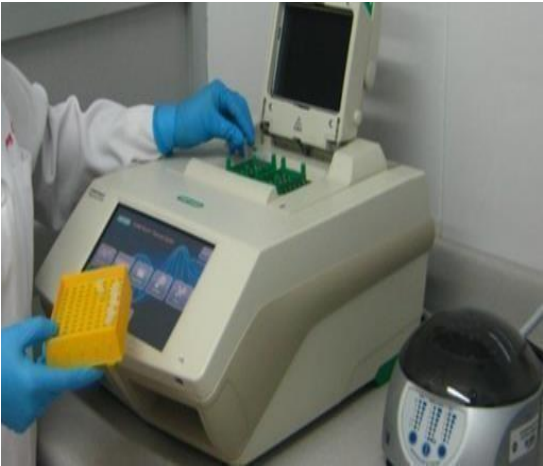
ANEXO F. Crecimiento de mycobacterias en los medios de cultivo



ANEXO G. Tinción Zeinhn Nelsen y observación de los bacilos



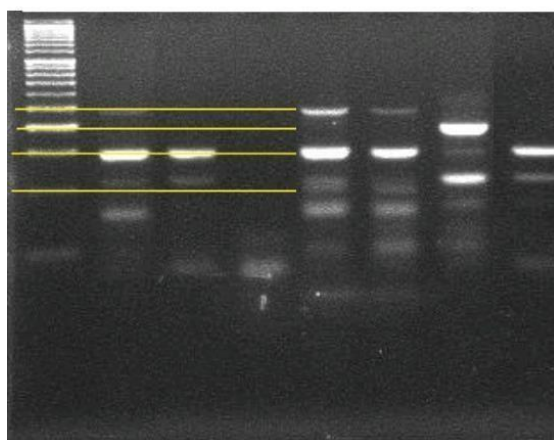
ANEXO H. Procesamiento de las muestras en el laboratorio de biología molecular(CIZ)



ANEXO I. Electroforesis y verificación del segmento de ADN amplificado



M. 1. 2. 3. Mtb H37RV. BCG.



ANEXO J. Reporte de resultados



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN ZOONOSIS - CIZ

HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

PARÁMETROS	
<i>CÓDIGO</i>	<i>M.B</i>
<i>MUESTRAS</i>	<i>PULMON, GANGLIOS MEDIASTINICOS Y BRONQUIALES</i>
<i>ESTADO DE LA MUESTRAS</i>	<i>SOLIDA</i>
<i>NOMBRE DE LA MUESTRAS</i>	<i>PULMON, GANGLIOS MEDIASTINICOS Y BRONQUIALES</i>
<i>FECHA DE INICIO DE LOS ANÁLISIS EN EL LABORATORIO</i>	<i>2020-09-25</i>
<i>LUGAR DE MUESTREO</i>	<i>CAMAL MUNICIPAL DE RIOBAMBA</i>
<i>FECHA DE MUESTREO</i>	<i>2019-09-25</i>
<i>ANÁLISIS SOLICITADOS</i>	<i>CULTIVO MICROBIOLÓGICO Y PCR</i>

2. RESULTADOS

➤ Análisis Microbiológicos

Tabla 1. Reporte de Resultados: cultivo, tinción y PCR .

N °MUESTARA	CODIGO	CULTIVO	ZIEHL NEELSEN	PCR
1	C1	negativo	negativo	—
2	C2	negativo	negativo	—
3	C3	negativo	negativo	—
4	C4	negativo	negativo	—
5	C5	negativo	negativo	—
6	C6	negativo	negativo	—
7	C7	negativo	negativo	—
8	C8	negativo	negativo	—
9	C9	negativo	negativo	—
10	C10	negativo	negativo	—
11	C11	negativo	negativo	—



12	C12	negativo	negativo	—
13	C13	negativo	negativo	—
14	C14	negativo	negativo	—
15	C15	negativo	negativo	—
16	C16	negativo	negativo	—
17	C17	negativo	negativo	—
18	C18	negativo	negativo	—
19	C19	negativo	negativo	—
20	C20	negativo	negativo	—
21	C21	negativo	negativo	—
22	C22	negativo	negativo	—
23	C23	negativo	negativo	—
24	C24	negativo	negativo	—
25	D1	negativo	negativo	—
26	D2	negativo	negativo	—
27	D3	negativo	negativo	—
28	D4	negativo	negativo	—
29	D5	negativo	negativo	—
30	D6	negativo	negativo	—
31	D7	negativo	negativo	—
32	D8	negativo	negativo	—
33	D9	negativo	negativo	—
34	D10	negativo	negativo	—
35	D11	negativo	negativo	—
36	D12	negativo	negativo	—
37	D13	negativo	negativo	—
38	D14	negativo	negativo	—
39	D15	negativo	negativo	—
40	D16	negativo	negativo	—
41	D17	negativo	negativo	—
42	D18	negativo	negativo	—
43	D19	negativo	negativo	—
44	D20	negativo	negativo	—
45	D21	negativo	negativo	—
46	D22	negativo	negativo	—
47	D23	negativo	negativo	—
48	E1	negativo	negativo	—
49	E2	negativo	negativo	—
50	E3	negativo	negativo	—
51	E4	negativo	negativo	—
52	E5	negativo	negativo	—



53	E6	negativo	negativo	—
54	E7	negativo	negativo	—
55	E8	negativo	negativo	—
56	E9	negativo	negativo	—
57	E10	negativo	negativo	—
58	E11	negativo	negativo	—
59	E12	negativo	negativo	—
60	E13	negativo	negativo	—
61	E14	negativo	negativo	—
62	E15	negativo	negativo	—
63	E16	negativo	negativo	—
64	E17	negativo	negativo	—
65	E18	negativo	negativo	—
66	E19	negativo	negativo	—
67	E20	negativo	negativo	—
68	E21	negativo	negativo	—
69	E22	negativo	negativo	—
70	E23	negativo	negativo	—
71	E24	negativo	negativo	—
72	E25	negativo	negativo	—
73	E26	negativo	negativo	—
74	E27	negativo	negativo	—
75	E28	negativo	negativo	—
76	E29	negativo	negativo	—
77	E30	negativo	negativo	—
78	E31	negativo	negativo	—
79	E32	negativo	negativo	—
80	E33	negativo	negativo	—
81	F1	negativo	negativo	—
82	F2	negativo	negativo	—
83	F3	negativo	negativo	—
84	F4	negativo	negativo	—
85	F5	negativo	negativo	—
86	F6	negativo	negativo	—
87	F7	negativo	negativo	—
88	F8	negativo	negativo	—
89	F9	negativo	negativo	—
90	F10	negativo	negativo	—
91	F11	negativo	negativo	—
92	F12	negativo	negativo	—
93	F13	negativo	negativo	—



94	F14	negativo	negativo	—
95	F15	negativo	negativo	—
96	F16	negativo	negativo	—
97	F17	negativo	negativo	—
98	F18	negativo	negativo	—
99	F19	negativo	negativo	—
100	F20	negativo	negativo	—
101	F21	negativo	negativo	—
102	F22	negativo	negativo	—
103	F23	negativo	negativo	—
104	F24	negativo	negativo	—
105	F25	negativo	negativo	—
106	F26	negativo	negativo	—
107	F27	negativo	negativo	—
108	F28	negativo	negativo	—
109	F29	negativo	negativo	—
110	F30	negativo	negativo	—
111	F31	negativo	negativo	—
112	F32	negativo	negativo	—
113	F33	negativo	negativo	—
114	G1	negativo	negativo	—
115	G2	negativo	negativo	—
116	G3	negativo	negativo	—
117	G4	positivo	positivo	<i>M.bovis</i>
118	G5	negativo	negativo	—
119	G6	negativo	negativo	—
120	G7	negativo	negativo	—
121	G8	negativo	negativo	—
122	G9	negativo	negativo	—
123	G10	negativo	negativo	—
124	G11	negativo	negativo	—
125	G12	negativo	negativo	—
126	G13	negativo	negativo	—
127	G14	negativo	negativo	—
128	G15	negativo	negativo	—
129	G16	negativo	negativo	—
130	G17	negativo	negativo	—
131	G18	negativo	negativo	—
132	G19	negativo	negativo	—
133	G20	negativo	negativo	—
134	G21	negativo	negativo	—



135	G22	negativo	negativo	—
136	G23	negativo	negativo	—
137	G24	negativo	negativo	—
138	G25	negativo	negativo	—
139	H1	negativo	negativo	—
140	H2	negativo	negativo	—
141	H3	negativo	negativo	—
142	H4	negativo	negativo	—
143	H5	negativo	negativo	—
144	H6	negativo	negativo	—
145	H7	negativo	negativo	—
146	H8	negativo	negativo	—
147	H9	negativo	negativo	—
148	H10	negativo	negativo	—
149	H11	negativo	negativo	—
150	H12	negativo	negativo	—
151	H13	negativo	negativo	—
152	H14	negativo	negativo	—
153	H15	negativo	negativo	—
154	H16	negativo	negativo	—
155	H17	negativo	negativo	—
156	H18	negativo	negativo	—
157	H19	negativo	negativo	—
158	H20	negativo	negativo	—
159	H21	negativo	negativo	—
160	H22	negativo	negativo	—
161	H23	negativo	negativo	—
162	H24	negativo	negativo	—
163	H25	negativo	negativo	—
164	H26	negativo	negativo	—
165	H27	negativo	negativo	—
166	H28	negativo	negativo	—
167	H29	negativo	negativo	—
168	I1	negativo	negativo	—
169	I2	negativo	negativo	—
170	I3	negativo	negativo	—
171	I4	negativo	negativo	—
172	I5	negativo	negativo	—
173	I6	negativo	negativo	—
174	I7	negativo	negativo	—
175	I8	negativo	negativo	—



176	I9	negativo	negativo	—
177	I10	negativo	negativo	—
178	I11	negativo	negativo	—
179	I12	negativo	negativo	—
180	I13	negativo	negativo	—
181	I14	negativo	negativo	—
182	I15	negativo	negativo	—
183	I16	negativo	negativo	—
184	I17	negativo	negativo	—
185	I18	negativo	negativo	—
186	I19	negativo	negativo	—
187	I20	negativo	negativo	—
188	I21	negativo	negativo	—
189	I22	negativo	negativo	—
190	I23	negativo	negativo	—
191	I24	negativo	negativo	—
192	I25	negativo	negativo	—
193	I26	negativo	negativo	—
194	I27	negativo	negativo	—
195	I28	negativo	negativo	—
196	I29	negativo	negativo	—
197	I30	negativo	negativo	—
198	I31	negativo	negativo	—
199	I32	negativo	negativo	—
200	I33	negativo	negativo	—
201	I34	negativo	negativo	—
202	I35	negativo	negativo	—
203	J1	negativo	negativo	—
204	J2	negativo	negativo	—
205	J3	negativo	negativo	—
206	J4	negativo	negativo	—
207	J5	negativo	negativo	—
208	J6	negativo	negativo	—
209	J7	negativo	negativo	—
210	J8	negativo	negativo	—
211	J9	negativo	negativo	—
212	J10	negativo	negativo	—
213	J11	negativo	negativo	—
214	J12	negativo	negativo	—
215	J13	negativo	negativo	—
216	J14	negativo	negativo	—



217	J15	negativo	negativo	—
218	J16	negativo	negativo	—
219	J17	negativo	negativo	—
220	J18	negativo	negativo	—
221	J19	negativo	negativo	—
222	J20	negativo	negativo	—
223	J21	negativo	negativo	—
224	J22	negativo	negativo	—
225	J23	negativo	negativo	—
226	J24	negativo	negativo	—
227	J25	negativo	negativo	—
228	J26	negativo	negativo	—
229	J27	negativo	negativo	—
230	J28	negativo	negativo	—
231	J29	negativo	negativo	—
232	J30	negativo	negativo	—
233	J31	negativo	negativo	—
234	J32	negativo	negativo	—
235	J33	negativo	negativo	—
236	J34	negativo	negativo	—
237	J35	negativo	negativo	—
238	K1	negativo	negativo	—
239	K2	negativo	negativo	—
240	K3	negativo	negativo	—
241	K4	negativo	negativo	—
242	K5	negativo	negativo	—
243	K6	negativo	negativo	—
244	K7	negativo	negativo	—
245	K8	negativo	negativo	—
246	K9	negativo	negativo	—
247	K10	negativo	negativo	—
248	K11	negativo	negativo	—
249	K12	negativo	negativo	—
250	K13	negativo	negativo	—
251	K14	negativo	negativo	—
252	K15	negativo	negativo	—
253	K16	negativo	negativo	—
254	K17	negativo	negativo	—
255	K18	negativo	negativo	—
256	K19	negativo	negativo	—
257	K20	negativo	negativo	—



258	K21	negativo	negativo	—
259	K22	negativo	negativo	—
260	K23	negativo	negativo	—
261	K24	negativo	negativo	—
262	K25	negativo	negativo	—
263	K26	negativo	negativo	—
264	K27	negativo	negativo	—
265	K28	negativo	negativo	—
266	K29	negativo	negativo	—
267	K30	negativo	negativo	—
268	L1	negativo	negativo	—
269	L2	negativo	negativo	—
270	L3	negativo	negativo	—
271	L4	negativo	negativo	—
272	L5	negativo	negativo	—
273	L6	negativo	negativo	—
274	L7	negativo	negativo	—
275	L8	negativo	negativo	—
276	L9	negativo	negativo	—
277	L10	negativo	negativo	—
278	M1	negativo	negativo	—
279	M2	negativo	negativo	—
280	M3	negativo	negativo	—
281	M4	negativo	negativo	—
282	M5	negativo	negativo	—
283	M6	negativo	negativo	—
284	M7	negativo	negativo	—
285	M8	negativo	negativo	—
286	M9	negativo	negativo	—
287	M10	negativo	negativo	—
288	M11	negativo	negativo	—
289	M12	negativo	negativo	—
290	M13	negativo	negativo	—
291	M14	negativo	negativo	—
292	M15	negativo	negativo	—
293	M16	negativo	negativo	—
294	M17	negativo	negativo	—
295	M18	negativo	negativo	—
296	M19	negativo	negativo	—
297	M20	negativo	negativo	—
298	M21	negativo	negativo	—



299	M22	negativo	negativo	—
300	M23	negativo	negativo	—
301	M24	negativo	negativo	—
302	M25	negativo	negativo	—
303	M26	negativo	negativo	—
304	M27	negativo	negativo	—
305	M28	negativo	negativo	—
306	M29	negativo	negativo	—
307	M30	negativo	negativo	—
308	M31	negativo	negativo	—
309	M32	negativo	negativo	—
310	M33	negativo	negativo	—
311	M34	negativo	negativo	—
312	M35	negativo	negativo	—
313	N1	negativo	negativo	—
314	N2	negativo	negativo	—
315	N3	negativo	negativo	—
316	N4	negativo	negativo	—
317	N5	negativo	negativo	—
318	N6	negativo	negativo	—
319	N7	negativo	negativo	—
320	N8	negativo	negativo	—
321	N9	negativo	negativo	—
322	N10	negativo	negativo	—
323	N11	negativo	negativo	—
324	N12	negativo	negativo	—
325	N13	negativo	negativo	—
326	N14	negativo	negativo	—
327	N15	negativo	negativo	—
328	N16	negativo	negativo	—
329	N17	negativo	negativo	—
330	N18	negativo	negativo	—
331	N19	negativo	negativo	—
332	N20	negativo	negativo	—
333	N21	negativo	negativo	—
334	N22	negativo	negativo	—
335	N23	negativo	negativo	—
336	N24	negativo	negativo	—
337	N25	negativo	negativo	—
338	N26	negativo	negativo	—
339	N27	negativo	negativo	—



340	N28	negativo	negativo	—
341	N29	negativo	negativo	—
342	N30	negativo	negativo	—
343	ñ1	negativo	negativo	—
344	ñ2	negativo	negativo	—
345	ñ3	negativo	negativo	—
346	ñ4	negativo	negativo	—
347	ñ5	negativo	negativo	—
348	ñ6	negativo	negativo	—
349	ñ7	negativo	negativo	—
350	ñ8	negativo	negativo	—
351	ñ9	negativo	negativo	—
352	ñ10	negativo	negativo	—
353	ñ11	negativo	negativo	—
354	ñ12	negativo	negativo	—
355	ñ13	negativo	negativo	—
356	ñ14	negativo	negativo	—
357	ñ15	negativo	negativo	—
358	ñ16	negativo	negativo	—
359	ñ17	negativo	negativo	—
360	ñ18	negativo	negativo	—
361	ñ19	negativo	negativo	—
362	ñ20	negativo	negativo	—
363	ñ21	negativo	negativo	—
364	ñ22	negativo	negativo	—
365	ñ23	negativo	negativo	—
366	ñ24	negativo	negativo	—
367	ñ25	negativo	negativo	—
368	ñ26	negativo	negativo	—
369	ñ27	negativo	negativo	—
370	ñ28	negativo	negativo	—
371	ñ29	negativo	negativo	—
372	ñ30	negativo	negativo	—
373	O1	negativo	negativo	—
374	O2	negativo	negativo	—
375	O3	negativo	negativo	—
376	O4	negativo	negativo	—
377	O5	negativo	negativo	—
378	O6	negativo	negativo	—
379	O7	negativo	negativo	—
380	O8	negativo	negativo	—



381	O9	negativo	negativo	—
382	O10	positivo	positivo	<i>M.bovis</i>
383	O11	negativo	negativo	—
384	O12	negativo	negativo	—

Atentamente

Ing. Gustavo Echeverría PhD(c)
Encargado de Tuberculosis y Micobacterias
Instituto de Investigación en Zoonosis