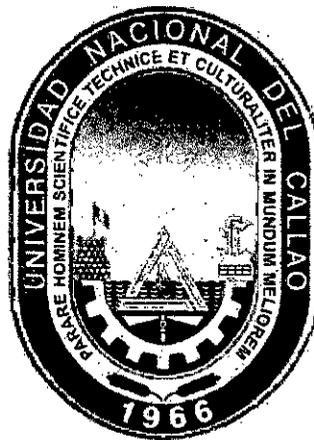


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA QUÍMICA



“GENODETECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* EN PULMONES Y UBRES DE VACAS MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PERCY BERNARDO SULCA MARTINEZ

Callao, 2018

PERÚ

HOJA DE REFERENCIA DEL JURADO

MIEMBROS DEL JURADO:

- Dr. ANCIETA DEXTRE CARLOS ALEJANDRO PRESIDENTE
- Dra. SANEZ FALCON LIDA CARMEN SECRETARIA
- Dr. CALDERON CRUZ JULIO CESAR MIEMBRO
- Dra. HERRERA SANCHEZ SONIA ELIZABETH MIEMBRO

- Dra. GUERRERO ALVA DANIZA MIRTHA ASESORA

N° de Libro : 01

N° de Folio : 011

N° de Acta : 009 -2018

Fecha de Aprobación de Tesis : 10 de agosto de 2018

Resolución de sustentación del Comité Directivo de la Unidad de Posgrado:

N° 037-2018-CD-UPG-FIQ-UNAC



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE POSGRADO

**LIBRO 1 FOLIO N° 011 ACTA N° 009 DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**

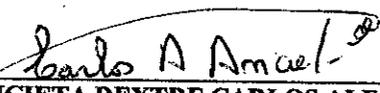
Siendo las 17:00 horas del día viernes 10 de agosto del dos mil dieciocho, en el Auditorio de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, se reunió el Jurado Examinador conformado por los siguientes docentes:

- | | |
|--|------------|
| • Dr. Ancieta Dextre Carlos Alejandro | PRESIDENTE |
| • Dra. Lida Carmen Sanz Falcón | SECRETARIO |
| • Dr. Julio César Calderon Cruz | MIEMBRO |
| • Dra. Sonia Elizabeth Herrera Sánchez | MIEMBRO |

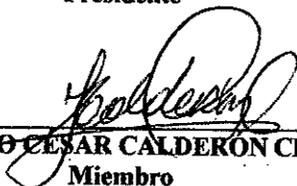
Con el fin de evaluar la sustentación de la Tesis del bachiller **SULCA MARTINEZ PERCY BERNARDO**, intitulada: **“GENODETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN PULMONES Y UBRES DE VACAS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”**. Con el quórum establecido según el Reglamento de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional del Callao aprobado por Resolución de Consejo Universitario N° 319-2017-CU, de fecha 21 de noviembre de 2017 y la Resolución del Comité Directivo de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao N° 027-2018-CD-UPG-FIQ-UNAC; luego de la Exposición del Sustentante, los Miembros del Jurado hicieron las respectivas preguntas, las mismas que fueron absueltas.

En consecuencia, este Jurado acordó *Aprobar* con la calificación cualitativa *Muy bueno* y la calificación cuantitativa *Distinto*, la Tesis para optar el **GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**, conforme el artículo 74°, inc, a) del reglamento mencionado, del bachiller el señor **SULCA MARTINEZ PERCY BERNARDO**, con lo que se dio por terminado el acto, siendo las *18:15* horas del mismo día.

Bellavista, 10 de agosto del 2018


Dr. ANCIETA DEXTRE CARLOS ALEJANDRO
Presidente


Dra. LIDA CARMEN SANZ FALCÓN
Secretario


Dr. JULIO CÉSAR CALDERÓN CRUZ
Miembro


Dra. SONIA ELIZABETH HERRERA SÁNCHEZ
Miembro


Dra. DANIZA MIRTHA GUERRERO ALVA
Asesora

DEDICATORIA

A mis padres Ana y Bernardo, por sus buenos ejemplos y cariño en cada momento de mi vida.

A mis hermanos "los gemelos" Franco y Hugo, por su comprensión y paciencia.

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme dar este nuevo e importante paso en la vida.

De manera muy especial a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en todos mis proyectos.

A la Dra. Ing. Dániza Mirtha Guerrero Alva, docente de la Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos, por su especial asesoría y dirección en la realización de la presente tesis.

A la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, en especial, a los docentes de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, por sus enseñanzas y experiencias compartidas.

Al M.V. Francisco Siña Herrera por su orientación y paciencia en la toma e inspección de muestras en el Camal Municipal N° 28 Imperial.

Al Sr. Saúl Rivas Sánchez administrador del Camal Municipal N° 28 Imperial por brindarnos las facilidades durante el periodo de estudio.

A la Dra. Blga. Ivonne Guerrero Alva, directora científica del laboratorio molecular Mamlab Center, por su interés científico y orientación en la parte de análisis de esta tesis.

A todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han contribuido al desarrollo de la presente tesis.

Muchas Gracias...

ÍNDICE

TABLAS DE CONTENIDO	4
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	10
1.1. Identificación del problema	10
1.2. Formulación del problema	13
1.2.1. Problema general	13
1.2.1. Problemas específicos	13
1.3. Objetivos de la investigación	13
1.3.1. Objetivo general	13
1.3.2. Objetivos específicos	13
1.4. Justificación	14
II. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Antecedentes de estudio	16
2.2. Marco teórico	18
2.2.1. Las vísceras	18
2.2.2. Pulmones	19
2.2.3. Ubre	21
2.2.4. La tuberculosis	22
2.2.5. <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	23
2.2.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25

2.2.7. <i>Mycobacterium bovis</i>	26
2.2.8. Alimentos de origen animal como vehículos de tuberculosis humana	27
2.2.9. Diagnóstico ante mortem de la tuberculosis en vacunos	30
2.2.10. Diagnóstico post mortem de la tuberculosis en vacunos	33
2.2.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2.2.12. Etapas de la PCR	39
2.3. Definiciones de términos	44
III. VARIABLES E HIPÓTESIS	50
3.1. Definición de las variables	50
3.1.1. Variable independiente	50
3.1.2. Variable dependiente	50
3.2. Operacionalización de las variables	50
3.3. Hipótesis	51
3.3.1. Hipótesis general	51
3.3.2. Hipótesis específicas	51
IV. METODOLOGÍA	52
4.1. Tipo de investigación	54
4.2. Diseño de investigación	54
4.2.1. Fase I : Inducción al estudio molecular	55
4.2.2. Fase II : Parte experimental	55
4.3. Población y muestra	57

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	58
4.4.1. Etapa 1: Pre - PCR	58
4.4.2. Etapa 2: Reacción en cadena de la polimerasa - PCR	60
4.4.3. Etapa 3: Post - PCR	61
4.5. Procedimientos de recolección de datos	62
4.6. Procesamiento estadístico y análisis de datos	63
V. RESULTADOS	64
5.1. Muestras analizada	64
5.2. Segmento de Inserción IS6110 detectado en las muestras analizadas	67
5.3. Detección del segmento de inserción IS6110 en pulmones	70
5.4. Detección del segmento de inserción IS 6110 en ubres	70
5.5. Incidencia del segmento de inserción IS6110 en pulmones y ubres	75
5.6. Resultados del análisis estadístico	77
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	79
6.1. Contrastación de hipótesis con los resultados	79
6.1.1. Contrastación con hipótesis general	79
6.1.2. Contrastación con hipótesis específicas	79
6.2. Contrastación de resultados con otros estudios similares	82
VII. CONCLUSIONES	86
VIII. RECOMENDACIONES	87
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	101

TABLAS DE CONTENIDOS

INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 2.1	: Cuadro vitamínico del pulmón.	20
Cuadro N° 2.2	: Composición nutricional del pulmón de vacuno.	20
Cuadro N° 2.3	: Composición nutricional de la ubre de vacuno.	22
Cuadro N° 2.4	: Taxonomía del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	24
Cuadro N° 5.1	: Características de las muestras analizadas.	65
Cuadro N° 5.2	: Características de la muestra de pulmón de toro.	66
Cuadro N° 5.3	: Resultados de la inspección post mortem de las muestras analizadas.	67
Cuadro N° 5.4	: Número total de muestras positivas.	69
Cuadro N° 5.5	: Muestras de pulmones positivas.	71
Cuadro N° 5.6	: Muestras de ubres positivas.	73
Cuadro N° 5.7	: Incidencia del segmento de inserción IS6110 en pulmones.	75
Cuadro N° 5.8	: Incidencia del segmento de inserción IS6110 en ubres.	76
Cuadro N° 5.9	: Cuadro de contingencia extendido.	78
Cuadro N° 6.1	: Resultados de aislamientos por tinción Ziehl Neelsen, cultivo, IS6110 PCR y Multiplex PCR.	85

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 2.1	: Bacilo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	26
Figura N° 2.2	: Pasos de un ciclo de PCR básico.	41
Figura N° 4.1	: Etapas de la parte experimental.	56
Figura N° 5.1	: Gel de electroforesis de los amplicones de las muestras de pulmones.	72
Figura N° 5.2	: Gel de electroforesis de los amplicones de las muestras de ubres.	74

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 5.1 : Frecuencia del segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el total de muestras analizadas.	68
Gráfico N° 5.2 : Incidencia del segmento de inserción IS6110 en muestras de pulmones y ubres.	77

INDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1	: Matriz de consistencia .	102
Anexo N° 2	: Cálculos de la prueba de Chi cuadrado (X^2).	103
Anexo N° 3	: Tabla de distribución de Chi cuadrado (X^2).	105
Anexo N° 4	: Entrada principal al camal Municipal N° 28 Imperial.	106
Anexo N° 5	: Área de descanso de los animales destinados al faenado .	107
Anexo N° 6	: Duchas de los animales destinados al faenado.	108
Anexo N° 7	: Área de sacrificio .	109
Anexo N° 8	: Parte de la infraestructura.	110
Anexo N° 9	: Área de limpieza de pieles.	111
Anexo N° 10	: Área de desechos.	112
Anexo N° 11	: Crematorio.	113
Anexo N° 12	: Pasadizo principal.	114
Anexo N° 13	: Área de inspección de vísceras.	115
Anexo N° 14	: Muestras de pulmones analizadas.	116
Anexo N° 15	: Muestras de ubres analizadas.	117
Anexo N° 16	: Muestra de pulmón de toro analizada.	118
Anexo N° 17	: Triturado y homogenizado de la muestra.	119
Anexo N° 18	: Extracción de ADN.	120
Anexo N° 19	: Almacenamiento de ADNs a -36°C	121
Anexo N° 20	: Reacción de amplificación en el termociclador	122
Anexo N° 21	: Separación del ADN por electroforesis	123
Anexo N° 22	: Visualización del gel en la cámara UV	124

RESUMEN

En la presente investigación se desarrolló la genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones y ubres de vacas, destinadas al consumo humano, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para lo cual se emplearon 12 muestras de vísceras, 6 muestras de pulmones y 6 muestras de ubres, provenientes de vacas beneficiadas en el camal municipal N° 28 Imperial, Cañete. También se analizó una muestra de pulmón de toro con diagnóstico clínico de TBC pulmonar, el cual fue empleado como control interno. Se optó por el método de PCR por las ventajas que ofrece respecto a otros métodos de análisis, en cuanto a confiabilidad y rapidez de obtención de resultados.

Del total de las muestras analizadas (pulmones y ubres de vacas), el 41,67 % fueron positivas; 33,33 % de las muestras de pulmones y 50 % de las muestras de ubres. En ninguno de los casos estudiados se detectó infección tuberculosa en ambas vísceras. Por otra parte, el análisis de X^2 demostró, con 99% de confiabilidad, que los resultados positivos y negativos de las muestras analizadas no dependieron del tipo de víscera.

ABSTRACT

This research was conducted using the Polymerase Chain Reaction to develop the genodetection of *Mycobacterium tuberculosis* in lungs and udders of cows, destined for human consumption. A total of 12 viscera samples, 6 lung samples and 6 samples of udders, were taken from cows benefited in Municipal Slaughterhouse N° 28 in Imperial Cañete. Additionally, a lung sample from tubercular bull was analyzed which was used as an internal control. The advantages of the PCR technique, over other analysis techniques, are reliability and rapidity to obtain the results.

Of all the analyzed samples (lungs and cow udders), 41,67% were positive; 33,33% of the lung samples and 50% of the udder samples of cows. In none of the studied cases was tuberculous infection detected in both viscera. Moreover, the X^2 analysis showed, with 99 % reliability, that the positive and negative results of the samples tested did not depend on the type of viscera.

I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Identificación del problema

La higiene de los alimentos comprende un conjunto de condiciones y medidas necesarias para garantizar la seguridad y salubridad de los productos alimentarios. La seguridad alimentaria, por su parte, se logra mediante el adecuado control de calidad de la materia prima durante su procesamiento hasta obtener un producto manufacturado óptimo, pero también es crucial lograr condiciones adecuadas de almacenamiento, transporte y manipulación del producto final (Delgado, R. y col. 2003).

Sin embargo, aún en nuestros días existen sectores en el país donde las condiciones de crianza y técnicas de faenamiento del vacuno para la obtención de carnes y vísceras son muy precarias debido a la falta de infraestructura, tecnología y cultura sanitaria y alimenticia, predominando técnicas y procesos que generan condiciones favorables para el desarrollo y proliferación de bacterias causantes de enfermedades tanto en manipuladores y consumidores de estos productos de origen animal.

Una de estas enfermedades es la tuberculosis que en el año 2014 afectó a 9.6 millones de personas y fue responsable de la muerte de 1.5 millones de personas a nivel mundial. En el Perú la tuberculosis es una importante causa de morbilidad en el grupo de jóvenes y adultos, se reportan casos en todos los departamentos del país, pero la enfermedad se concentra principalmente en los departamentos de la costa central y la selva (MINSA, 2016).

La tuberculosis en el ser humano se debe generalmente al *Mycobacterium tuberculosis*, pero también puede ser efecto de otras micobacterias como el *Mycobacterium bovis*, la segunda causa más común de tuberculosis en las personas (Ellner, JJ. y col. 1993).

Las bacterias que forman parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* pueden causar tuberculosis en diferentes especies (Good, M. y col. 2011). Varios de los patógenos de éste grupo predominan en los seres humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*) o infectan roedores (*M. microti*), mientras que otros tienen un amplio rango de hospederos (*M. bovis*, *M. caprae*) (Brosch, R. y col. 2002).

La micobacteria se puede transmitir a través del contacto directo con animales infectados con *Mycobacterium*, indirectamente a través de los alimentos procedentes de los animales infectados, contaminación cruzada en las tareas de faenamiento en el camal y frigoríficos, por contaminación ambiental o de superficies con *Mycobacterium*, a través de personas que pueden ser portadoras de la bacteria de forma que al manipular los alimentos, sin tener en cuenta las buenas prácticas de manufactura, contaminan los alimentos durante el manejo de las vísceras en la inspección post mortem. (ELIKA, 2014).

Particularmente este problema se presenta en el Camal Municipal N° 28 Imperial en la provincia de Cañete donde de acuerdo a la información recopilada, existen deficiencias relacionadas con la higiene en las operaciones de faenamiento las cuales pueden generar problemas en la salud tanto en los trabajadores del camal así como en la de los consumidores de los productos que allí se obtienen, principalmente de las vísceras, debido a la presencia y proliferación del *Mycobacterium tuberculosis*.

Por otro lado, la detección y enumeración de microorganismos en alimentos o en superficies que tienen contacto con alimentos constituyen una parte importante de cualquier esquema de control de calidad. Debido a esto es necesario implementar técnicas de detección para efectuar la vigilancia y el control de dichos microorganismos y prevenir las enfermedades que éstos producen.

El establecimiento de medidas de control apropiadas requiere de métodos confiables de diferenciación entre bacterias patógenas y no patógenas, así como bacterias ubicuas presentes en el suelo, agua y el tracto gastrointestinal (Coetsier, C. y col. 2000), lo cual implica que deben ser rápidos y sensibles pero sobre todo altamente específicos.

Tradicionalmente, en el diagnóstico microbiológico, para la detección de micobacterias, se emplean medios de cultivos a partir de huevo. El órgano o alimento con lesiones atraviesa un proceso de aislamiento micobacterial para obtener el sobre nadante el cual es inoculado en el medio de cultivo. Éste es incubado a 37 °C por 10 semanas y revisado cada 2 semanas para observar el crecimiento micobacterial. (Little, T. 1982).

Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología molecular permiten utilizar la información genética de los microorganismos como herramientas de identificación y cuantificación de aquellos de interés para el hombre. Uno de estos métodos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rojas, R. y col. 2006).

Por lo expuesto anteriormente, la presente investigación se sustenta en la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa como técnica molecular, que aplicada en la industria de alimentos, ofrece ventajas en la identificación del *Mycobacterium tuberculosis* presentes en pulmones y ubres de vacas.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

1. ¿De qué manera la genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones y ubres de vacas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una llamada de atención para la salud de los manipuladores y consumidores?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Se podrá encontrar *Mycobacterium tuberculosis* a nivel de pulmón, víscera de mucho consumo tradicional?
2. ¿Esta bacteria podrá estar presente en las ubres de las vacas que se comercializan?
3. ¿Cuál será la incidencia del segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de pulmones y ubres de vacas?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

1. Desarrollar la genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones y ubres de vacas, destinadas a consumo humano, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.3.2. Objetivos específicos

1. Detectar el segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pulmones de vacas, a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

2. Detectar el segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de ubres de vacas, a través de la reacción en cadena de la polimerasa.
3. Determinar la incidencia del segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de pulmones y ubres de vacas.

1.4. Justificación

Debido a sus propiedades nutricionales y bajo costo de adquisición las vísceras conforman una parte importante en la dieta alimentaria de las personas. Por lo que garantizar la inocuidad y salubridad de estos productos de origen animal es imprescindible para salvaguardar la salud de millones de personas. Esta acción, implica que todas las actividades relacionadas con la crianza y faenado del vacuno deben ser realizadas tomando en cuenta las medidas de bioseguridad, las cuales están relacionadas con la higiene y el estado de salud tanto del personal como de los animales.

La necesidad de contar con métodos cada vez más rápidos y efectivos en la detección e identificación de bacterias patógenas presentes en alimentos nos permite optar por técnicas alternativas que ofrezcan confiabilidad y rapidez en la obtención de resultados. En el desarrollo de la presente investigación se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa, técnica caracterizada por su altísima sensibilidad en la identificación de bacterias como el *Mycobacterium tuberculosis*, así como por la rapidez en la obtención de resultados.

La presente investigación tiene como premisa dar a conocer la importancia del uso de las medidas de bioseguridad y las buenas prácticas de faenado de los vacunos destinados a consumo humano, especialmente en la obtención de pulmones y ubres como vísceras de alto consumo por parte

de la población, con la finalidad de evitar el rebrote de enfermedades como la tuberculosis. Del mismo modo, reconocer la importancia de las buenas prácticas agropecuarias (BPA) y las buenas prácticas de ordeño (BPO) en la crianza de estos animales.

Por otro lado proponer el uso de la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa, en la industria de alimentos, para que se convierta en un método alternativo de identificación de bacterias nocivas como las micobacterias presentes en alimentos de origen animal como los pulmones y las ubres, de consumo humano tradicional en nuestro país , frente a otras técnicas de identificación basadas en el cultivo y las caracterización fenotípica de las bacterias las cuales resultan laboriosas y en la mayoría de ocasiones se requieren de varias semanas para obtenerse los resultados.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

A continuación se presentan los estudios que guardan relación directa o indirecta con el objeto de estudio de esta investigación.

Echeverría, G., 2011 confirmó, en su estudio sobre la prevalencia de la tuberculosis bovina (TBB) mediante la aplicación de Nested-PCR en bovinos faenados en los Camales de los Cantones Cayambe-Pichincha y Pelileo-Tungurahua, Ecuador , que la técnica molecular Nested- PCR tenía una sensibilidad del 89,7% y especificidad del 97,6% mostrando ser una prueba muy eficiente para la detección de *M. bovis*, la cual identificó casos positivos en muestras de pulmón de animales que tuvieron resultados negativos en ganglio linfático, también confirmó la importancia de la ruta respiratoria en la transmisión de la enfermedad. Del mismo modo el uso de la PCR permitió calcular la presencia de tuberculosis bovina (TBB) en el 4,32 % de muestras de pulmón y ganglios linfáticos provenientes de bovinos.

Sin embargo, **Guardiola, J., 2009** concluyó, en su investigación sobre detección de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de pulmón y nódulos linfáticos bronquiales provenientes de animales sospechosos a tuberculosis bovina mediante PCR que, no fue posible lograr la amplificación del ADN de *Mycobacterium bovis*. Para la extracción de ADN el autor empleó el Kit comercial DNAzol (Invitrogen, Inglaterra) y la digestión mediante proteinasa K, usando Duodecil Sulfato de Sodio (SDS 10%) y Buffer de lisis celular. Obteniendo mayor cantidad mediante el segundo método. Sin embargo en ninguno de los dos métodos de extracción de ADN logró la amplificación del ADN seleccionado en su estudio. Finalmente el autor indicó que algo en la técnica de amplificación falló, quizás el ADN obtenido pertenecía a otras

células cercanas al tejido pulmonar y nódulo linfático el cual intervino en la lectura del ADN que necesitaba.

Al respecto, investigadores como **Zanini, M. y col., 2001** en la identificación del *M. bovis* en biopsias bovinas mediante la PCR y la genotipificación en aislamientos procedente del Brasil mediante Spolygotyping, indicaron que la PCR fue aplicada con éxito en la detección de grupos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, la amplificación de secuencias específicas de ADN por técnicas de PCR proporcionaron un diagnóstico rápido de muchas enfermedades y especialmente en la detección directa del *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos de bovinos. También indicaron que el éxito de la PCR dependía de la ausencia de contaminantes en el ADN los cuales pueden alterar el proceso de la amplificación para un aislamiento libre del ADN y que la aplicación de tiosianato y α -caseína para hacer más eficiente la técnica, por la presencia de impurezas interfiere con la PCR obstaculizando la adopción universal de esta técnica. Lo cual concuerda con **Wilson, I., 1997** quien concluyó en la inhibición y facilitado de la amplificación de ácidos nucleicos, que la contaminación y otros factores externos pueden causar la inhibición en algunos puntos de la interacción molecular. La forma en que actúan no es del todo comprendido, pero podría ser una interferencia química o física con disponibilidad o actividad de los componentes esenciales. La contaminación puede ser endógena (muestra, enzima, tubos, manipulación), o exógena (bacterias, polvo) a los componentes de la reacción en donde se encuentran células bacterianas, DNA no blancos y contaminantes y los mismos componentes del laboratorio para la realización de la técnica.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Las vísceras

Estos órganos se encuentran ocupando las diversas cavidades en el cuerpo del animal. La mayor parte de las vísceras se encuentran situadas en la cavidad pectoral, en la cavidad abdominal y en la cavidad pélvica. En general, las vísceras, aportan proteínas en cantidades similares a las carnes pero superan la cantidad de hierro en comparación con las carnes (Quito, M. 1977).

Se clasifican en vísceras rojas: corazón, hígado, bazo, pulmones, riñones, lengua y vísceras blancas: intestinos, estómagos de los animales y eventualmente los genitales de los machos y las ubres de las hembras (MINAG- OEEE, 2012).

En la actualidad es necesario saber valorar los alimentos, no solo por su importancia económica sino también por su contenido alimenticio. El público no suele aprovechar los despojos por diferir estos de la carne ordinaria, sin embargo, desde el punto de vista de una nutrición equilibrada, los despojos o vísceras son alimentos de primerísimo orden (Sanz, C. 1980).

Las vísceras aportan a la dieta una alta cantidad de purinas (componentes del ADN y ARN de todas las células, su metabolismo en el cuerpo forma ácido úrico), las purinas deben evitarse en pacientes con ácido úrico elevado sobre todo en pacientes con gota. Las vísceras con mayor contenido de purinas son el hígado, riñón y páncreas, esto se debe a que están conformadas por un número mayor de células (Quito, M. 1977).

2.2.2. Pulmones

Los pulmones derecho e izquierdo ocupan casi toda la cavidad torácica. El pulmón derecho es mayor que el izquierdo y ambos están divididos en un cierto número de lóbulos. El pulmón es blando, esponjoso y sumamente elástico. Crepita cuando se comprime entre los dedos y flota en el agua. Los pulmones de bovino presentan las siguientes características (Wilson A., 1970):

- El pulmón izquierdo tiene tres lóbulos y el derecho cuatro o cinco.
- Las lobulaciones pulmonares son bien marcadas.
- Pesan de 2,5 a 3,175 kg.

Las vísceras que más valor nutritivo tienen son: el hígado, pulmón, bazo, corazón y riñones. El resto de las vísceras son de valor nutritivo intermedio, a excepción de los intestinos y estómago que son de las de menos valor nutritivo. Muchos de los órganos son buenos depósitos de vitaminas ricos en enzimas y que difieren en su composición de acuerdo con su papel biológico. Así vemos que los pulmones tienen un tejido más rico en agua que los demás órganos (Quito, M. 1977).

Desde la década de los 40 se han realizado investigaciones bastante detalladas acerca del contenido de las carnes, así como de las vísceras, en vitaminas (Véase cuadros N° 2.1 y 2.2 en la página 20).

Cuadro N° 2.1

CONTENIDO VITAMÍNICO DEL PULMÓN

Viscera: Pulmón	B₁ mg/100 g	B₂ mg/100 g	B₆ mg/100 g	Nicotinamida mg/100 g	Ac. ascórbico mg/100 g	A UI/100 g
Vacuno	0,11	0,36	0,8	3,9	---	---
Cerdo	0,09	0,27	---	3,4	---	---
Cordero	0,11	0,47	---	4,7	---	---

Fuente: Astiasarán, I. y col. 2000.

Cuadro N° 2.2

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE PULMÓN DE VACUNO

Composición por 100 g de porción comestible						
Energía Kcal	Proteína g	Grasa g	Carbohidrato g	Calcio mg	Fósforo mg	Hierro mg
83	17,2	1,1	---	6	203	6,5

Fuente: Revista Peruana de Cardiología 2000.

2.2.3. Ubre

La ubre es el órgano encargado de elaborar y acumular el producto final: la leche. La capacidad productiva del animal y la calidad del producto dependen, en gran medida, del funcionamiento y constitución de este órgano (Open Course Ware).

La ubre de la vaca lechera consta de cuatro glándulas mamarias (cuarterones). Cada uno de estos cuatro complejos glandulares es completamente independiente, con su propia estructura secretora y se comunica con el exterior a través de su propio pezón (Open Course Ware).

Los cuatro cuarterones están, a pesar de su independencia funcional, íntimamente ligados y reunidos bajo la piel de la ubre y situados en la región inguinal, contra la pared abdominal y la cara ventral del suelo de la pelvis, de la que se encuentra separada por una gruesa almohadilla de grasa. La ubre se encuentra suspendida de dichas estructuras por un sistema suspensor (Open Course Ware).

En cuanto a su valor nutricional, la ubre, aporta en su mayoría proteína y grasa de alta calidad. Además posee fósforo necesario para la buena salud de los huesos (Véase cuadro N° 2.3 en la página 22). En ciudades como Pichincha - Ecuador emplean la ubres en la preparación de la tradicional salsa de maní, la cual contiene nutrientes adicionales como calcio, ácidos grasos esenciales, magnesio, fosforo y potasio. Con salsa criolla, tendrá carbohidratos, vitamina C y fibra (Ministerio de cultura y patrimonio, Ecuador).

Cuadro N° 2.3

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA UBRE DE VACUNO

Composición por 100 g de porción comestible						
Energía	Proteína	Grasa	Carbohidrato	Calcio	Fósforo	Hierro
Kcal	g	g	g	mg	mg	mg
229	14,1	19,2	---	69	112	2,9

Fuente: Revista Peruana de Cardiología 2000.

2.2.4. La tuberculosis (TB)

Está producida por bacterias del género *Mycobacterium* y pueden afectar tanto a seres humanos como a animales (domésticos o salvajes). Esta enfermedad puede transmitirse entre los seres humanos y entre los animales, puede hacerlo también de animales a hombres o de hombres a animales, es decir, es una zoonosis. Esta enfermedad infecciosa normalmente evoluciona de forma crónica y se acompaña de procesos inflamatorios específicos (Martín, P. y col.1998).

La tuberculosis se caracteriza por la formación de lesiones macroscópicas conocidas como tubérculos, es crónica y debilitante, pero en ocasiones puede ser aguda y de rápido desarrollo, con infecciones tempranas que pueden ser asintomáticas (Ashford, D. y col.2006).

Cualquier tejido del cuerpo puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos de la zona torácica pulmones, intestinos, hígado, bazo y peritoneo (Whipple, D. y col. 1996).

En el 2014 se estimó, a nivel mundial, que alrededor de 9.6 millones de personas enfermaron de TB y 1.5 millones murieron a causa de esta enfermedad. Además, se estimó también que 480 mil personas desarrollaron tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) y 190 mil murieron a causa de esta (OMS, 2015).

2.2.5. *Mycobacterium tuberculosis complex (MTC)*

Las bacterias que componen el MTC se encuentran dentro del género *Mycobacterium*, que es el único dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales* (Palomino, J.C. y col 2007).

Todas las bacterias del MTC pueden causar tuberculosis en diferentes especies (Good, M. y col. 2011). Varios de los patógenos de este grupo predominan en los seres humanos (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*) o infectan roedores (*M. microti*), mientras que otros tienen un amplio rango de hospederos (*M. bovis*, *M. caprae*) (Prodinger, W. y col. 2005) (Véase cuadro N° 2.4 en la página 24).

A pesar de estas especies relativamente específicas en cuanto a sus hospedadores, pueden producir estados de infección o enfermedad en hospedadores que a priori no les corresponderían. Lo que significa que el *M. bovis* puede afectar a humanos, al igual que algunos animales pueden padecerlo con *M. tuberculosis*. Sin embargo, el hecho de que sean relativamente específicas de hospedador hace que su poder para producir la enfermedad en los hospedadores distintos de los primarios sea mucho menor, necesitando otros factores (inmunodepresión o altas dosis infectivas) para crear un estado infectivo que pueda derivarse en enfermedad (Martín, P. y col.1998). Estas micobacterias son de crecimiento lento y difíciles de diferenciar por métodos bacteriológicos convencionales (Arráiz, N. y col. 2006).

Cuadro N° 2.4

TAXONOMÍA DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

Reino	Bacteria	
Filum	Actinobacteria	
Clase	Actinobacteria	
Subclase	Actinobacteridae	
Orden	Actinomycetales	
Suborden	Corynebacterineae	
Familia	Mycobacteriaceae	
Género	Mycobacterium	
Especie	<i>M. africanum</i>	TB en humanos en África.
	<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. tuberculosis</i> .
	<i>M. microti</i>	TB en roedores pequeños.
	<i>M. pinnipedii</i>	TB en focas.
	<i>M. caprae</i>	TB en cabras.
	<i>M. tuberculosis</i> Complex	

Fuente: Echevarría, G. 2011

2.2.6. *Mycobacterium tuberculosis*

Es una especie bacteriana que pertenece a la familia Mycobacteriaceae y al género *Mycobacterium*; es un bacilo ligeramente curvo o recto (Prescott, L. y col. 1999) intracelular obligado, aerobio, inmóvil (Ramírez, R. y col. 2002) con dimensiones de 1 μm a 4 μm x 0,3 μm x 0,6 μm (Véase figura N° 2.1 en la página 26) (Brennan, P. y col. 1995) Con carencia de actividad catalasa, capacidad de acumular niacina y reducir los nitratos a nitritos (Koneman, E. y col. 1997).

Su pared celular es muy rica en lípidos (Prescott, L. y col. 1999) lo cual determina sus características propias como: hidrofobia, que es la tendencia que muestran las células a adherirse unas con otras durante su crecimiento en medios acuosos, y por ello a flotar en la superficie; resistencia a la acción de ácidos y álcalis; tiempo de generación, y resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos fijadores de complemento (Lugo de la Fuente, 1996).

La bacteria *Mycobacterium tuberculosis* obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa y glicerol). El aumento de la presión de CO_2 estimula su crecimiento, y crece en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio (Lugo de la Fuente, 1996). Forma colonias no pigmentadas, rugosas de color gamuza, después de 14 días a 28 días de incubación en medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook. Su crecimiento se propicia en una atmósfera de 5% a 10% de dióxido de carbono, pero sigue siendo lento, con un tiempo medio de generación de 12 horas a 24 horas (Champoux, J. y col. 1990). También es resistente a la desecación, insensible a los detergentes catiónicos, pero no resiste el calor ni la radiación ultravioleta (Lugo de la Fuente, 1996).

Figura N° 2.1

BACILO DE *Mycobacterium tuberculosis*



Fuente: Atlas de dermatología.

2.2.7. *Mycobacterium bovis*

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

Debido a que es normalmente un patógeno de ganado vacuno, las infecciones en seres humanos son el resultado de la ingestión de leche o productos lácteos no pasteurizados (Harris, N. y col. 2007), en este caso no suele infectar a los pulmones, sino que produce lesiones principalmente en la médula ósea de la cadera, rodillas, vértebras, y ganglios linfáticos cervicales (Volk, W. y col. 1996). Pero existen otras rutas de infección como la vía aerógena ganado-humano y humano-humano (LoBue, P. y col. 2010). El *M. bovis* también fue el progenitor

de la cepa de *M. bovis* bacilo de Calmette- Guérin vacuna, la vacuna más ampliamente utilizada en humanos (BCG) (Martin, C. y col. 2007).

2.2.8. Alimentos de origen animal como vehículo de tuberculosis humana

a) Panorama general

Las enfermedades transmitidas mediante los alimentos (ETA) afectan la salud de las personas en forma importante. Miles de millones de personas enferman y muchas mueren como resultado de la ingesta de alimentos no inocuos. Debido a la profunda preocupación que esto ha generado, la Organización Mundial de Salud (OMS), en la Quincuagésima Tercera Asamblea Mundial de Salud, adoptó una resolución invitando a sus estados miembros a reconocer la inocuidad de los alimentos como una función esencial de la salud pública. La Asamblea Mundial también convocó a la OMS a desarrollar una estrategia global para reducir el impacto de las ETA (OMS, 2000).

La inocuidad de los alimentos comprende todas las condiciones y medidas que son necesarias durante la producción, el procesamiento, el almacenamiento, la distribución y la preparación de alimentos para garantizar que son seguros, saludables y aptos para consumo humano (Hubbert, W. y col. 1996).

En los países desarrollados, un tercio de las poblaciones humanas se ven afectadas por las ETA cada año, y es probable que el problema afecte a más personas en los países en desarrollo (OMS, 2000).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC en sus siglas inglesas), estima que cada año en Estados Unidos de América (EUA), 76 millones de personas son afectadas por las ETA, 300 mil son hospitalizadas y 5 mil mueren (CDC, 2004). En América Latina y el Caribe durante el período comprendido entre 1993 y 2002, se

registraron 6.476 brotes de ETA que provocaron 231.890 casos y 318 muertes (Asociación Latinoamericana y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2006).

La frecuencia de los brotes y sus consecuencias para la salud pública y para el comercio mundial de alimentos, tienen como consecuencia la revisión de las políticas de protección de alimentos en los países desarrollados y en vías de desarrollo, así como de las medidas para la prevención y control de las ETA (OMS, 2000)

Algunas ETAs, si bien se conocen, se consideran re-emergentes porque están ocurriendo con mayor frecuencia, y ocasionan brotes en varios países. Esto evidencia la fragilidad de los programas de prevención y control (OMS, 2000; OPS/OMS, 2000).

Entre las enfermedades zoonóticas re-emergentes presentes en el continente americano, son de gran importancia las enfermedades de notificación obligatoria a la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), de especial interés la tuberculosis bovina (Terán, M. y col. 2005), debido a que esta enfermedad se considera de importancia socioeconómica, en salud pública y para el comercio de animales y productos de origen animal (FSIS, 2005).

b) Bacilos Peligrosos

Las bacterias del género *Mycobacterium*, a diferencia de otras bacterias patógenas, poseen una gran capacidad para resistir en el ambiente, debido a sus resistentes paredes celulares. Pueden sobrevivir a desinfectantes químicos, ácidos, alcalinos, detergentes e incluso crean resistencia ante algunos antibióticos.

M. tuberculosis y *M. bovis* son los principales agentes causantes de la tuberculosis en humanos, siendo *M. bovis* el principal agente zoonótico

de origen alimentario que se transmite de los animales a las personas. Esta bacteria puede sobrevivir durante meses en condiciones extremas de frío, calor y humedad, hasta 332 días en una temperatura óptima entre 12°C y 14 °C. (ELIKA-Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentarias).

c) Vías de transmisión

La bacteria *Mycobacterium* se puede transmitir a las personas por varias vías (EFSA, 2014):

1.- En origen en las explotaciones ganaderas por inadecuada gestión sanitaria:

- A través del contacto directo con animales infectados con *Mycobacterium*.
- Indirectamente a través de los alimentos procedentes de los animales infectados.
- Medio Ambiente: El suelo, el agua y el aire pueden estar contaminados con bacterias *Mycobacterium* procedentes de animales infectados.

2.- En procesos por falta de higiene e inadecuada manipulación de los alimentos:

- Contaminación cruzada en el matadero y en las fases posteriores de transformación de los alimentos, por contaminación ambiental o superficies de *Mycobacterium*.
- Personas: Las personas manipuladoras de alimentos pueden ser portadoras de *Mycobacterium*, de forma que al manipular los

alimentos, sin tener en cuenta las buenas prácticas de higiene, contaminan los alimentos.

2.2.9. Diagnóstico ante mortem de la tuberculosis en vacunos

En los animales vivos el diagnóstico directo suele resultar infructuoso pues en la mayoría de los casos la tuberculosis cursa con lesiones granulomatosas encapsuladas no abiertas al exterior; únicamente cuando la evolución es más grave, en fase de generalización de la infección, o si predominan las lesiones exudativas y los órganos afectados tienen conexión directa con el exterior (pulmón, intestino, riñón), resulta factible detectar las micobacterias en sus secreciones respiratorias, heces y orina (Guardiola, J. 2009).

a) Pruebas de dermoreacción:

- Prueba tuberculínica ano-caudal

El diagnóstico de la tuberculosis bovina se basa en la prueba intradérmica de la tuberculina (PPD) y permite descubrir el 96% y el 98% de los animales infectados (Blaha, T. 1995). Esta prueba ha sido la base de todos los esquemas de erradicación de la tuberculosis que incluyen la detección y el posterior sacrificio de los animales infectados (Tizard, I. 2002). Existen varias maneras de realizar la prueba de la tuberculina en el ganado bovino, siendo la más simple la prueba intradérmica única (PIU). En esta prueba se inyecta 0,1 mL de PPD bovina de un miligramo por mililitro en el pliegue caudal y se examina el sitio de inyección 72 horas más tarde. Una reacción positiva consiste en una tumefacción difusa, caliente e indurada en el sitio de la inyección, la cual es fácil de identificar (Tizard, I. 2002).

Los resultados se consideran: Positivo: 5mm o mayor, Sospechoso: 3 mm y más o menos de 5 mm, Negativo: menos de 3 mm. Hay que tener en cuenta que todo animal sospechoso en un establecimiento donde se hayan detectado animales reaccionantes positivos en pruebas anteriores o en la que se está realizando se le debe considerar positivo (Guardiola, J. 2009).

- Prueba tuberculínica cervical simple

Esta prueba se empleará para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis*; o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis* (NOM-031-ZOO-1995). En esta prueba el lugar de inoculación es el tercio medio del cuello. Esta zona se debe depilar con maquina o tijera a 5 cm. de diámetro aproximadamente. Se mide con un calibre el espesor de la piel previamente y se inyectan 0,1 mL de tuberculina PPD bovina de un miligramo por mililitro. La lectura se hace mediante un calibre a las 72 horas. Cuando la lectura se ve impedida por razones climáticas u otras causas, esta puede hacerse hasta 24 horas más tarde. Si la lectura se realiza más tarde de esto la prueba no tiene validez por lo que el diagnostico no será confiable y debe repetirse la prueba a los 60 días (Guardiola, J. 2009). Los resultados se consideran: Positivo: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación, 3 mm o mayor (NOM-031-ZOO-1995), Negativo: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación. Menos de 3 mm (NOM-031-ZOO-1995).

- Prueba Tuberculínica doble comparativa

Se aplican tanto PPD bovino como PPD aviar, midiendo previamente el grosor de la piel con un vernier o cutímetro antes y después de la aplicación en dos diferentes puntos. La finalidad de esta prueba es diferenciar la reacción inflamatoria con *M. bovis* y *M. avium*. Este tipo de sensibilización puede ser atribuido a la gran reactividad antigénica cruzada existente entre las especies de micobacterias y otros géneros afines (Cano C. y col. 2007).

Esta prueba consiste en la inyección de tuberculina bovina y tuberculina aviar en diferentes puntos del cuello la inoculación se realizará en el tercio medio superior del cuello, por lo que previo a la inoculación deberá rasurarse dos áreas de alrededor de 1 cm² y se aplicará 0,1 mL de PPD aviar y 1 cm por debajo 0,1 mL de PPD bovino, la distancia entre las dos inyecciones debe ser de aproximadamente 12 cm a 15 cm. La segunda lectura se realizará a las 72 horas y la interpretación se realizará restando la lectura final a la inicial. (Guardiola, J. 2009).

En todas las inyecciones se realiza introduciendo la aguja oblicuamente en las capas profundas de la piel e inyectando la dosis de tuberculina.

Después se comprueba que la inyección ha sido bien realizada detectándose al tacto una pequeña inflamación en el lugar de la misma (Guardiola, J. 2009).

Las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña son:

- PPD bovino: elaborado con *Mycobacterium bovis* cepa AN5, que se utilizará en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple.

- PPD aviar: elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, que será utilizada en la prueba cervical comparativa. La tuberculina de PPD aviar debe contener como colorante el rojo de Ponceau, para distinguirla de la de PPD bovino que no lleva colorante.
- Las tuberculinas deben ser transportadas y conservadas en frío a una temperatura de 4°C a 8°C y protegidas de la luz solar directa durante el trabajo de campo, debe verificarse el lote y fecha de caducidad del producto. Una vez utilizado el antígeno, deberá desecharse el resto del contenido del envase si no se va a utilizar el mismo día (NOM-031-ZOO-1995). El instrumental necesario para la realización de la tuberculinización se ajustará a las siguientes especificaciones:
 - Se utilizarán jeringas graduadas de 1 mL con graduación de 0,1 mL, de preferencia desechables o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado.
 - Las agujas serán hipodérmicas, calibre 24 a 26 de 0,5 cm a 1 cm de largo, de preferencia desechables o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado.
 - Para la prueba cervical comparativa se usará un cutímetro metálico de plástico como el vernier o pie de rey, graduado en milímetros (mm) (NOM-031-ZOO- 1995).

2.2.10. Diagnóstico post mortem de la tuberculosis en vacunos

a) Diagnóstico bacteriológico

- Examen directo

Mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de nueva fucsina para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con

el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo (NOM-031-ZOO-1995). Puede utilizarse la microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante.

- Examen indirecto

Cultivo, aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petraghani, ATS y Lowenstein Jensen (NOM-031-ZOO-1995).

- Forma de envío de muestras para el aislamiento bacteriológico

Es necesario sumergir los tejidos en solución saturada de borato de sodio, si se trata de nódulos aparentemente afectados se deberán enviar completos sin grasa; si se trata de otro tejido, se deberá seleccionar la posible lesión y enviar muestras no mayores de 2 cm por lado. El tiempo máximo en que debe permanecer el tejido en la solución de borato de sodio es de 10 semanas, si el tiempo es mayor la muestra se deshidrata (NOM- 031-ZOO-95).

b) Diagnóstico histopatológico

Se realiza en muestras de aproximadamente 2 cm por lado con lesiones sugestivas a tuberculosis fijadas con formol al 10% amortiguado con fosfatos en una relación de 1:10, es decir una parte de tejido por nueve partes de formol. Se realiza la técnica de rutina de inclusión en parafina, y las tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE), Ziehl Neelsen (ZN).

Por medio del análisis histopatológico, las preparaciones de tejidos, teñidos con HE y con ZN, se observan al microscopio, se

interpretan y se describen de acuerdo a los hallazgos. Histológicamente la tuberculosis se aprecia en forma clásica con una necrosis central mineralizada, fibroplasia periférica o difusa e infiltración de macrófagos, células epitelioides o células gigantes tipo Langhans (NOM-031-ZOO-96).

El principal problema del diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina no está en la interpretación de las lesiones, sean estas sugestivas o compatibles con la infección sino en la identificación del agente causal (Delgado, G. 1999).

M. tuberculosis actualmente depende de la tinción ácido alcohol resistente (Guardiola, J. 2009).

- **Forma de envío de muestras para estudio histopatológico**

Las muestras con lesiones sugestivas a tuberculosis deberán fijarse con formol amortiguado al 10 %, el tamaño de las mismas deberá ser de aproximadamente de 2 cm por lado y en una proporción de una parte de tejido y nueve de formol (NOM-031-ZOO-95).

c) Diagnóstico microbiológico

Las micobacterias son bacilos aerobios, inmóviles y no formadores de esporas, con un alto contenido de lípidos de alto peso molecular en su pared. El *M. bovis* crece más lentamente que *M. tuberculosis*, es microaerófilo y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. La morfología colonial de *M. bovis* es disgónica y no cromógena (Prat, C. y col. 2007).

Se trabajan tejidos no mayores de 2 cm por lado, con lesiones sugestivas a tuberculosis sumergidos en una solución saturada de borato de sodio en un tiempo no mayor de 10 semanas. Se

examinan frotis directo del material sospechoso y se tiñen con Ziehl Neelsen. Puede utilizarse la microscopía de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina-acridina o auramina-fenol (DOF, 1996).

El examen indirecto consiste en cultivo, aislamiento e identificación de material sospechoso en medios especiales (DOF, 1996).

La detección al microscopio del bacilo alcohol ácido resistente teñido por ZN es rápida pero no tan sensitiva se necesitan por lo menos 10⁴ bacterias (Zanden, A. y col. 1998).

Tradicionalmente, los medios de cultivos a partir de huevo han sido usados para el aislamiento primario de micobacterias. El diagnóstico de una infección por micobacterias depende principalmente de la detección y recuperación de los bacilos alcohol ácido resistentes (Zanden, A. y col. 1998).

El cultivo constituye el diagnóstico en casos de formas incipientes de tuberculosis y de tuberculosis extra pulmonar (genitourinaria, pericárdica, osteoarticular, gastrointestinal, peritoneal). Actualmente se conocen diferentes medios de cultivo, como Herrolds con o sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragani, ATS y Lowenstein Jensen (DOF, 1996), que permiten el aislamiento y recuperación de las micobacterias. Estos medios pueden ser líquidos o sólidos, no selectivos y selectivos; estos últimos pueden contener uno o más agentes antimicrobianos, que permiten inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de hongos (Hernández, C. y col. 2002).

El procedimiento consiste en tomar de pulmón u otro órgano con lesiones para el aislamiento micobacterial colocando 10 g de tejido macerado en 5 mL de solución estéril homogenizada, luego se agrega un volumen igual de hidróxido de sodio (NaOH) al 2% y luego se deja 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra se diluye 10 veces en fosfato salino bufferado (pH 7,3) y se centrifuga a 3 000 rpm por 30 minutos. Este procedimiento se repite dos veces con agua destilada y al final el sobre nadante se inocula en el medio de cultivo sólido (Little, T. 1982).

El medio de cultivo es incubado a 37 °C por 10 semanas y revisado cada 2 semanas para observar el crecimiento micobacterial. Las muestras de pulmón y nódulos linfáticos con presencia de crecimiento para diferenciar son teñidos con tinción Gram y PAS (ácido periódico de schiff) (Little, T. 1982).

2.2.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas in vitro, pequeñas cantidades de ADN.

En 1983, Kary Mullis dio a conocer la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de biología molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de ADN (Jaques, M. y col. 1996).

La PCR , consiste en la separación por calor de las dos cadenas del ADN que se quiere amplificar a partir de un punto marcado por dos segmentos pequeños de ADN conocidos como cebadores (primers o

iniciadores), que están constituidos entre 10 nucleótidos y 30 nucleótidos e indican el inicio y el final del fragmento a duplicar (Ramírez, R. 2003).

Mediante la acción de una enzima denominada ADN polimerasa, se van agregando en forma complementaria los nucleótidos necesarios para obtener una réplica exacta de la cadena original. Este procedimiento se repite varias veces y se obtienen múltiples copias del fragmento de ADN escogido (Ramírez, R. 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN que puede ser detectada tras electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse entre 24 horas y 48 horas (Altamirano, M. y col. 1992) y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y resultados negativos en la tinción de Ziehl- Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en pacientes con cuadros atípicos asociados con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o a la inmunosupresión por trasplante (Toledo, P. y col 1999).

La amplificación de secuencias específicas de ADN micobacteriano mediante PCR ha sido utilizada en cultivo y directamente en muestras biológicas (Acha, P. y col. 2003).

La PCR ha sido aplicada con éxito en la detección de grupos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), la amplificación de secuencias específicas de ADN por técnicas de PCR proporcionan un diagnóstico rápido de muchas enfermedades y especialmente en la detección directa de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos bovinos

(Grulia, M. y col. 1998). Cabe mencionar que otros estudios, demostraron la existencia de cepas de *M. bovis* sin la secuencia IS6110 en bovinos beneficiados en un matadero de la Región Metropolitana de Chile por lo que podría indicarse que el IS6110 está presente en porcentajes variables en las cepas del *M. bovis* (Retamal, P. y col. 2003).

El éxito de la PCR depende de la ausencia de contaminantes en ADN que puede alterar el proceso de la amplificación para un aislamiento libre del ADN. Se aplica tiosianato diatomáceo de silicio para hacer más eficiente la técnica, pues la presencia de impurezas interfiere con la PCR obstaculizando la adopción universal de esta técnica, en estudios recientes se muestra la adición de α -caseína que puede corregir el problema. La PCR se ha adoptado para identificar el complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de nódulos linfáticos con lesiones macroscópicas sospechosas desde animales sacrificados y comparándose con las técnicas de cultivo (Grulia, M. y col. 1998).

2.2.12. Etapas de la PCR

La PCR es una prueba *in vitro* para la amplificación específica del ADN. Los componentes son: ADN molde que se desea amplificar, Taq ADN polimerasa, nucleótidos para la síntesis del nuevo ADN, primers o cebadores de secuencia específica (complementarias a la región que se desea amplificar) y una reacción buffer. (Mehrotra, M., R. y col. 2000).

El proceso de la PCR se realiza en el aparato denominado termociclador, que permite la programación de ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento de forma controlada (Cubero, N., 2009)

Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo

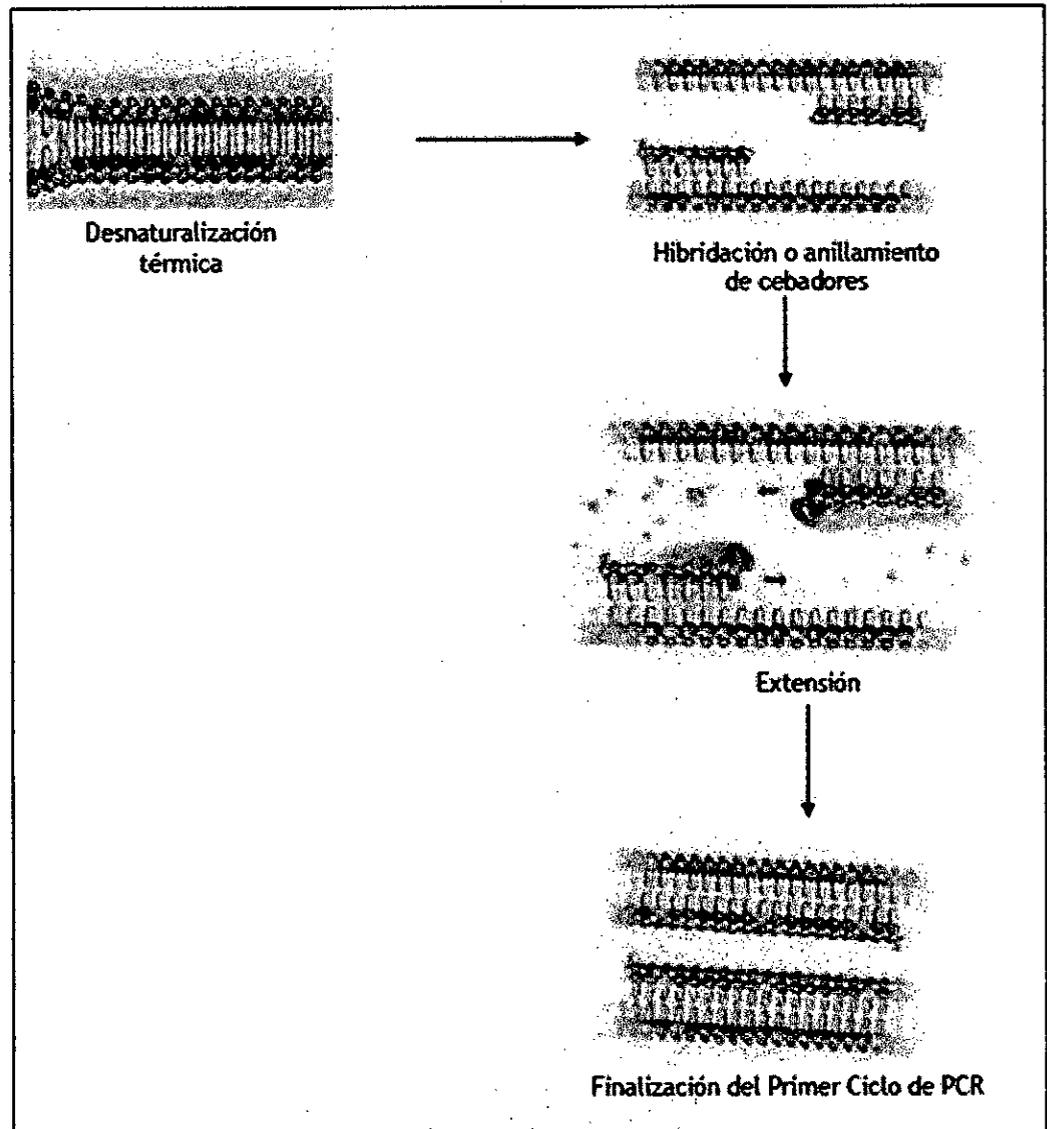
la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, para favorecer una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcancen rápidamente las temperaturas programadas (Woods, G., 2002)

Los protocolos básicos de la PCR constan de los siguientes pasos fundamentales (Mehrotra, M., R. y col. 2000):

1. Desnaturalización térmica del ADN que se va a usar como molde.
2. A una temperatura menor que la de desnaturalización, anillamiento de cebadores sintéticos cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
3. Extensión por parte de la ADN polimerasa de los oligonucleótidos anillados que actúan como cebadores.
4. Este proceso de tres pasos es entonces repetido un número determinado de veces (25-35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto.

FIGURA N° 2.2

PASOS DE UN CICLO DE PCR BÁSICO



Fuente: Adaptación de Roche, Sistemas de Diagnóstico, 2008

En el procedimiento básico del PCR, la muestra de ADN se mezcla con una alícuota de polimerasa Taq y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con un gran exceso de dos fragmentos sintéticos cortos de ADN (oligonucleótidos) que son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que va a amplificarse. Los oligonucleótidos o *primers* sirven como cebadores a los que se agregan los nucleótidos durante los pasos siguientes de replicación. Luego la mezcla se calienta a unos 93°C, que es lo bastante caliente para hacer que las moléculas de ADN de la muestra se separen en sus dos cadenas componentes. A continuación la mezcla se enfría a unos 60°C para permitir que los cebadores se unan a las cadenas de ADN blanco y la temperatura se eleva a 72° C para que la polimerasa termofílica agregue nucleótidos al extremo 3' de los cebadores (ICMSF, 2000). De esta manera, la reacción permite obtener una gran sensibilidad al detectar muy baja cantidad de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores.

La técnica de la PCR presenta ventajas sobre las técnicas convencionales de diagnóstico debido a que tiene una mayor sensibilidad y especificidad, presenta un menor número de falsos positivos y negativos, Además emplea un tiempo mucho menor para obtener los resultados (Frothingham, R. y col. 1994).

Por otra parte, la contaminación es un importante problema en el diagnóstico para la PCR; típicamente la PCR produce millones a billones de copias de un segmento de ADN por amplificación. Los productos de la PCR son una fuente de futuras reacciones a partir del ADN blanco. Ello puede ser transferido accidentalmente a una nueva muestra o contaminar los reactivos de la PCR. Los productos de la PCR son totalmente estables en el laboratorio resisten el medio ambiente, enjuague e incluso la autoclave. Una vez contaminados los

productos de la reacción es difícil de eliminar el problema (Frothingham, R. y col. 1994).

A pesar de que una amplia gama de inhibidores se han reportado, la identidad y modos de acción de muchos de ellos permanecen sin conocerse. Estos efectos pueden tener implicaciones importantes en las investigaciones de salud pública y en lo clínico, especialmente si las muestras involucran alimentos o muestreos ambientales. Los inhibidores comunes incluyen varios componentes de los fluidos corporales y reactivos encontrados en las ciencias clínicas y forenses (hemoglobina, urea y heparina), constituyentes de alimentos, (compuestos orgánicos y fenólicos, glucógenos, grasas y Ca^{2+}), y compuestos ambientales (compuestos fenólicos, ácidos húmicos y metales pesados). Otros inhibidores de una amplia distribución incluyen constituyentes de las células bacteriales, ADN no blancos y contaminantes componentes en el laboratorio como por ejemplo polen, polvo de los guantes, utensilios de plástico y celulosa del laboratorio (Wilson, I. 1997).

Por definición la PCR es una reacción en cadena de la polimerasa los productos de un ciclo de amplificación sirve como molde para el próximo, generando un aumento del producto exponencial y no lineal (Köller, T. y col. 1995). La ecuación que rige este aumento es:

$$N=N_0 \times 2^n$$

N = número de moléculas amplificadas

N_0 = número inicial de moléculas

n = número de ciclos de amplificación

2.3. Definiciones de términos

- a) **ACGT:** Es el acrónimo para los cuatro tipos de bases nitrogenadas que se encuentran en la molécula del ADN: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Una molécula de ADN está formada por dos hebras enrolladas una con la otra, formando una doble hélice. Las dos hebras se mantienen unidas por las interacciones que se forman entre las bases nitrogenadas. La adenina forma un puente o interacción con la timina de la otra hebra, y la citosina con la guanina. La secuencia de bases en una porción de la molécula de ADN se denomina gen y contiene las instrucciones necesarias para construir una proteína.
- b) **Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula de ADN consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchando a cada azúcar hay una de las siguientes cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases; la adenina se enlaza con la timina, y la citosina con la guanina. La secuencia de estas bases a lo largo de la cadena es lo que codifica las instrucciones para formar proteínas y moléculas de ARN.
- c) **Adenina:** Es una de las cuatro bases nitrogenadas que se encuentran en el ADN, juntamente con las otras tres bases: la citosina (C), la guanina (G) y la timina (T). En la molécula del ADN, las bases adenina que se encuentran en una hebra interaccionan con las bases timina de la hebra opuesta, formando así la doble hélice del ADN. La secuencia de las cuatro bases del ADN proporciona las instrucciones genéticas de la célula. Una forma de la adenina llamada 'adenosina trifosfato' (ATP)

sirve como molécula de reserva energética, y proporciona energía para que puedan tener lugar muchas reacciones químicas dentro de la célula.

- d) **Ácido ribonucleico (ARN):** Es una molécula similar a la de ADN. A diferencia del ADN, el ARN es de cadena sencilla. Una hebra de ARN tiene un eje constituido por un azúcar (ribosa) y grupos de fosfato de forma alterna. Unidos a cada azúcar se encuentra una de las cuatro bases adenina (A), uracilo (U), citosina (C) o guanina (G). Hay diferentes tipos de ARN en la célula: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt). Más recientemente, se han encontrado algunos ARN de pequeño tamaño que están involucrados en la regulación de la expresión génica.
- e) **Ácido ribonucleico mensajero (ARNm):** Es una molécula de ARN de cadena simple, complementaria a una de las cadenas de ADN de un gen. El ARNm es una versión del ARN del gen que sale del núcleo celular y se mueve al citoplasma donde se fabrican las proteínas. Durante la síntesis de proteínas, un orgánulo llamado ribosoma se mueve a lo largo del ARNm, lee su secuencia de bases, y utiliza el código genético de traducir cada triplete de tres bases o codón, en su aminoácido correspondiente.
- f) **Ácido ribonucleico de transferencia (ARNt):** Es una pequeña molécula de ARN que participa en la síntesis de proteínas. Cada molécula de ARNt tiene dos áreas importantes: una región de tri-nucleótidos denominada anti codón y una región donde se une un aminoácido específico. Durante la traducción, cada vez que un aminoácido se añade a la cadena en crecimiento, se forma una molécula de ARNt cuyos pares de bases tienen una secuencia complementaria con la molécula del ARN mensajero (ARNm), asegurando que el aminoácido adecuado sea insertado en la proteína.

- g) Amplificación génica:** Es un incremento en el número de copias de una secuencia génica. Las células cancerosas a veces producen múltiples copias de genes en respuesta a las señales de otras células o de su entorno. El término también puede referirse a la reacción en cadena de polimerasa (PCR), una técnica de laboratorio que los científicos utilizan para amplificar secuencias de genes en un tubo de ensayo.
- h) Aminoácidos:** Son un conjunto de 20 tipos distintos de moléculas y constituyen las piezas básicas para construir proteínas. Las proteínas constan de una o más cadenas de aminoácidos; estas cadenas se llaman polipéptidos. La secuencia de la cadena de aminoácidos determinará cómo se pliega tridimensionalmente el polipéptido, pues la forma que adquiera es muy importante para que sea biológicamente activo. De forma general, la secuencia de aminoácidos que forma una proteína está codificada en un gen.
- i) Citosina:** Es una de las cuatro bases del ADN, siendo las otras tres la adenina (A), guanina (G) y timina (T). Dentro de la molécula de ADN, las bases de citosina se encuentran localizadas en una cadena formando enlaces químicos con las bases de guanina de la cadena opuesta. La secuencia de las cuatro bases del ADN es lo que codifica las instrucciones genéticas de la célula.
- j) Código genético:** Son las instrucciones que le dicen a la célula cómo hacer una proteína específica. A, T, C y G, son las "letras" del código del ADN; representan los compuestos químicos adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G), respectivamente, que constituyen las bases de nucleótidos del ADN. El código para cada gen combina los cuatro compuestos químicos de diferentes maneras para formar "palabras" de tres letras las cuales especifican qué aminoácidos se necesitan en cada paso de la síntesis de una proteína.

- k) Doble hélice:** Es la descripción de la estructura de una molécula de ADN. Una molécula de ADN consiste en dos cadenas que serpentean una alrededor de la otra como una escalera de caracol. Cada cadena tiene una espina dorsal en la cual se alternan un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato. A cada azúcar se une una de las cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases nitrogenadas, adenina formando enlaces con la timina, y citosina con la guanina.
- l) Gen:** Es la unidad física básica de la herencia. Los genes se transmiten de los padres a la descendencia y contienen la información necesaria para precisar sus rasgos. Los genes están dispuestos, uno tras otro, en estructuras llamadas cromosomas. Un cromosoma contiene una única molécula larga de ADN, sólo una parte de la cual corresponde a un gen individual. Los seres humanos tienen aproximadamente 20.000 genes organizados en sus cromosomas.
- II) Guanina (G):** Es una de las cuatro bases químicas del ADN, siendo las otras tres la adenina (A), la citosina (C), y la timina (T). Dentro de la molécula de ADN, las bases de guanina localizadas en una hebra forman puentes químicos con la citosina de la hebra opuesta. Las instrucciones genéticas de la célula están codificadas por la secuencia compuesta por las cuatro bases.
- m) Iniciador o cebador:** Es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada. También se les conoce como oligonucleótidos.
- n) Nucleótido:** Es la pieza básica de los ácidos nucleicos. El ARN y el ADN son polímeros formados por largas cadenas de nucleótidos. Un nucleótido está formado por una molécula de azúcar (ribosa en el ARN

o desoxirribosa en el ADN) unido a un grupo fosfato y una base nitrogenada. Las bases utilizadas en el ADN son la adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). En el ARN, la base uracilo (U) ocupa el lugar de la timina.

- ñ) **Par de bases:** Un par de bases es un par de bases químicas que interaccionan entre ellas. Podemos imaginar que la doble hélice de ADN es como una escalera de mano, donde los pasamanos son las dos hebras enrolladas entre sí. La unión entre los pares de bases corresponde al peldaño de la escalera. Cada hebra está formada por la alternancia de un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato. En cada azúcar, hay anclada una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T). Las dos hebras se mantienen juntas gracias a los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias, es decir, la adenina con la timina, y la citosina con la guanina.
- o) **Proteínas:** Son una clase importante de moléculas que se encuentran en todas las células vivas. Una proteína se compone de una o más cadenas largas de aminoácidos, cuya secuencia corresponde a la secuencia de ADN del gen que la codifica. Las proteínas desempeñan gran variedad de funciones en la célula, incluidas estructurales (citoesqueleto), mecánicas (músculo), bioquímicas (enzimas), y de señalización celular (hormonas). Las proteínas son también parte esencial de la dieta.
- p) **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con esta

técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas.

- q) **Replicación de ADN:** Mecanismo que permite al ADN duplicarse, es decir, sintetizar una copia idéntica. De esta manera de una molécula de ADN única, se obtienen dos o más "réplicas" de la primera. Esta duplicación del material genético se produce de acuerdo con un mecanismo semiconservador, lo que indica que los dos polímeros complementarios del ADN original, al separarse, sirven de molde cada uno para la síntesis de una nueva cadena complementaria de la cadena molde, de forma que cada nueva doble hélice contiene una de las cadenas del ADN original. Gracias a la complementación entre las bases que forman la secuencia de cada una de las cadenas, el ADN tiene la importante propiedad de reproducirse idénticamente, lo que permite que la información genética se transmita de una célula madre a las células hijas y es la base de la herencia del material genético.

- r) **Timina (T):** Es una de las cuatro bases químicas del ADN, los otros tres son adenina (A), citosina (C) y guanina (G). Dentro de la molécula de ADN, las bases de timina se encuentran en una línea que forma enlaces químicos con las bases de adenina en la cadena opuesta. La secuencia de cuatro bases del ADN codifica las instrucciones genéticas de la célula.

- s) **Uracilo (U):** Es una de las cuatro bases químicas que forman parte del ARN. Las otras tres bases son la adenina (A), citosina (C) y guanina (G). En el ADN, la base timina (T) se encuentra en lugar del uracilo.

III. VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1. Definición de las variables

3.1.1. Variable Independiente

Segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.2. Variable Dependiente

Calidad sanitaria de las muestras de tejidos de pulmones y ubres de vacas.

3.2. Operacionalización de las variables

Variables	Dimensiones	Indicadores	Métodos
V. Independiente: Segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Detección del segmento de inserción de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de 412 pb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Positivo: Cuando el amplicón mostró un producto de amplificación equivalente al número de pares de bases (pb) del control positivo de referencia. Negativo: Cuando el amplicón no mostró un producto de amplificación equivalente al número de pares de bases (pb) del control positivo de referencia.	Se determinó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa
V. Dependiente: Calidad sanitaria de las muestras de tejidos de pulmones y ubres de vacas	Según Reglamento Sanitario del Faenado de Animales de Abasto	Ausencia de alteraciones que constituyan riesgo para la salud pública o animal	

3.3. Hipótesis

3.3.1. Hipótesis general

1. La genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones y ubres de vacas, destinadas a consumo humano, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), establece la importancia de tomar las medidas de bioseguridad correspondientes.

3.3.2. Hipótesis específicas

1. La detección del segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pulmones de vacas evidencia la contaminación de esta víscera por vía aérea, considerada la forma más directa de infección.
2. La detección del segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de ubres de vacas evidencia un origen endógeno de la contaminación, debida a los gérmenes que contiene la sangre.
3. La incidencia del segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de pulmones y ubres de vacas es elevada.

IV. METODOLOGÍA

A. Lugar de ejecución

La presente investigación se llevó a cabo con la colaboración de las siguientes instituciones y empresas:

A.1 Las muestras estudiadas fueron obtenidas del Camal Municipal N° 28 Imperial, ubicado en Prolongación Jirón Augusto B. Leguía Distrito de Imperial, Provincia de Cañete.

A.2 Los análisis de genodetección se realizaron en los ambientes del laboratorio de estudios moleculares MAMLAB CENTER, ubicado en Calle Monte Grande N° 109, Laboratorio 207 en el Distrito de Surco, Lima. El laboratorio cuenta con la siguiente dirección electrónica www.mamlab.com, donde se evidencia entre otras descripciones, los siguientes documentos legales de funcionamiento:

- Licencia de funcionamiento emitida por la Municipalidad de Santiago de Surco N° 0011732-2011 Expediente N° 1193722011
- Registro Nacional de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo (RENAES) código único N° 00012945
- Categoría DISA: Servicio Médico de Apoyo - Patología Clínica-Biología Molecular N° 480-2014-DESP-DISAII-D.S.
- Registro Nacional de Proveedores (RNP) código N° S0884837
- Registro en la Superintendencia Nacional de Aduanas y de Administración tributaria (SUNAT) con RUC 2052344727.

B. Materiales y equipos

B1. Material de laboratorio

- Pipetas automáticas de volúmenes ajustables
- Placas Petri descartables

- Bisturí
- Tubos de microcentrifugas de 1,5 mL
- Tubos para PCR de 0,2 mL
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitación de distintos volúmenes
- Probetas graduadas
- Guantes
- Cooler para transporte de muestras
- Mascarillas
- lentes protectores
- Guardapolvo

B2. Reactivos

- Buffer PBS pH 7,0
- Buffer TNE pH 8,0
- Proteinasa K al 20%
- Fenol pH 7,5 - 8,0
- Mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
- Acetato de sodio 3M pH6,0
- Dodecil sulfato sódico al 10%
- Etanol absoluto
- Agua destilada estéril grado molecular
- Taq ADN polimerasa
- Marcadores de peso molecular de ADN - Ladder de 412 pb

B3. Equipos

- Cámara de flujo laminar Illumi - EE.UU.
- Cámara de electroforesis Fisher - EE.UU.
- Termociclador Applied Biosystems Americano.

- Transiluminador UVP.
- Baño María Clínicas Perú.
- Centrifuga Celma Brasil.
- Ultracongeladora Ferrobras Brasil.
- Horno esterilizador Imaco.

4.1. Tipo de investigación

A continuación se describen los tipos de investigación que se realizaron en el presente trabajo de tesis:

Por su naturaleza y la manipulación de la variable, el presente estudio es una investigación experimental, porque se manipuló una variable independiente ejerciendo control y aplicando la metodología de reacción en cadena de la polimerasa cualitativa de altísima sensibilidad.

Por la naturaleza de los objetivos planteados es un estudio de tipo exploratorio, ya que es un problema muy poco investigado en nuestro medio desde el punto de vista alimentario, a pesar de la alta incidencia de tuberculosis en la población.

Por el tema es una investigación aplicada, ya que el estudio analizó un problema práctico, generando aportes al conocimiento de manejo tecnológico y de vigilancia sanitaria. A su vez tiene también investigación de campo ya que el fenómeno se estudió en el lugar que se produce de manera constante.

4.2. Diseño de investigación

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en 2 fases:

4.2.1. Fase 1: Inducción al estudio molecular

Esta fase tuvo como finalidad:

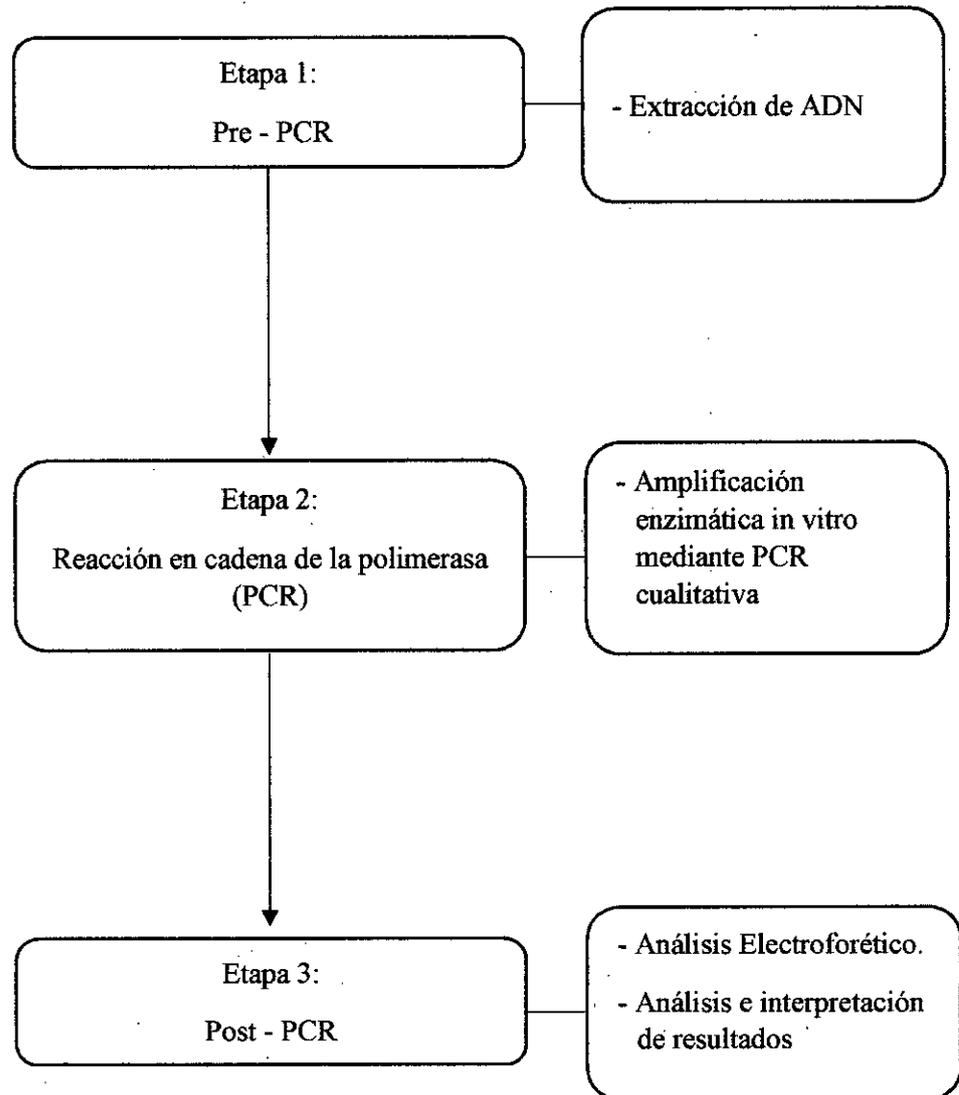
- El reconocimiento de las áreas de trabajo en el laboratorio.
- La determinación de las medidas de bioseguridad pertinentes a un nivel de riesgo correspondiente al material biológico que se manipuló.
- La determinación de las condiciones del transporte de los tejidos analizados, desde el punto de recolección hasta su traslado al laboratorio.
- Estandarización de los protocolos moleculares de cada fase de la investigación.

4.2.2. Fase 2: Parte experimental.

Se realizó de acuerdo a los protocolos de investigación del laboratorio molecular MAMLAB CENTER y estuvo conformada por 3 etapas (Véase figura N° 4.1 en la página 63). Los tejidos estudiados fueron obtenidos del Camal Municipal N° 28 Imperial, ubicado en la provincia de Cañete.

Figura N° 4.1

ETAPAS DE LA PARTE EXPERIMENTAL



Fuente: Laboratorio MAMLAB CENTER, 2005

4.3. Población y muestra

a) Población

La población estuvo conformada por todas las vísceras que se obtuvieron luego del beneficio de vacas en el Camal Municipal N° 28 Imperial - Cañete, principalmente pulmones y ubres, durante la tercera y cuarta semana del mes de noviembre del 2017.

Los animales que fueron sacrificados durante el periodo de estudio provenían de pequeños criadores, establos lecheros y centros de engorde ubicados en la provincia de Cañete.

b) Muestra

El material biológico estudiado estuvo conformado por 12 muestras, provenientes de vacas beneficiadas en el Camal Municipal N°28 Imperial durante la tercera y cuarta semana del mes de noviembre del 2017, de las cuales seis fueron muestras de pulmones y las otras seis fueron muestras de ubres del mismo animal beneficiado.

También se consideró un estudio piloto en el que se utilizó una muestra de pulmón de toro con diagnóstico clínico de TBC pulmonar, establecido por el médico veterinario, el cual fue empleado como control positivo durante la investigación.

Cada muestra fue manipulada con guantes y trasladada al laboratorio dentro de las medidas de bioseguridad en recipientes estériles y refrigerados los cuales estuvieron herméticamente cerrados hasta el inicio del estudio molecular. La cantidad de muestra fue de aproximadamente 100 gramos por víscera, tomándose el tejido previa evaluación visual de la víscera en su conjunto.

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se realizaron de acuerdo al protocolo de investigación establecido por el laboratorio molecular MAMLAB CENTER.

4.4.1. Etapa 1: Pre- PCR

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se tomaron como base los métodos sugeridos por Sambrook y col. (1989) para tejidos, estandarizando previamente el procedimiento en un estudio piloto en pulmón tuberculoso de toro y un control comercial positivo. Las muestras tisulares investigadas en vacas (pulmones y ubres) fueron sometidas al siguiente procedimiento estandarizado:

- La muestra se mantuvo en refrigeración hasta el momento de iniciar el proceso.
- En una placa Petri descartable se colocó un fragmento de la muestra (0,5 cm aproximadamente) y con la ayuda de una aguja descartable y un bisturí se cortó muy finamente la muestra.
- La muestra preparada se colocó en un tubo, previamente rotulado, de 1,5 mL y se cubrió con solución bufferado de fosfato (PBS).
- Se centrifugó a 3 200 rpm durante 12 minutos y se decantó el sobrenadante.
- Luego se resuspendió el botón biológico en 200 μ L de TNE pH 8,0.
- Se adicionó 20 μ L de SDS al 10 % y 10 μ L de Pk al 20%.
- Se incubó en baño María a 65 °C entre 60 minutos y 90 minutos.

- Luego se adicionó 200 μL de fenol pH entre 7,5 y 8,0 y se agitó durante 5 minutos.
- Seguidamente se adicionó 200 μL de una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 minutos.
- Se centrifugó a 3 200 rpm durante 12 minutos.
- Se tomó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transvasó a otro tubo de 1,5 mL rotulado.
- Seguidamente se adicionó 200 μL de una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 minutos.
- Se centrifugó a 3 200 rpm durante 12 minutos.
- Se tomó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transvasó a otro tubo de 1,5 mL rotulado.
- Seguidamente se adicionó 200 μL de una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 minutos.
- Se centrifugó a 3 200 rpm durante 12 minutos.
- Se tomó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transvasó a otro tubo de 1,5 mL rotulado.
- Luego se adicionó 60 μL de acetato de sodio 3M pH 6,0 y 600 μL de etanol absoluto helado.
- Seguidamente se precipitó a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas.
- Se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 minutos.
- Se descartó el sobrenadante sin tocar el botón de ADN.
- Se liofilizó el botón por 10 minutos a 15 minutos.

- Se resuspendió el botón de ADN en agua destilada estéril grado molecular (300 µL aproximadamente).
- Se almacenó el ADN a -36°C hasta la PCR.

4.4.2. Etapa 2: Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

Amplificación enzimática in vitro mediante PCR cualitativa

Para investigar el segmento de inserción IS6110 del genoma *Mycobacterium tuberculosis* se procedió con la amplificación enzimática in vitro mediante PCR cualitativa.

- La amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en 25 µL de mezcla de reacción compuesta por 20 µL de solución Master Mix (Buffer PCR 10X, MgCl₂, dNTP, primer sentido, primer antisentido), 2,4 µL de agua deionizada grado molecular, 0,1 µL de Taq polimerasa y 2,5 µL del ADN en estudio. Los primers usados fueron:

Primer sentido 5' GTGCGGATGGTCGCAGAGAT

Primer antisentido 3' CTCGATGCCCTCACGGTTCA

Los primers utilizados estuvieron alineados sobre la base de datos M29899 (5' → 3')

- El ADN objetivo para la amplificación fue un fragmento de 412 pb del IS6110 utilizado para identificar *Mycobacterium tuberculosis*.
- Luego la mezcla se sometió a un evento de 30 ciclos de amplificación, constituido por: desnaturalización del ADN a 94°C durante un minuto, hibridación de los cebadores a 60 °C por un minuto, y extensión de cebadores a 72°C por un minuto en un Termociclador Applied Biosystems.

- Se emplearon controles de amplificación positivo, negativo y blanco de referencia.
- Los amplicones fueron conservados a -20 °C hasta ser analizados.

4.4.3. Etapa 3: Post - PCR

Análisis Electroforético

- Se preparó una solución de agarosa al 2% en amortiguador TBE 1X y se calentó la mezcla en el microondas hasta lograr su total disolución (4 minutos aproximadamente).
- A continuación se vertió la solución en el porta geles que sirvió como molde para la formación del gel y se colocó un peine para la formación de los pocillos donde se colocaron las mezclas de siembra.
- Durante la solidificación del gel se preparó las mezclas de siembra: 2 µL de Loading Buffer y 6 µL de ADN (amplicón).
- Luego de solidificado el gel se retiró el peine y se introdujo en la cubeta de la cámara electroforética.
- Dentro de la cubeta el gel quedó cubierto por tampón TBE 1X.
- Luego cada mezcla de siembra se colocó en los pocillos formados en el gel y se estableció la corriente en la cámara electroforética empleando un voltaje de 100 voltios durante 30 minutos.
- Se utilizó agua deionizada grado molecular para el control negativo (C-) y blanco.
- Se utilizó dos controles positivos: un control comercial positivo (empleado en la fase de estandarización de protocolos) y un

control positivo proveniente de una muestra de un toro con diagnóstico clínico de TBC pulmonar del Camal Municipal N° 28 Imperial (empleado durante la investigación de los casos).

Análisis e interpretación de resultados

- Se tiñó el gel con Bromuro de etidio (5 µg /mL de TBE buffer).
- Luego de 20 minutos de tinción , se iluminó el gel con el transiluminador UV y fue fotografiado por la cámara digital
- Por comparación con el patrón se conoció el tamaño de fragmentos de la muestra.
- Se consideró un resultado positivo cuando el amplicón evidenció un producto de amplificación expresado en pares de bases (pb) equivalente a los pb del control positivo de referencia.
- Se consideró un resultado negativo cuando el amplicón no evidenció banda de amplificación equivalente al número de pares de bases del control positivo de referencia.
- En cada corrido electroforético se corrió un marcador de peso molecular de 412 pb.

4.5. Procedimientos de recolección de datos

Para la recopilación de los datos sobre los hechos abordados como objetivo de la investigación se consideró lo siguiente:

- a) Tabla de resultados para el análisis de las muestras de pulmones de vacas, que incluyó los códigos de cada una, procedencia y resultado positivo y/o negativo.

- b) Tabla de resultados para el análisis de las muestras de ubres de vacas, que incluyó los códigos de cada una, procedencia y resultado positivo y/o negativo.
- c) Tabla de incidencia del gen IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* en los pulmones y ubres de las vacas estudiadas.

4.6. Procesamiento estadístico y análisis de datos

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba de Chi cuadrado (X^2), con un nivel de confiabilidad del 99%.

V. RESULTADOS

5.1. Muestras analizadas

Se estudió 12 muestras, provenientes de vacas beneficiadas en el Camal Municipal N° 28, Imperial, de las cuales 6 fueron muestras de pulmones y las otras 6 fueron muestras de ubres del mismo animal beneficiado. Las muestras provenían de vacas de raza Holstein y raza Criolla, las edades estuvieron comprendidas entre los 2 años y 6 años de edad (Véase el cuadro N° 5.1 en la página 65).

Durante el desarrollo de la investigación se tuvo la oportunidad de tomar una muestra de pulmón de toro de 2 años de edad, raza Criolla, con diagnóstico clínico de TBC pulmonar avanzada, establecido por el médico veterinario. Esta muestra fue utilizada como control positivo en el proceso de análisis (Véase el cuadro N° 5.2 en la página 66)

En la inspección post mortem de los pulmones, 2 de las muestras fueron consideradas sospechosas de contener *Mycobacterium tuberculosis* por presentar tumoraciones pequeñas y zonas congestionadas. Además una de ellas (193604-P) presentó principios de neumonía. En el caso de las ubres, se aseguró que las muestras tomadas pertenecieran al mismo animal beneficiado, esto debido a que la inspección post mortem de las ubres es una operación no realizada en el camal. (Véase el cuadro N° 5.3 en la página 67). También se pudo observar otras enfermedades y anomalías en vísceras que no correspondían al presente estudio. Fueron los casos de las vacas con los códigos 193600-P y 193600-U (Fasciola Hepática), 193605-P y 193605-U (tumoraciones en el hígado).

Cuadro N° 5.1

CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Código de muestra	Procedencia del vacuno	Edad (años)	Especie	Raza
193600-P	Agroindustrias San Isidro SA. Distrito: Imperial	5	Vaca	Holstein
193600-U				
193601-P	Ganadería San Simón SAC. Distrito: Quilmaná	6	Vaca	Holstein
193601-U				
193602-P	Establo Virgen de la Candelaria. CCPP Casa Pintada Distrito: Imperial	3	Vaca	Holstein
193602-U				
193603-P	Criador pequeño e independiente CCPP Herbay Alto. Distrito: San Vicente	5	Vaca	Holstein
193603-U				
193604-P	Criador pequeño e independiente Anexo Miraflores. Distrito: Quilmaná	2	Vaca	Criolla
193604-U				
193605-P	Criador pequeño e independiente. CCPP Playa Hermosa Distrito: San Vicente	4	Vaca	Criolla
193605-U				

Fuente: Resultados del trabajo de campo previo a la etapa experimental.

P: muestra de pulmón U: muestra de ubre

Cuadro 5.2

CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA DE PULMON DE TORO

Muestra - Control Positivo				
Código de muestra	Procedencia del vacuno	Edad (años)	Especie	Raza
193600-T	Centro de Engorde Peves. Distrito: Cerro Azul	2	Toro	Criolla

Fuente: Resultados del trabajo de campo previo a la etapa experimental.

T: muestra de pulmón de toro

Cuadro 5.3

RESULTADOS DE LA INSPECCIÓN POST MORTEM DE LAS
MUESTRAS ANALIZADAS

Código de muestra	Inspección Post mortem	Destino de las vísceras
193600-P	Sano	Expendio y Consumo
193601-P	Sano	Expendio y Consumo
193602-P	Probable TBC pulmonar	Incinerado
193603-P	Sano	Expendio y Consumo
193604-P	Principios de un proceso neumónico y posible presencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Parte del pulmón incinerado
193605-P	Sano	Expendio y Consumo
193600-U	No se realizó	Expendio y Consumo
193601-U		
193602-U		
193603-U		
193604-U		
193605-U		

Fuente: Resultados del trabajo de campo previo a la etapa experimental.

P: muestra de pulmón U: muestra de ubre

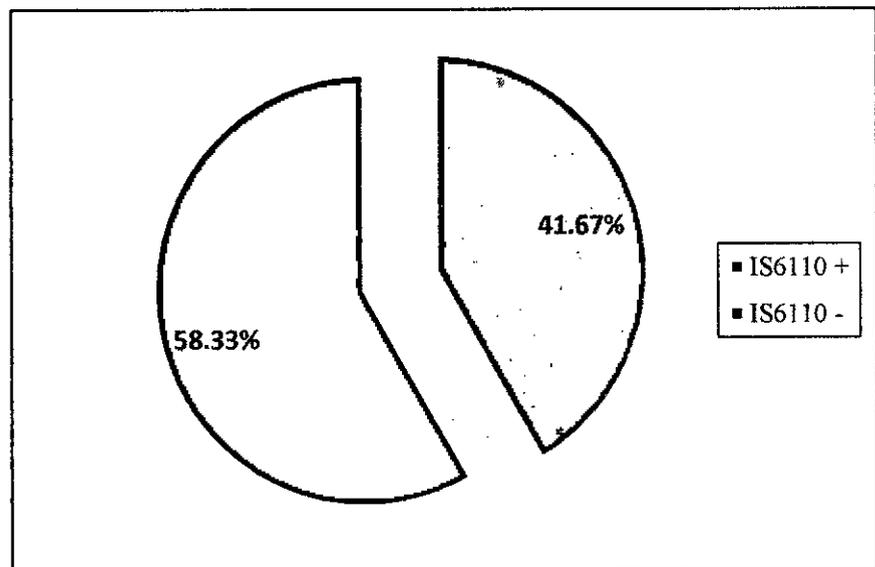
5.2 Segmento de Inserción IS6110 detectado en las muestras analizadas

En el estudio del segmento de inserción IS6110 del genoma *Mycobacterium tuberculosis* realizado en 12 muestras de vísceras (pulmones y ubres) de vacas destinados para consumo humano se detectaron muestras positivas en el 41,67% de ellas (Véase el gráfico N° 5.1 en la página 68).

El número total de muestras positivas para el caso de los pulmones fueron 2 y para el caso de las ubres fueron 3 muestras (Véase cuadro N° 5.4 en la página 69).

Grafico N° 5.1

FRECUENCIA DEL SEGMENTO DE INSERCIÓN IS6110 DE *Mycobacterium tuberculosis* EN EL TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS



Fuente: Resultados de frecuencia obtenidos en el presente estudio

Cuadro N° 5.4

NUMERO TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS

Código de muestra	Resultado PCR cualitativa
193600-P	-
193600-U	+
193601-P	-
193601-U	+
193602-P	+
193602-U	-
193603-P	-
193603-U	-
193604-P	+
193604-U	-
193605-P	-
193605-U	+
Total de muestras	12

Fuente: Resultados experimentales obtenidos en el presente estudio.

P: muestra de pulmón

U: muestra de ubre

5.3. Detección del segmento de inserción IS6110 en pulmones .

En la detección del segmento de inserción IS6110 en pulmones mediante la reacción en cadena de la polimerasa las muestras de código 193602-P y 193604-P fueron positivas. (Véase el cuadro N° 5.5 en la página 71).

Para el análisis se utilizó un control positivo (+) conocido proveniente del pulmón tuberculoso de un toro con diagnóstico clínico de TBC pulmonar del Camal Municipal N° 28 Imperial, un control negativo (-) conocido proveniente de una muestra negativa y un control blanco (B) en el que en la mezcla de reacción se reemplazó ADN por agua estéril grado molecular. Los resultados de la PCR cualitativa se visualizaron mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2% (Véase la figura N° 5.1 en la página 72).

5.4. Detección del segmento de inserción IS6110 en ubres

En la detección del segmento de inserción IS6110 en ubres, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, las muestras de código 193600-U, 193601-U y 193605-U fueron positivas. (Véase el cuadro N° 5.6 en la página 73).

Al igual que en el estudio de las muestras de pulmones, también se usaron los controles anteriormente descritos y los resultados de la PCR cualitativa fueron visualizados mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2% (Véase la figura N° 5.2 en la página 74).

Cuadro N° 5.5

MUESTRAS DE PULMONES POSITIVAS

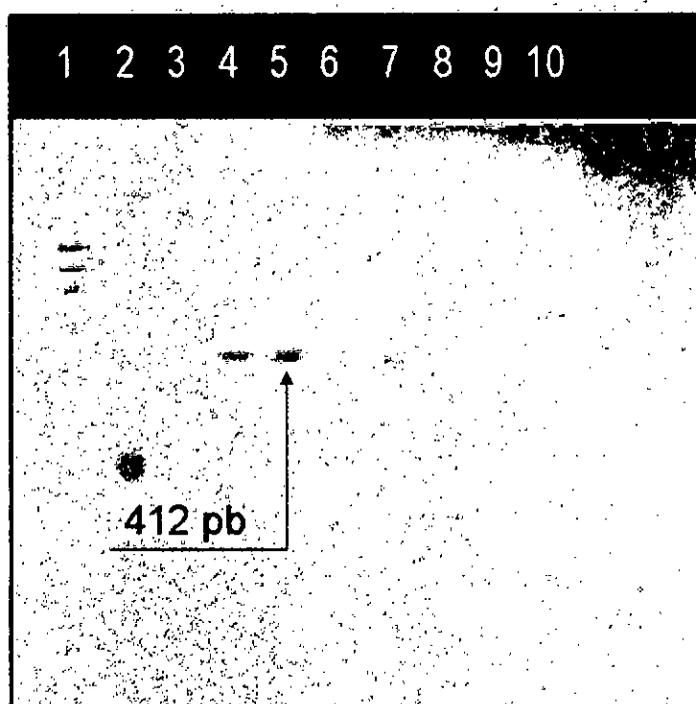
Código de muestra	Resultado PCR cualitativa
193600-P	-
193601-P	-
193602-P	+
193603-P	-
193604-P	+
193605-P	-
Total de muestras positivas	2 +
Control conocido (+)	+
Control conocido (-)	-
Control blanco (B)	-

Fuente: Resultados experimentales obtenidos en el presente estudio.

P: muestra de pulmón

Figura N° 5.1

GEL DE ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES DE LAS MUESTRAS
DE PULMONES



1- Marcador de ADN, 2- 193600-P, 3- 193601-P
4- 193602-P, 5- Control (+), 6- 193603-P,
7- 193604-P, 8- 193605-P, 9- Control (-),
10- Control (B)

Cuadro N° 5.6

MUESTRAS DE UBRES POSITIVAS

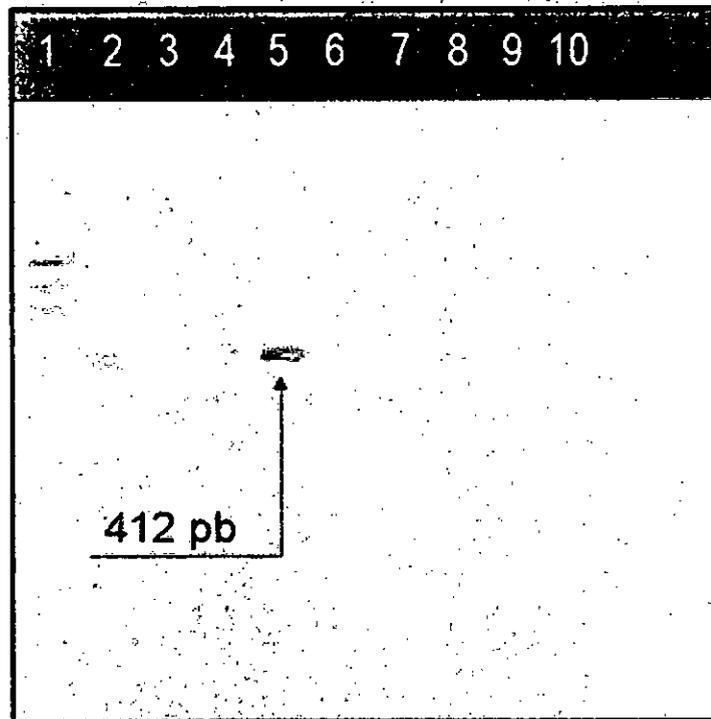
Código de muestra	Resultado PCR cualitativa
193600-U	+
193601-U	+
193602-U	-
193603-U	-
193604-U	-
193605-U	+
Total de muestras positivas	3 +
Control conocido (+)	+
Control conocido (-)	-
Control blanco (B)	-

Fuente: Resultados experimentales obtenidos en el presente estudio.

U: muestra de ubre

Figura N° 5.2

GEL DE ELECTROFORESIS DE LOS AMPLICONES DE LAS MUESTRAS
DE UBRES



1- Marcador de ADN, 2- 193600-U, 3- 193601-U
4- 193602-U, 5- Control (+), 6- 193603-U,
7- 193604-U, 8- 193605-U, 9- Control (-),
10- Control (B)

5.5. Incidencia del segmento de inserción IS6110 en pulmones y ubres

En las muestras de pulmones la incidencia del IS6110 fue de 2 + / 6, correspondiendo al 33,33 %. Las muestras positivas tuvieron un diagnóstico clínico presuntivo de tuberculosis pulmonar. Además una de ellas (193604-P) presentó principios de un proceso neumónico. (Véase el cuadro N° 5.7).

Cuadro N° 5.7

INCIDENCIA DEL SEGMENTO DE INSERCIÓN IS6110 EN PULMONES

Código de muestra	Presunción clínica	Edad	Resultado PCR cualitativa
193600-P	Sano	5	-
193601-P	Sano	6	-
193602-P	Probable TBC	3	+
193603-P	Sano	5	-
193604-P	Probable TBC Neumonía	2	+
193605-P	Sano	4	-
Incidencia (+)			2 + / 6 (33,33 %)

Fuente: Resultados experimentales obtenidos en el presente estudio.

P: muestra de pulmón

En las muestras de ubres la incidencia del IS6110 fue de 3/6, correspondiendo al 50%. Las muestras positivas correspondían a vacas con un promedio de edad de 5 años. (Véase el cuadro N° 5.8)

Cuadro N° 5.8

INCIDENCIA DEL SEGMENTO DE INSERCIÓN IS6110 EN UBRES

Código de muestra	Presunción clínica	Edad	Resultado PCR cualitativa
193600-U	No se realizó	5	+
193601-U		6	+
193602-U		3	-
193603-U		5	-
193604-U		2	-
193605-U		4	+
Incidencia (+)			3 + / 6 (50,00 %)

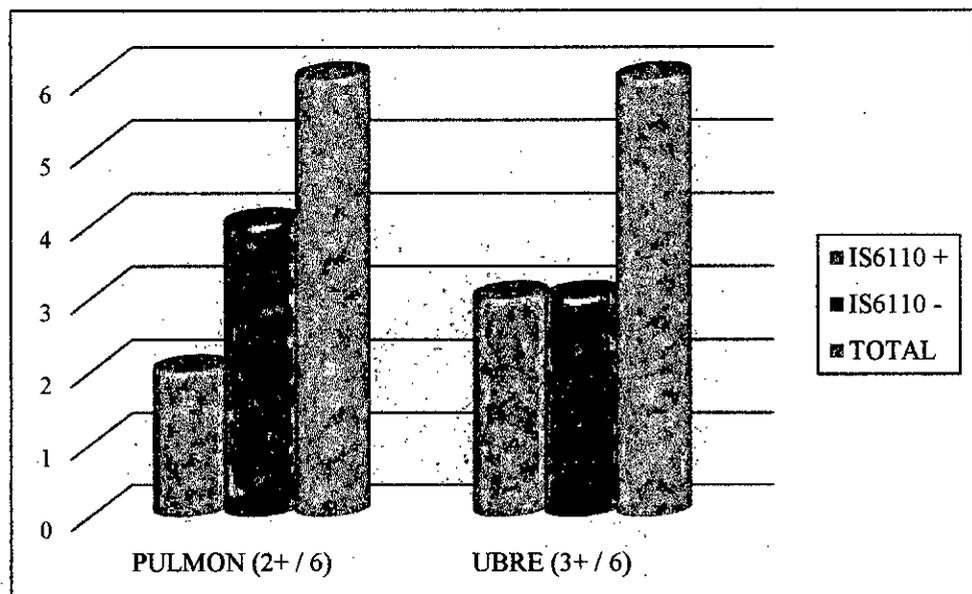
Fuente: Resultados experimentales obtenidos en el presente estudio.

U: muestra de ubre

A continuación se presenta el gráfico N° 5.2 donde se detalla la incidencia del segmento de inserción IS6110 del *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de pulmones y ubres de vacas.

Gráfico N° 5.2

INCIDENCIA DEL SEGMENTO DE INSERCIÓN IS6110 EN
MUESTRAS DE PULMONES Y UBRES



5.6. Resultados del análisis estadístico

Debido a la alta sensibilidad de la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis estadístico se realizó entre las frecuencias observadas y esperadas de las muestras de pulmones y ubres en base al estadístico de Chi cuadrado (χ^2) donde se obtuvo los siguientes resultados.

Cuadro 5.9

CUADRO DE CONTINGENCIA EXTENDIDO

IS6110 del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Muestras de pulmones	Muestras de ubres	Total
Positivo	2 (2,5)	3(2,5)	5
Negativo	4(3,5)	3(3,5)	7
Total	6	6	12

Se planteó como hipótesis nula (H_0) la independencia de los factores (resultados positivos y negativos al segmento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* del tipo de víscera analizada).

Se calcularon las frecuencias esperadas, así como la desviación de las frecuencias observadas y esperadas, siendo 0,343. Para un valor de $\alpha = 0,01$. La región de rechazo que le corresponde a la prueba según la distribución X^2 con (2-1) (2-1) grados de libertad fue igual a 6,63.

Luego, con un nivel de significación del 1% se aceptó la hipótesis nula, es decir no fue posible asegurar que el tipo de víscera, influya en el resultado positivo o negativo de la detección del segmento de inserción IS6110 del *Mycobacterium tuberculosis* mediante la PCR.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Contrastación de hipótesis con los resultados

6.1.1. Contrastación con hipótesis general

- El 41,67% del total de las muestras de pulmones y ubres de vacas estudiadas resultaron positivas en la genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* a través de la reacción en cadena de la polimerasa, lo que indica la necesidad de establecer medidas de bioseguridad.

6.1.2. Contrastación con hipótesis específicas

- Hipótesis específica 1

Los resultados obtenidos en la detección del segmento de inserción IS6110 del *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pulmones, mostrados en el cuadro 5.5, evidenciaron una contaminación por vía aérea, considerada la vía de infección más habitual.

La infección es por la inhalación de la bacteria, presente en toses y secreciones de vacas enfermas que expelen gran cantidad de micro gotitas que contienen gran cantidad de bacterias que al ser inhaladas por otro vacuno llegan al sistema respiratorio y dan comienzo a una nueva detección. De igual manera, la vía digestiva es considerada una fuente de ingreso de la micobacteria, debido al consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal y orina provenientes de vacas o personas enfermas. También se debe considerar que una de las causas más comunes de infección con *Mycobacterium tuberculosis* en animales jóvenes es la alimentación de los becerros con calostro o leche procedente

de vacas con mastitis, o alimentados con sueros de leche, o por alimentación directa de ubres tuberculosas.

Los resultados obtenidos indicaron que las muestras de pulmones positivas correspondían a vacas jóvenes de entre 2 años y 3 años de edad. En el caso de la muestra de pulmón de toro, usada como control positivo, correspondía a un toro de 2 años de edad. Lo que demostró que estos casos pudieron deberse a la poca atención en la alimentación y cuidado sanitario de los animales a lo largo de su vida productiva, en especial durante el periodo de lactancia.

- Hipótesis específica 2

Como se muestra en el cuadro 5.6, los resultados positivos de 3 de las muestras de ubres estudiadas confirmaron una contaminación de origen exógeno, es decir una contaminación producida por *Mycobacterium tuberculosis* en estado latente que generalmente ingresa al animal por vía mamaria ascendente a través del esfínter del pezón cuando la ubre está en contacto con el suelo, heno u cualquier superficie, portadora de la micobacteria, donde las vacas se echan.

Por otra parte, el estado de salud de los ordeñadores y personal que labora en un establo tiene un rol importante en la transmisión de la micobacteria, debido a que las vacas en su vida productiva, durante la operación de ordeño, están en contacto directo con estas personas que pueden ser portadoras del *Mycobacterium tuberculosis*, o poseer la enfermedad activa. Por lo que es necesario establecer medidas de bioseguridad a fin de evitar la transmisión de la bacteria en estudio.

- Hipótesis específica 3

Los resultados de incidencia obtenidos en las muestras de pulmones fue 2+ / 6, es decir, un 33,33% de muestras positivas y 3+ / 6, es decir, un 50% para las muestras de ubres.

Estos resultados evidenciaron que la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en vísceras como pulmones y ubres, obtenidas del Camal N° 28 Imperial, fueron elevadas. Este hecho indicaría que los ganaderos de los centros de engorde y establos, donde las vacas transcurren el mayor tiempo de su vida productiva, no tuvieron el debido control y manejo sanitario de sus animales. Generalmente estos animales enfermos son aislados, según la intensidad o gravedad de la enfermedad hasta que finalmente son comprados por personas, dedicadas al expendio de carnes y vísceras en los principales mercados, que no tienen en cuenta el estado sanitario de estos animales y del peligro que representan para la salud de manipuladores y consumidores.

En ninguna de las vacas se detectó infección tuberculosa en ambas vísceras. Lo cual demostró que el ingreso del *Mycobacterium tuberculosis* en las vacas se produjo de diferentes formas. En el caso de las vacas con muestras positivas de pulmón la contaminación fue por vía aerógena, sin embargo no se descartó una contaminación digestiva debido al alimento que el ganado consume y huele.

El caso de las vacas con ubres contaminadas evidenciaría la falta de medidas de bioseguridad y buenas prácticas agropecuarias en los establos o centros de engorde.

6.2. Contratación de hipótesis con otros estudios similares

De los casos positivos (33,33%) obtenidos en las muestras de pulmones indicó que la transmisión aérea sigue siendo una de la principales vías de transmisión de la bacteria, lo cual concuerda con Cassidy, J. 2006, quien en su investigación determinó que la mayoría de las lesiones de tuberculosis de origen bovino estaban localizadas en el tracto respiratorio. Generalmente, la bacteria infecta a su huésped por la vía aerógena, afectando los pulmones (Phillips, C. y col. 2003). Sin embargo, el proceso infeccioso progresa por las vías hematógenas o linfáticas diseminándose a otras partes del cuerpo y dañando otros órganos (Botello - Rodríguez, A. 2013). En nuestra investigación no se detectaron casos positivos en ambas vísceras.

Sweetline, A. y col. 2016 determinaron al realizar la amplificación del IS6110 de muestras positivas de pulmón caseoso aisladas mediante cultivo, que el 41 % pertenecían al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Su investigación fue complementada con la reacción en cadena de la polimerasa multiplex para la diferenciación de *M. bovis* y *M. tuberculosis* seleccionando un fragmento de 12,7kb (véase cuadro 6.1 en la página 85). El elevado porcentaje de muestras positivas pudo deberse a que las muestras estudiadas por los investigadores provenían de animales muy enfermos y sospechosos de tuberculosis. En nuestro caso se obtuvo un 33,33% de casos positivos en muestras de pulmón. Es importante señalar que la tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas del mundo que en algún momento de la evolución pasó a tener un reservorio en la escala animal, por lo que se ha demostrado que su origen es una especie de *M. tuberculosis* ancestral (Gutierrez, M. y col. 2005)

Por otra parte, Screevatsan, S. y col. 1997 concluyeron en el estudio de la secuencia completa del genoma del *M. bovis* que los microorganismos

pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* estaban relacionados en un porcentaje mayor al 99,9% en similitud genética. Lo cual concuerda con Garnier, T. y col. 2003 quien en su investigación halló que a nivel genoma el *M. bovis* comparte el 99,95% de identidad con el *M. tuberculosis*.

Echevarría, G., 2011 mediante la utilización del Nested-PCR identificó la presencia de tuberculosis bovina en el 4,32 % de muestras de pulmón y ganglios linfáticos provenientes de vacunos. Además debido a la afinidad del animal hospedero con la enfermedad asumió que se trataba del *M. bovis*. Otros estudios similares han hallado resultados de 2,81 % (Acosta, C. y col., 1977) y 0,47% (Salazar, J. y col., 2002) a través de pruebas intradérmicas simples y comparativas, probablemente la diferencia se debió a que las pruebas de diagnóstico empleadas fueron distintas.

Sin embargo, Guardiola, J. 2009 en la identificación del *Mycobacterium bovis* en tejido pulmonar y nódulo linfáticos bronquiales de vacunos con lesiones sospechosas a tuberculosis bovina mediante PCR no pudo realizar la amplificación del ADN obteniendo un resultado insatisfactorio a pesar de emplear muestras clínicas presuntivamente positivas. Este resultado se debió que la técnica de amplificación falló y que quizás el ADN obtenido pertenecía a otras células cercanas al tejido pulmonar y nódulo linfático el cual intervino en la lectura del ADN que estaba en estudio. Hecho que concuerda con Wilson, I., 1997 quien concluyó que la contaminación y otros factores externos pueden causar la inhibición en algunos puntos de la interacción molecular. La técnica de PCR requiere del uso de controles internos, así como de controles positivos, sobre todo en aquellos casos, donde la presencia o ausencia de un producto de amplificación es relevante en el diagnóstico (Guardiola 2009). En nuestro estudio realizado se utilizó controles internos de calidad para cada caso en estudio: un control comercial positivo (+), un control positivo, proveniente de un toro tuberculoso, un control negativo (-) y un control

blanco (B), en el que en la mezcla de reacción se reemplazó ADN por agua grado molecular estéril.

Los resultados positivos de la detección del IS6110 del *Mycobacterium tuberculosis*, hallados en el 50% de las muestras de ubres estudiadas evidenció que los ganaderos o criadores no tuvieron el manejo higiénico sanitario adecuado en la crianza de sus animales. Debido a que posiblemente exista el desconocimiento de que la tuberculosis es una enfermedad que, además de transmitirse entre los seres humanos y entre los animales, puede hacerlo también de animales a hombres o de hombres a animales. (Martin, P. y col. 1998).

No se encontraron estudios similares de genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* en ubres, sin embargo Roa J. 2015 obtuvo, en el estudio de la prevalencia de tuberculosis bovina, un 43,13 % de casos positivos en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de leche. Una de las posibles causas de la elevada prevalencia pudo ser la falta de exámenes de diagnóstico en los hatos ganaderos.

Otros autores como Sweetline, A. y col., 2016 obtuvieron un 14,2 % de casos positivos de bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la amplificación del IS6110 en muestras de leche. Los resultados hallados indicaron que la presencia de bacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* en éste tipo de muestras están directamente relacionadas con el estado sanitario de las ubres. Los mismos autores reportaron la presencia total de aislados de *M. tuberculosis* (84,3%) y *M. bovis* (15,6%) en diferentes tipos de muestras de vacunos (véase cuadro 6.1 en la página 85).

Finalmente, en la presente investigación, mediante el análisis estadístico de X^2 con un nivel de confianza del 99%, se admitió la hipótesis nula planteada (H_0), es decir, que los resultados positivos y negativos obtenidos no dependieron del tipo de víscera analizada.

Cuadro 6.1

RESULTADOS DE AISLAMIENTOS POR TINCIÓN ZIEHL NEELSEN,
CULTIVO, IS6110 PCR Y MULTIPLEX PCR.

N°	Muestras	Tinción Ziehl Neelsen Positividad % (n)	Cultivo Positividad % (n)	IS6110 Positividad %(n)	Multiplex PCR 12.7 kb Positividad %(n)	
					<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
1	pulmón caseoso (n=78)	65(51)	60 (47)	41 (32)	87,5 (28)	12,5 (4)
2	nodulos linfáticos (n=29)	58,6 (17)	58,6 (17)	55,1 (16)	81,3 (13)	18,8 (3)
3	bazo (n=20)	30 (6)	-	-	-	-
4	leche (n=21)	14,2 (3)	14,2 (3)	14,2(3)	66,6 (2)	33,3 (1)
5	Total	52 (77)	45,2 (67)	34,4 (51)	84,3 (43)	15,6 (8)

Fuente: Sweetline, A. y col., 2016

VII. CONCLUSIONES

- a) A través de la PCR se desarrolló la genodetección de *Mycobacterium tuberculosis* donde se obtuvo, de las muestras analizadas (ubres y pulmones de vacas), el 41,67 % de muestras positivas. Esto significó un llamado de atención en la aplicación de las medidas de bioseguridad para las personas que tienen contacto directo con animales portadores del *M. tuberculosis* en los camales, establos o centros de engorde y para las personas consumidoras de vísceras, especialmente de ubres y pulmones, que provienen de estos animales.
- b) En la detección del segmento de inserción IS6110 del *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de pulmones y ubres se halló un 33,33% y 50 % de muestras positivas respectivamente. Lo que confirmó la importancia de la vía aérea como medio de contaminación en animales jóvenes (vacas de 2 años de edad y 3 años de edad) que enferman tempranamente. Los casos positivos en ubres confirmaron que esta vía resultó ser la más significativa en vacas de mayor edad (vacas entre 4 años de edad y 6 años de edad) las cuales habrían tenido cuando menos de uno a dos ciclos de lactación. Por otro lado al no realizarse la inspección post mortem de las ubres, en el Camal Municipal N° 28 Imperial, éstas se comercializan completas, sin eliminarse las partes afectadas llegando a manipuladores y consumidores contaminadas con *M. tuberculosis*.
- c) El análisis de X^2 demostró, con 99% de confiabilidad que los resultados positivos y negativos, obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no dependen del tipo de víscera analizada.

VIII. RECOMENDACIONES

- a) Se recomienda de manera urgente la inspección de las ubres para eliminar por incineración las piezas contaminadas, evitando que la contaminación por *M. tuberculosis* llegue a los consumidores.
- b) Realizar estudios de diagnóstico sobre la aplicación de las medidas de bioseguridad en los establos y centros de engorde, enfocándose en aquellos aspectos relacionados con la transmisión de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*.
- c) Implementar las Buenas Prácticas Agropecuarias, control sanitario de las personas encargadas del manejo del ganado y las Buenas Prácticas de Faenado, incidiendo en los protocolos de desinfección en los camales, y buena rutina de ordeño en los establos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. Organización Panamericana de la Salud, 1, 266-280.
2. Altamirano, M., Kelly, M. T., Wong, A., Bessuille, E. T., Black, W. A., & Smith, J. A. (1992). Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(8), 2173-2176.
3. Arráiz, N., Romay, Z., Fariá, N., & Mujica, D. (2006). Identificación diferencial de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* por un ensayo de rcp múltiple. *Revista Científica*, 16(6), 622-628.
4. Ashford, D. A., Voelker, L., Steele, J. H., Thoen, C. O., Steele, J. H., & Gilsdorf, M. J. (2006). Bovine tuberculosis: environmental public health preparedness considerations for the future. *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans, Second Edition*, 305-315.
5. Astiasarán, I., & Martínez, A. J. (2000). Alimentos composición y propiedades. Editorial McGraw-Hill. Interamericana.
6. Atlas de Dermatología (2004). Tuberculosis de la piel. Recuperado el 4 de octubre de 2017 de <http://www.iqb.es/dermatologia/atlas/tuberculosis/tuberculosis01.htm>.

7. Botello-Rodríguez, A. (2013). Título: Eliminación de la tuberculosis bovina y su efecto en la producción de leche y carne. Revista Granma Ciencia. Vol, 17(3).
8. Blaha, T. (1995). Epidemiología especial veterinaria. España: ACRIBIA.
9. Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. Annual review of biochemistry, 64(1), 29-63.
10. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., et al. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(6), 3684-3689.
11. Cano, C. J. P. & Camacho, L. A. (2007). Tuberculosis bovina. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
12. Cassidy, J. P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Veterinary microbiology, 112(2-4), 151-161.
13. Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Denef, J. F., Cocito, C., & Gala, J. L. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. Journal of clinical microbiology, 38(8), 3048-3054.

14. Cubero de Frutos, N. (2009). Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en estado de latencia en muestras clínicas. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. España.
15. Champoux, J., Drew, W., Neidhardt, F., Plorde, J. (1990). Microbiología Médica Una Introducción a las Enfermedades Infecciosas. MC GRAW HILL.
16. Daffé, M., & Draper, P. (1997). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*, (39), 31–203.
17. Delgado, G., R. (1999). Histopatología de la tuberculosis bovina y diagnósticos diferenciales en la comarca lagunera. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios.
18. Delgado, R. L. C., & Torres, D. J. M. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 14, 158-164..
19. DOF. (1993). Ley de Sanidad Animal. En Diario Oficial de la Federación, México 18 de junio de 1993.
20. DOF. (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-96. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. *Mycobacterium bovis* (6) 6-36.

21. Echeverría, G. (2011). Determinación de la prevalencia de tuberculosis bovina (TBB) mediante la aplicación de Nested-PCR en bovinos faenados en los camales municipales de los cantones Cayambe (Pichincha) y Pelileo (Tungurahua). Escuela Politécnica del Ejercito. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología.
22. ELIKA (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria), (2014). Mycobacterium.
23. Ellner, J. J., Hinman, A. R., Dooley, S. W., Fischl, M. A., Sepkowitz, K. A., Goldberger, M. J., et al. (1993). Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *Journal of Infectious Diseases*, 168(3), 537-551.
24. EFSA, (2014). Statement on a conceptual framework for bovine tuberculosis. Recuperado el 21 de diciembre de 2017 de <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3711.pdf>
25. FSIS (Food Safety and Inspection Service). (2005). Responsibilities related to foreign animal diseases and reportable conditions. United States Department of Agriculture, United States of America.
26. Frothingham, R., Hills, H. G., & Wilson, K. H. (1994). Extensive DNA sequence conservation throughout the Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of clinical microbiology*, 32(7), 1639-1643.

27. Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., et al. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7877-7882.
28. Good, M., & Duignan, A. (2011). Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Veterinary medicine international*, 2011.
29. Guardiola, J. (2009). Detección de *Mycobacterium bovis* en pulmón y nódulo linfático mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). División Regional de Ciencia Animal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
30. Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., et al. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 1(1), e5.
31. Grulia, M., Gori, A., Catozzi L., L. Vago, Nebuloni. M, Rossi.C.M, Degli A., Bandera A., (1998). Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin- fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assay. *J Clin Microb.* (36), 1512-1517.
32. Harris, N. B., Payeur, J., Bravo, D., Osorio, R., Stuber, T., Farrell, D., et al. (2007). Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 1025-1028.

33. Hernández, C., Zamora, F., Gómez, M., & Villarroel, M. (2000). Recuperación de micobacterias mediante el uso de dos diferentes medios de cultivo. *Bol. Soc. Venez. Microbiol*, 20(2), 138-140.
34. Hubbert, W. T., Hagstad, H. V., Spangler, E., Hinton, M. H., & Hughes, K. L. (1996). *Food safety and quality assurance: foods of animal origin* (No. Ed. 2). Iowa State University Press.
35. ICMSF, (2000). *Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos – Microorganismos de los Alimentos 2: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas*. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
36. Jaques, M., & Jacobo F. (1996). *Biología Molecular*. Editorial Ciencia y Desarrollo México D.F.
37. Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schereckenberger, P., Washington C. (1997). *Diagnostico microbiológico texto y atlas color*. Editorial Médica Panamericana.
38. Köller, T., & Thamm, B. (1995). *Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction*.
39. Laboratorio Mam - Lab. (2005). *Protocolos de Investigación*. Lima.
40. Little, T. (1982). Bovine tuberculosis in domestic and wild animals in a arca of dorset III. The prevalence of tuberculosis in mammals other than badgers and cattle. *J. Hygiene London* (89), 225-234.

41. LoBue, P. A., Enarson, D. A., & Thoën, C. O. (2010). Tuberculosis in humans and animals: an overview [Serialised article. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. Number 1 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(9), 1075-1078.
42. Lugo de la Fuente. (1996). *Bacteriología médica*. Editorial CUELLAR.
43. Martín, C., Bigi, F., & Gicquel, B. (2007). New vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis*, 10, 341-360.
44. Martin, P., León, L. (1998). *La Tuberculosis: Introducción a la enfermedad*. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria. Unidad de Enfermedades Infecciosas.
45. Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1032-1035.
46. Ministerio de Agricultura - Oficina De Estudios Económicos y Estadísticos (2012). *Estadística de faenamiento de ganado*.
47. Ministerio de Cultura y Patrimonio, Ecuador. *Patrimonio Alimentario*. Recuperado el 4 de octubre de 2017 de : <http://patrimonioalimentario.culturaypatrimonio.gob.ec/wiki/index.php/Ubre>

48. Ministerio de Salud- Dirección General de Epidemiología (2016). Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú 2015.
49. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-95. Campaña Nacional contra la *Tuberculosis Bovina* (*Mycobacterium bovis*). Diario Oficial de la Federación. Marzo, 1996.
50. Open Course Ware (OCW). Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño. Universidad Politécnica de Madrid. Recuperado el 4 de octubre de 2017 de: http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno
51. Organización Mundial de la Salud (2015), Global tuberculosis report. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf. 2015.
52. Organización Mundial de la Salud. (2000), Estrategia global de la OMS para la inocuidad de alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Departamento de Inocuidad de los alimentos, Ginebra, Suiza.
53. Palomino, J. C., Leão, S. C., & Ritacco, V. (2007). Tuberculosis 2007; from basic science to patient care. [s.n.]
54. Phillips, C.J., Foster, C.R., Morris, P.A., Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science* (74), 1–15.

55. Prat, C., Domínguez, J., Ausina, V. (2007) *Mycobacterium Bovis*. Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.
56. Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (1999). Microbiology 4th Ed. New York: WCB McGraw-Hill.,
57. Prodinger, W. M., Brandstätter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M. L. et al. (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 4984-4992.
58. Quispe, M. (2002). Estudio del mercado de carne de res y productos lácteos en Lima Metropolitana y Huancayo - Proyecto Zac Canipaco. Dirección General de Promoción Agraria.
59. Quito, M. R. (1977). Estudio Microbiológico de vísceras y apéndices de vacuno beneficiados en la Molina empacadas en bolsas de polietileno. Memoria para optar en título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Agraria la Molina. Lima Perú.
60. Ramírez, R., Cocotle, R., Méndez, P. (2002). *Mycobacterium tuberculosis*: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 2(2),39-43
61. Ramírez, R. (2003). Reacción en cadena de polimerasa. 3 (1), 1-6.

62. Retamal, P., Martínez, M. A., & Abalos, P. (2003). Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Revista chilena de infectología*, 20(3), 166-170.
63. *Revista Peruana de Cardiología*, Julio - Diciembre (2000). Los alimentos en el Perú. Recuperado el 4 de octubre de 2017 de http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/cardiologia/v26_n2/tab_alimentos.htm
64. Rojas, R. & Gonzales, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Artículo de revisión de biología molecular. México.
65. Salazar, J. & Cevallos, C. (2002). Diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante prueba intradérmica única en hatos lecheros del cantón Cayambe en la provincia del Pichincha. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad central del Ecuador.
66. Sambrook, Fritsch, Manniatis. (1989) Insolation of high molecular weight DNA from mammalian cell: Protocol I, II. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Second Edition. Analysis and Cloning of Eukaryotic Genomic DNA. Book 1 Chapter 9.
67. Sanz C. (1980). *Infección veterinaria en los mataderos mercados y vaquerías*. España. Editorial ESPASA-CALPE-Barcelona-España.

68. Scorpio, A., & Zhang, Y. (1996). Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature medicine*, 2(6), 662.
69. Sreevatsan, S., Bookout, J. B., Ringpis, F., Perumaalla, V. S., Ficht, T. A., Adams, L. G., et al. (2000). A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2602-2610.
70. Sreevatsan, S., Pan, X. I., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., & Musser, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18), 9869-9874.
71. Sweetline Anne., N., Ronald, B.S.M., Kumar, T.M.A. Senthil, Kannan, P., Thangavelu, A., (2016) Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. *Veterinary Microbiology*, 198, 81-87.
72. Terán, M. V., & del Barrio, L. (2005). Salud pública veterinaria e inocuidad de los alimentos en América Latina y el Caribe. In *Proceedings of Global Feed & Food Congress* (pp. 1-17).
73. Toledo Ordoñez, P., Milián Sauzo, F., Santillan Flores, M. A., & Ramírez Casillas, I. C. (1999). Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de

pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Veterinaria México* 30 (3) 227-229.

74. Tizar, I. (2002). *Inmunología veterinaria*. España. Editorial MC GRAW-HILL, Interamericana. España.
75. Volk W., Gerbhardt B., Hammarskjöld M., Kadner R. (1996). *Essentials of Medical Microbiology*. (5), 429-440. Philadelphia, Lippincott-Raven Publisher.
76. Watson J.D, M. Gilman, Witkowski. J, y Zoller. M. (1992). *Recombinant DNA*, (2). Ed, Freeman, New York.
77. Wilson, A. (1970). *Inspección Práctica de la carne*. España. Editorial ACRIBIA S.A.
78. Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741.
79. Woods, G. (2002). The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 16(1), 127-44.
80. Whipple, D. L., Bolin, C. A., & Miller, J. M. (1996). Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3), 351-354.
81. Yeboach, M. D., & Yates, M.D. (2001). Application of simple multiplex PCR to aid in routine work of the *Mycobacterium* reference Laboratory. *J Clin Microbiol* (39), 4166- 4168.

82. Zanden, A. G., M., & Hoentjen, A. (1998). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in strain microcopy preparations. *J. Clin.Pathol* (51), 209-214.

83. Zanini, M. S., Moreira, E. C., Lopes, M. T. P., Oliveira, R. S., Leao, S. C., Fioravanti, R. L., et al. (2001). *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spolypotyping and restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(6), 809-813.

ANEXOS

ANEXO 1
MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: GENODETECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* EN VÍSCERAS DE VACUNOS MEDIANTE LA PCR

PRESENTADO POR: ING. PERCY BERNARDO SULCA MARTINEZ

ASESORA: DRA. ING. DÁNIZA MIRTHA GUERRERO ALVA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODOS
<p>Problema general:</p> <p>*¿De qué manera la genodetección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en pulmones y ubres de vacas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una llamada de atención para la salud de los manipuladores y consumidores?</p>	<p>Objetivo general:</p> <p>*Desarrollar la genodetección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en pulmones y ubres de vacas, destinadas a consumo humano, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</p>	<p>Hipótesis general:</p> <p>La genodetección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en pulmones y ubres de vacas, destinadas a consumo humano, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), establece la importancia de tomar las medidas de bioseguridad correspondientes.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <p>Segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</p>	<p>Detección del segmento de inserción de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de 412 pb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</p>	<p>Positivo: Cuando el amplicón mostró un producto de amplificación equivalente al número de pares de bases (pb) del control positivo de referencia.</p> <p>Negativo: Cuando el amplicón no mostró un producto de amplificación equivalente al número de pares de bases (pb) del control positivo de referencia.</p>	<p>Reacción en Cadena de la Polimerasa cualitativa</p>
<p>Problemas específicos:</p> <p>*¿Se podrá encontrar <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a nivel de pulmón, víscera de mucho consumo tradicional?</p> <p>*¿Esta bacteria podrá estar presente en las ubres de las vacas que se comercializan?</p> <p>*¿Cuál será la incidencia del segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en las muestras de pulmones y ubres de vacas?</p>	<p>Objetivos específicos:</p> <p>*Detectar el segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras de pulmones de vacas, a través de la reacción en cadena de la polimerasa.</p> <p>* Detectar el segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras de ubres de vacas, a través de la reacción en cadena de la polimerasa.</p> <p>*Determinar la incidencia del segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en las muestras de pulmones y ubres de vacas.</p>	<p>Hipótesis específicas:</p> <p>* La detección del segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras de pulmones de vacas evidencia la contaminación de esta víscera por vía aérea, considerada la forma más directa de infección.</p> <p>* La detección del segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras de ubres de vaca evidencia un origen endógeno de la contaminación, debida a los gérmenes que contiene la sangre.</p> <p>*La incidencia del segmento de inserción IS6110 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en las muestras de pulmones y ubres de vaca es elevada, debido a las condiciones inadecuadas de crianza y faenado.</p>	<p>Variable Dependiente:</p> <p>Calidad sanitaria de las muestras de tejidos de pulmones y de ubres de vacas</p>	<p>Según Reglamento Sanitario del Faenado de Animales de Abasto.</p>	<p>Ausencia de alteraciones que constituyan riesgo para la salud pública o animal.</p>	

ANEXO 2

CALCULOS DE LA PRUEBA DE CHI CUADRADO (X^2)

1) A continuación se presenta el cuadro de contingencia con las frecuencias observadas (f_o)

IS6110 del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Muestras de pulmones	Muestras de ubres
Positivo	2	3
Negativo	4	3

2) Identificación de factores o variables

- Resultados positivo (+) y negativo (-)
- Tipo de víscera : pulmones (P) y ubres (U)

3) Formulación Hipótesis

H_0 : Factores son independientes (X^2 calc. < X^2 crítico)

H_1 : Factores no son independientes (X^2 calc. > X^2 crítico)

4) Fórmulas empleadas

a) $f_{e_{ij}} = (\text{Total fila } i\text{-ésima}) (\text{Total columna } j\text{-ésima}) / \text{Total global} \dots (*)$

$$b) \quad X_{calc.}^2 = \sum_{ij} \frac{(f_{o_{ij}} - f_{e_{ij}})^2}{f_{e_{ij}}} \dots (**)$$

Donde:

$f_{e_{ij}}$ = frecuencia esperada para la ij -ésima casilla , $f_{o_{ij}}$ = frecuencia observada para la ij -ésima casilla

5) Aplicando la formula (*), calculamos las frecuencias esperadas, mostradas entre paréntesis

IS6110 del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Muestras de pulmones	Muestras de ubres	Total
Positivo	2 (2,5)	3 (2,5)	5
Negativo	4 (3,5)	3 (3,5)	7
Total	6	6	12

6) Empleando la formula (**), determinamos el X^2 calculado, siendo 0,34

7) Considerando un nivel de significación del 1% y Grado de libertad =1, obtenemos de la tabla de distribución de Chi cuadrado (X^2) un valor de 6,635

8) Finalmente comparamos los valores de X^2 calc. y de X^2 crítico y aceptamos la hipótesis nula.

ANEXO 3

TABLA DE DISTRIBUCIÓN DE CHI CUADRADO (χ^2)

g.l.	$\chi^2_{0.995}$	$\chi^2_{0.990}$	$\chi^2_{0.975}$	$\chi^2_{0.95}$	$\chi^2_{0.9}$	$\chi^2_{0.1}$	$\chi^2_{0.05}$	$\chi^2_{0.025}$	$\chi^2_{0.01}$	$\chi^2_{0.005}$
1	3.9E-05	0.0002	0.0010	0.0039	0.0158	2.7055	3.8416	5.0239	6.6349	7.8794
2	0.0100	0.0201	0.0506	0.1026	0.2107	4.6052	5.9915	7.3778	9.2103	10.5966
3	0.0717	0.1148	0.2158	0.3518	0.5844	6.2514	7.8147	9.3484	11.3449	12.8382
4	0.2070	0.2971	0.4844	0.7107	1.0636	7.7794	9.4877	11.1433	13.2767	14.8603
5	0.4117	0.5543	0.8312	1.1455	1.6103	9.2364	11.0705	12.8325	15.0863	16.7496
6	0.6757	0.8721	1.2373	1.6354	2.2041	10.6446	12.5916	14.4494	16.8119	18.5476
7	0.9893	1.2390	1.6899	2.1673	2.8331	12.0170	14.0671	16.0128	18.4753	20.2777
8	1.3444	1.6465	2.1797	2.7326	3.4895	13.3616	15.5073	17.5345	20.0902	21.9550
9	1.7349	2.0879	2.7004	3.3251	4.1682	14.6837	16.9190	19.0228	21.6660	23.5894
10	2.1559	2.5582	3.2470	3.9403	4.8652	15.9872	18.3070	20.4832	23.2093	25.1882
11	2.6032	3.0535	3.8157	4.5748	5.5778	17.2750	19.6751	21.9200	24.7250	26.7568
12	3.0738	3.5706	4.4038	5.2260	6.3038	18.5493	21.0261	23.3367	26.2170	28.2995
13	3.5650	4.1069	5.0088	5.8919	7.0415	19.8119	22.3620	24.7356	27.6882	29.8195
14	4.0747	4.6604	5.6287	6.5706	7.7895	21.0641	23.6848	26.1189	29.1412	31.3193
15	4.6009	5.2293	6.2621	7.2609	8.5468	22.3071	24.9958	27.4884	30.5779	32.8013
16	5.1422	5.8122	6.9077	7.9616	9.3122	23.5418	26.2962	28.8454	31.9999	34.2672
17	5.6972	6.4078	7.5642	8.6718	10.0852	24.7690	27.5871	30.1910	33.4087	35.7185
18	6.2648	7.0149	8.2307	9.3905	10.8649	25.9894	28.8693	31.5264	34.8053	37.1565
19	6.8440	7.6327	8.9065	10.1170	11.6509	27.2036	30.1435	32.8523	36.1909	38.5823
20	7.4338	8.2604	9.5908	10.8508	12.4426	28.4120	31.4104	34.1696	37.5662	39.9968
21	8.0337	8.8972	10.2829	11.5913	13.2396	29.6151	32.6706	35.4789	38.9322	41.4011
22	8.6427	9.5425	10.9823	12.3380	14.0415	30.8133	33.9244	36.7807	40.2894	42.7957
23	9.2604	10.1957	11.6886	13.0905	14.8480	32.0069	35.1725	38.0756	41.6384	44.1813
24	9.8862	10.8564	12.4012	13.8484	15.6587	33.1962	36.4150	39.3641	42.9798	45.5585
25	10.5197	11.5240	13.1197	14.6114	16.4734	34.3816	37.6525	40.6465	44.3141	46.9279

ANEXO 4

ENTRADA PRINCIPAL AL CAMAL MUNICIPAL N° 28 IMPERIAL



ANEXO 5

AREA DE DESCANZO DE LOS ANIMALES DESTINADOS AL FAENADO



ANEXO 6

DUCHAS DE LOS ANIMALES DESTINADOS AL FAENADO



ANEXO 7
AREA DE SACRIFICIO



ANEXO 8
PARTE DE LA INFRAESTRUCTURA



ANEXO 9
AREA DE LIMPIEZA DE PIELES



ANEXO 10
AREA DE DESECHOS



ANEXO 11
CREMATORIO

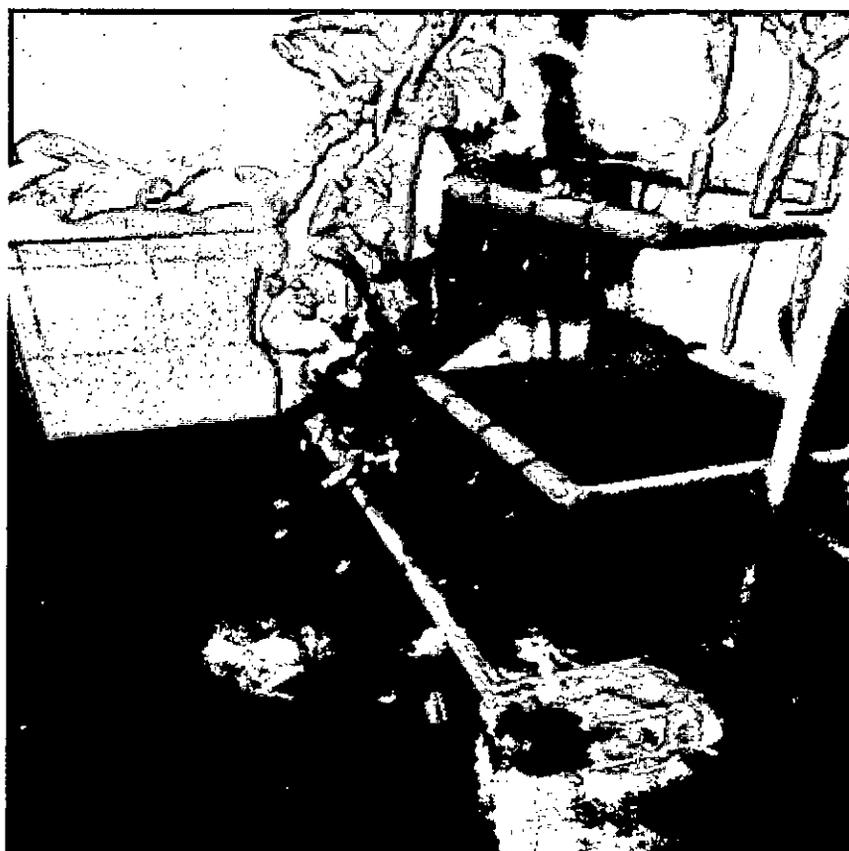


ANEXO 12
PASADIZO PRINCIPAL

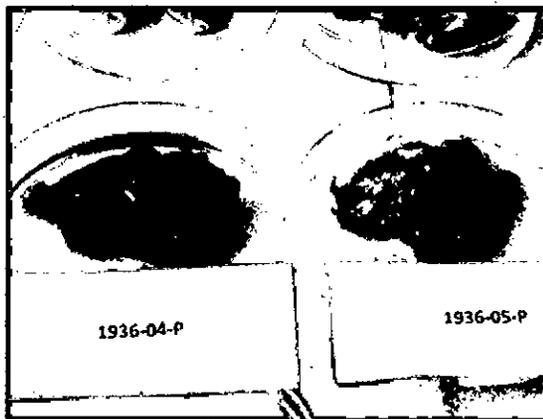
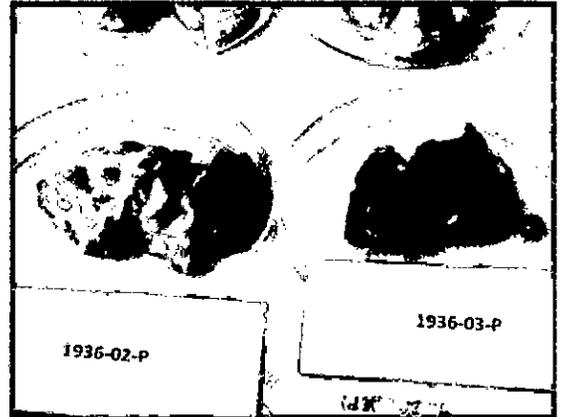
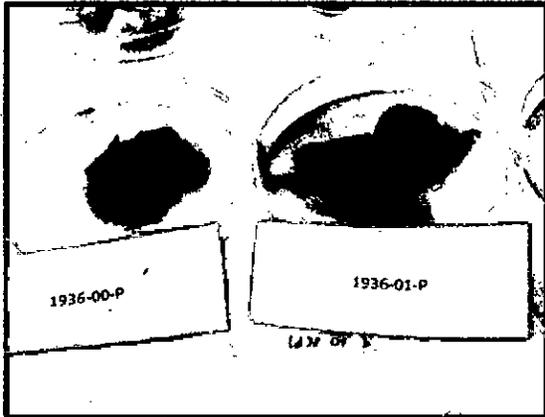


ANEXO 13

ÁREA DE INSPECCIÓN DE VISCERAS

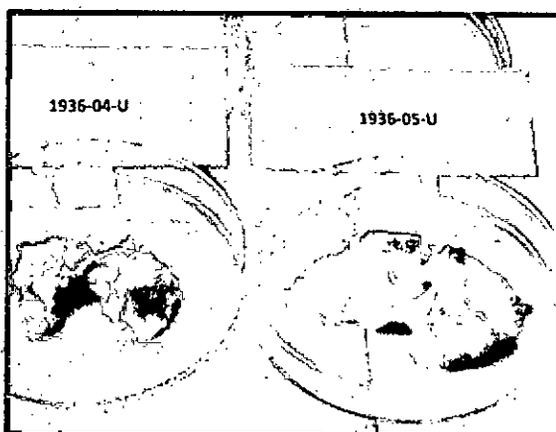
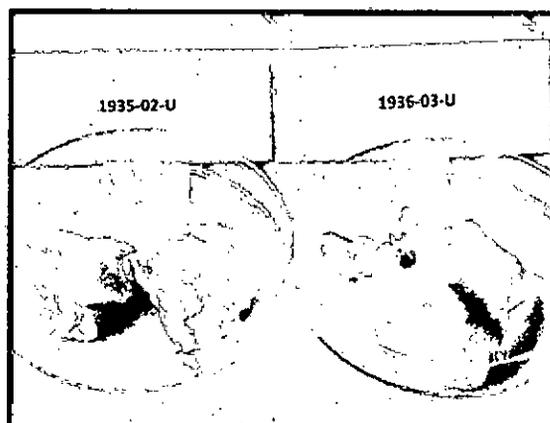
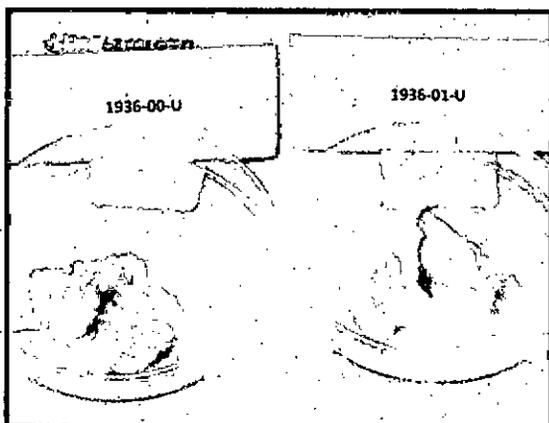


ANEXO 14
MUESTRAS DE PULMONES ANALIZADAS



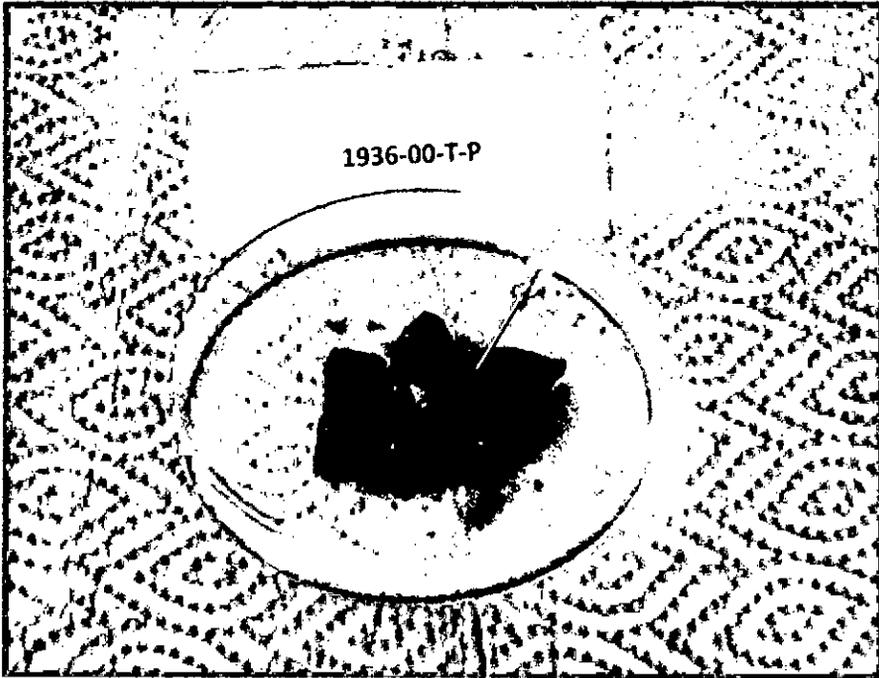
ANEXO 15

MUESTRAS DE UBRES ANALIZADAS



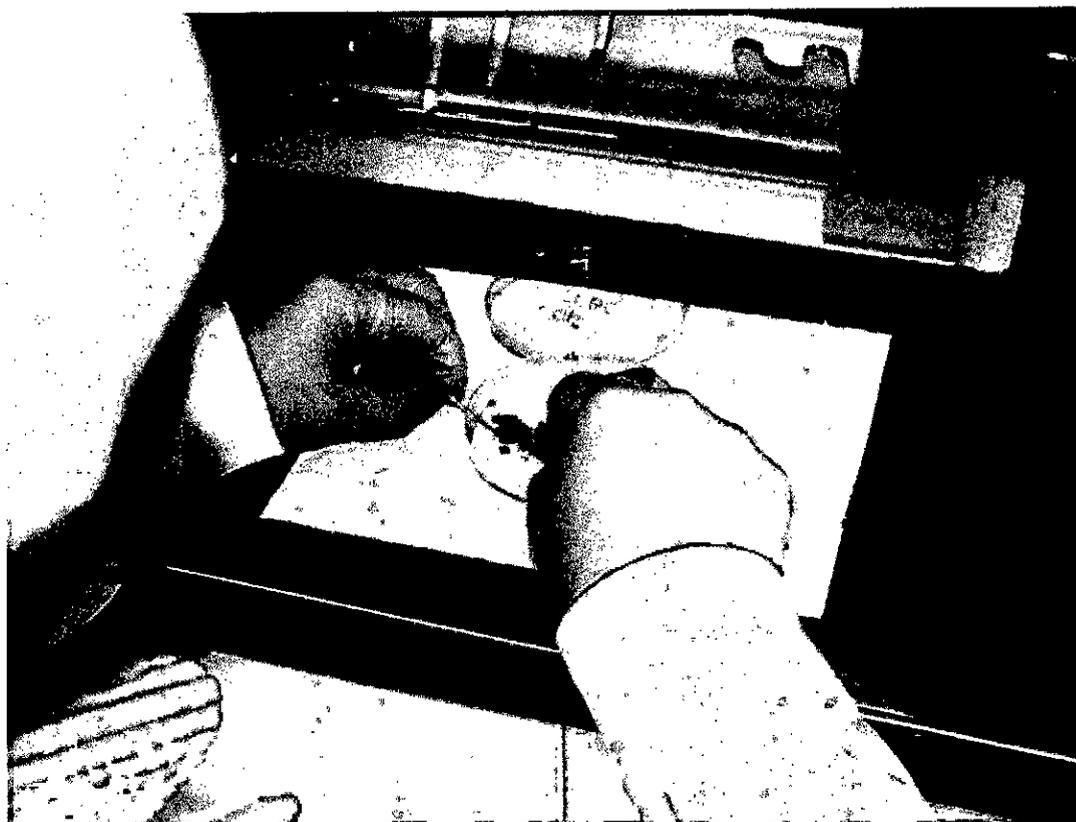
ANEXO 16

MUESTRAS DE PULMON DE TORO ANALIZADA

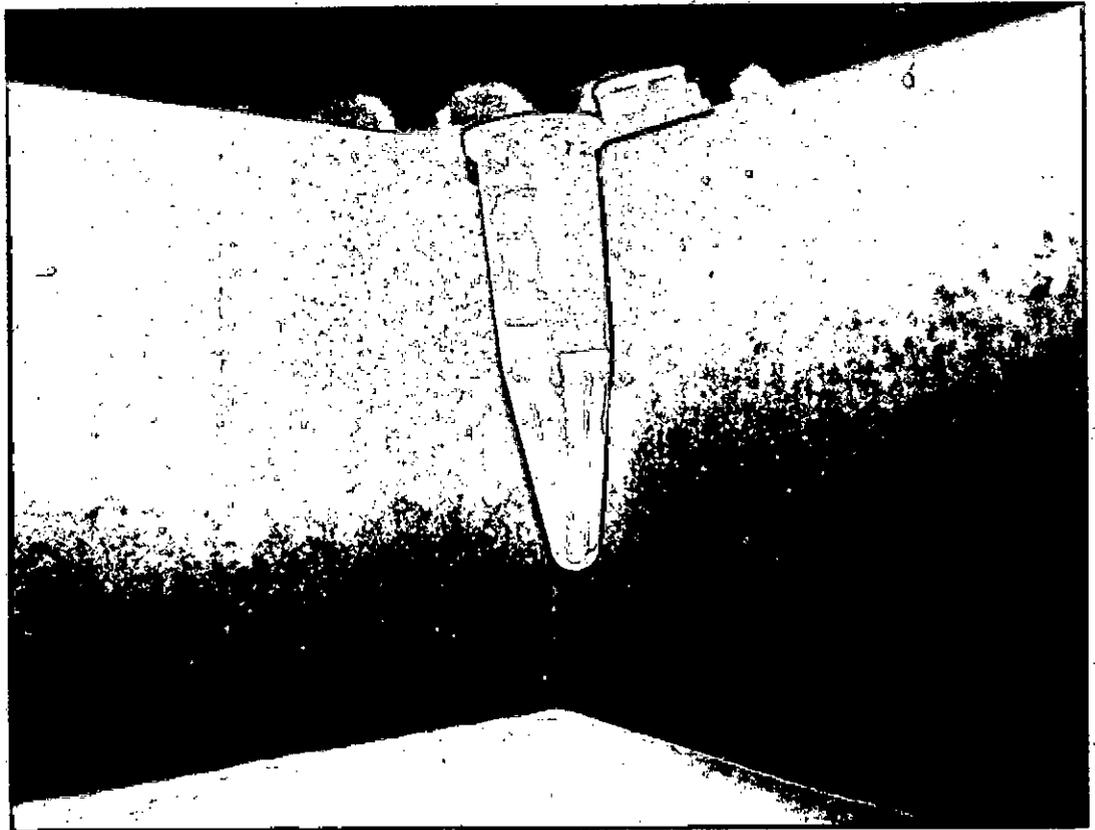


ANEXO 17

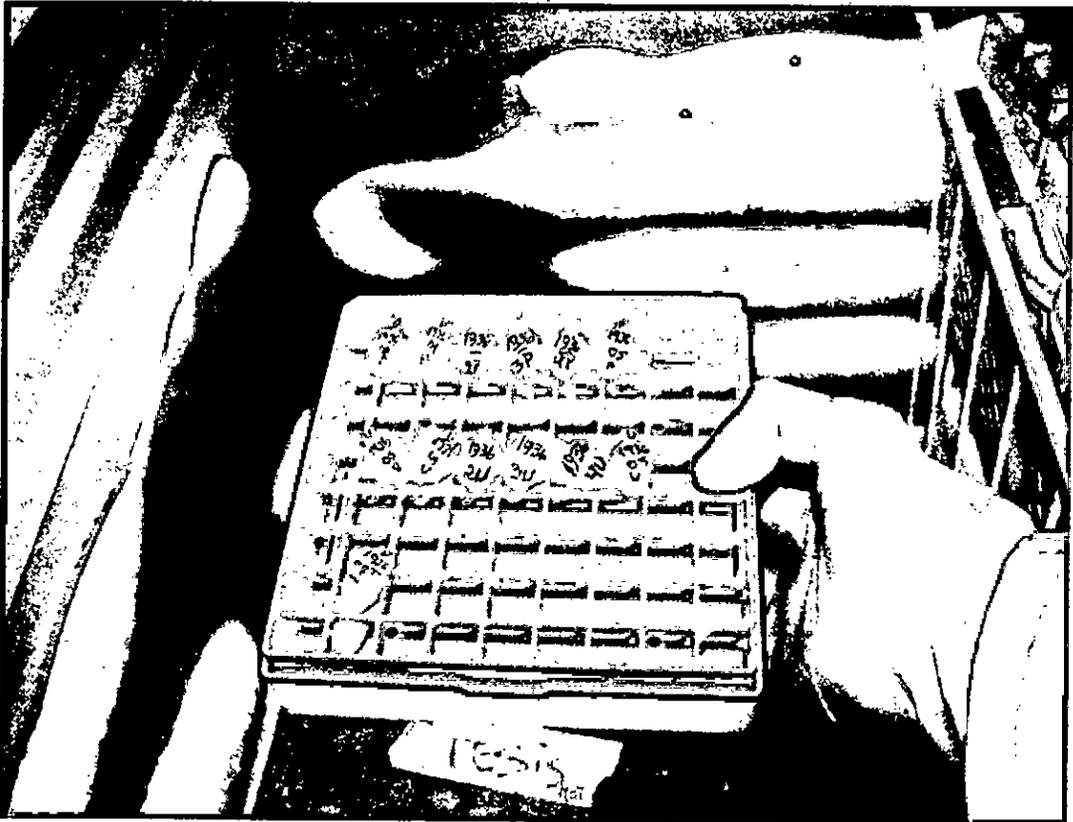
TRITURADO Y HOMOGENIZADO DE LAS MUESTRAS



ANEXO 18
EXTRACCION DE ADN



ANEXO 19
ALMACENAMIENTO DE ADNs A -36 °C

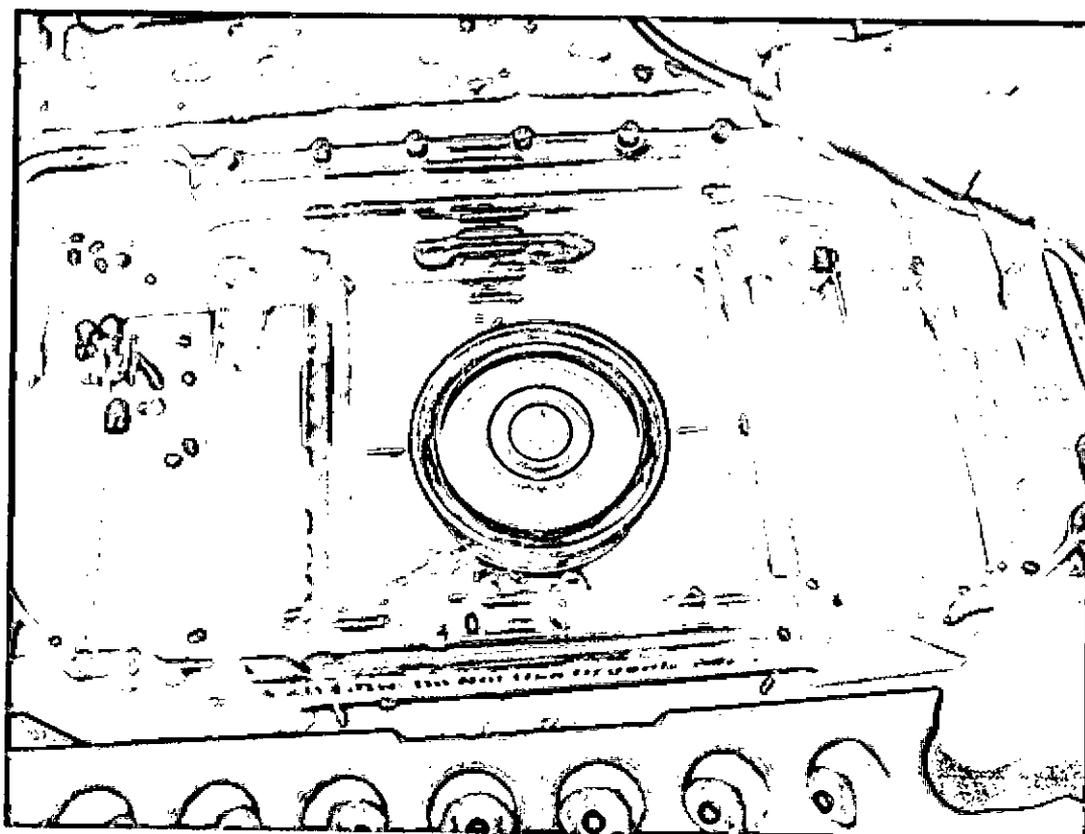


ANEXO 20
REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN EL TERMOCICLADOR

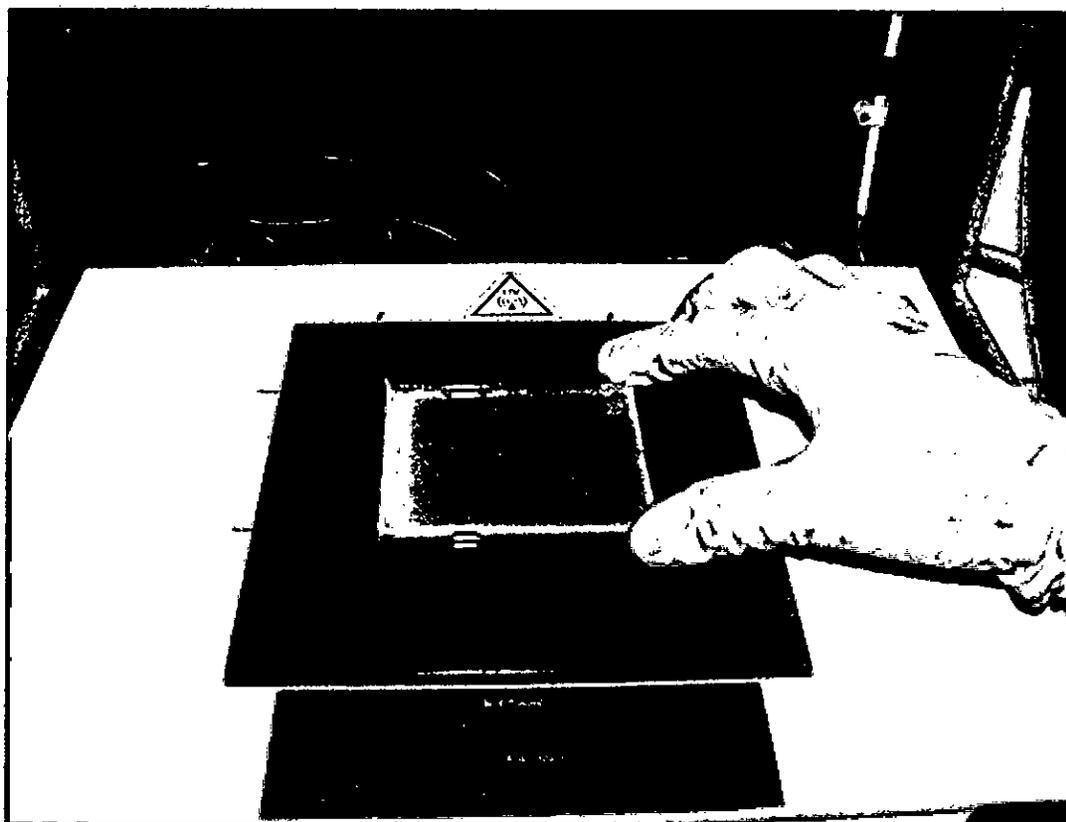


ANEXO 21

SEPARACIÓN DEL ADN POR ELECTROFORESIS



ANEXO 22
VISUALIZACIÓN DEL GEL EN LA CÁMARA UV



Callao, 10 de noviembre del 2017

Sr. SAUL RIVAS SANCHEZ
ADMINISTRADOR DEL CAMAL MUNICIPAL N° 28 IMPERIAL - CAÑETE

ATENCION : M.V. FRANCISCO SIÑA HERRERA

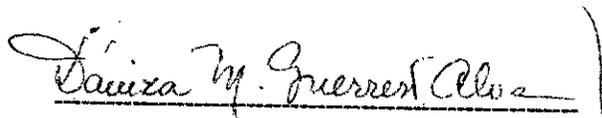
ASUNTO : OBTENCION DE MUESTRAS DE VISCERAS

De mi consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y mediante la presente hacer de su conocimiento que en mi calidad de asesora propuesta por el egresado de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos Ing. Percy Bernardo Sulca Martínez; se desarrollará el trabajo de tesis denominado: "GENODETECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS DE VÍSCERAS DE VACUNOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)". Razón por la que invoco a su gran espíritu de apoyo e interés por el desarrollo de la ciencia y tecnología de nuestro país y pido a usted pueda brindar las facilidades para la obtención de muestras de vísceras.

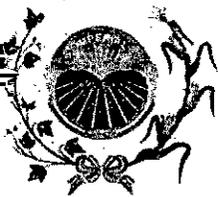
Sin otro particular, le reitero los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente.



DRA. ING. DÁNIZA MIRTHA GUERRERO ALVA

Asesora



IMPERIAL 30 DE NOVIEMBRE DEL 2017

SEÑORA : DRA. ING. DÁNIZA M. GUERRERO ALVA
Asesora de Tesis - Universidad Nacional del Callao

ASUNTO : Apoyo de Trabajo de Tesis

REF. : Genodetección de *Mycobacterium tuberculosis*

De mi consideración

Es muy grato dirigirme a Usted y acusar recibo de su carta del 10 de noviembre del 2017 por el cual presenta al egresado de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos: Ing. Percy B. Sulca Martínez, solicitando el apoyo y facilidades en la recolección de muestras de vísceras de ganado vacuno, con la finalidad de cumplir con el desarrollo de la tesis: **GENODETECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* EN VÍSCERAS DE VACUNOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**.

En razón a ello el suscrito ha cumplido con brindar el apoyo en la recolección de las muestras de vísceras que forman parte de la investigación antes descrita deseando, al mismo tiempo, haber contribuido en el cumplimiento de la investigación científica.

Así mismo expreso a Usted y sus colegas, que los alumnos que consideren el desarrollo de trabajos o tesis vinculadas a salubridad y otros, en vacunos, ovinos, caprinos y porcinos, el Camal Municipal N° 28 Imperial, ofrece el apoyo respectivo a los futuros profesionales, que egresen de su prestigiosa casa de estudios.

Cordialmente

MUNICIPALIDAD DISTRITAL DE IMPERIAL
CAMAL MUNICIPAL N° 28

FRANCISCO JOSE SIÑA HERPE
Médico Veterinario
R.C.M.V.P. N° 9514