

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**“APLICACIÓN DEL MÉTODO MOLECULAR DE
LA PCR EN LA DETECCIÓN DE
Mycobacterium tuberculosis EN LECHE
CRUDA DE VACA”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
DE ALIMENTOS**

Por: MARÍA ISABEL ACOSTA BENITES

Callao, Perú

2006

APLICACIÓN DEL MÉTODO MOLECULAR DE LA
PCR EN LA DETECCIÓN *Mycobacterium*
tuberculosis EN LECHE CRUDA DE VACA

DEDICATORIA

A Dios y a Mis Padres

AGRADECIMIENTOS

- A la Ingeniera Dániza Guerrero Alva por su apoyo y guía a lo largo de la elaboración del presente trabajo de tesis.
- A la Doctora Ivonne Guerrero Alva y al Dr. Roberto Mejía por su apoyo y guía a lo largo del desarrollo experimental de la tesis.
- A mis padres y hermanos por su constante apoyo y paciencia.
- Al señor Evaristo Balvino, quien amablemente permitió la toma de muestra de leche en su establo mostrándose colaborador en todo momento.

INDICE

ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN.....	13
I.- INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Importancia.....	16
1.2 El problema.....	17
1.3 Objetivos.....	18
1.3.1 Objetivo general.....	18
1.3.2 Objetivos específicos.....	18
II.- ANTECEDENTES.....	19
2.1 Antecedentes nacionales.....	19
2.2 Antecedentes internacionales.....	20
III.- REVISION DE LITERATURA.....	22
3.1 Definición de la leche.....	22
3.2 Análisis físico-químicos de leche.....	22
3.3 Microorganismos en la leche.....	25
3.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28

3.4.1 Descripción del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
3.4.2 Vías de infección de la tuberculosis.....	31
3.5 Concentración de bacilos tuberculosos en leche.....	31
3.6 Método de examen en leche.....	32
3.6.1 Examen de microscopio directo.....	32
3.6.2 Método de cultivo.....	33
3.6.3 Método de inoculación de animales.....	33
3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	34
3.7.1 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	34
3.7.1.1 Denaturación inicial.....	34
3.7.1.2 Ciclos de amplificación.....	35
3.7.1.3 Etapa I: Denaturación.....	35
3.7.1.4 Etapa II: Hibridación.....	36
3.7.1.5 Etapa III: Extensión.....	36
3.7.1.6 Extensión final.....	37
3.7.1.7 Detección de los productos de amplificación.....	40
3.7.2 Componentes de la PCR.....	41

3.7.2.1 Muestra de ADN.....	42
3.7.2.2 Iniciadores o primers.....	42
3.7.2.3 DNA Polimerasa.....	44
3.7.2.4 Deoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs).....	47
3.7.2.5 Sales.....	47
3.7.2.6 Buffer de Reacción.....	48
3.7.2.7 Agua.....	48
3.7.3 Temperaturas y tiempos de los ciclos.....	48
3.7.4 Contaminación en la PCR.....	49
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
4.1 Materiales.....	50
4.1.1 Material para la evaluación establo.....	50
4.1.2 Material para la evaluación del ganado.....	50
4.1.3 Material biológico.....	50
4.1.4 Materiales para el análisis fisico-químico.....	50
4.1.5 Material para el método de la PCR.....	51
4.2 Métodos.....	54

4.2.1 Población y muestra.....	54
4.2.2 Evaluación del establo.....	54
4.2.3 Evaluación del ganado vacuno.....	55
4.2.4 Análisis físico-químicos.....	55
4.2.5 Procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	59
V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	61
5.1 Resultados.....	61
5.1.1 Resultados de la evaluación del establo.....	61
5.1.2 Resultados de la evaluación del ganado vacuno.....	63
5.1.3 Resultados de las pruebas físico-químicas.....	66
5.1.4 Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	70
5.2 Discusiones.....	72
VI.- CONCLUSIONES.....	74
VII.- RECOMENDACIONES.....	76
VIII. - REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	77
IX.- ANEXO.....	82

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	TÍTULO	PÁG.
1	Tipos de enzimas termolábiles.....	45
2	Tipos de enzimas termoestables.....	45
3	Resultados de la evaluación del establo.....	64
4	Datos de las 10 vacas en estudio.....	65
5	Valores de Ph obtenidos de las 10 muestras.....	66
6	Resultado del análisis de varianza.....	66
7	Valores de Densidad obtenidos de las 10 muestras.....	67
8	Resultado del análisis de varianza.....	67
9	Valores de Acidez obtenidos de las 10 vacas.....	68
10	Resultado del análisis de varianza.....	68
11	Resultados de las pruebas Físico-químicas.....	69
12	Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	70
13	Análisis de ji-cuadrado.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	TÍTULO	PÁG.
1	Pasos básicos de la PCR.....	37
2	Termociclador para reacciones de PCR.....	38
3a	Amplificación exponencial del PCR.....	39
3b	Amplificación exponencial del PCR.....	39
4	Preparación del corrido electroforético.....	41

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

DNTP: Desoxinucleotido trifosfato

DATP: Desoxinucleotido adenin trifosfato

DCTP: Desoxinucleotido citosin trifosfato

DGTP: Desoxinucleotido guanosin trifosfato

DTTP: Desoxinucleotido tiamin trifosfato

EDTA: Etil-n-diamina ácido tetra-acético

PBS: Solución buffer fosfato

PK: Proteinasa K

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS: Duodecil sulfato de sodio

TNE: Tris-sodio-EDTA

RESUMEN

Con la finalidad de introducir un método rápido para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en leche cruda de vaca, se ensayó el Método Molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en 10 muestras de leche cruda de vaca tomadas de un establo del distrito de Puente Piedra. Previo al análisis molecular se realizaron las siguientes pruebas físico-químicas: determinación de pH, densidad, acidez, prueba del alcohol y del azul de metileno. Se realizó una evaluación del establo en donde se realizó la toma de muestras y una evaluación de las 10 vacas en estudio. Se determinó que las condiciones del establo pueden influir en la contaminación de la leche y en la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* que con los análisis físico-químicos de rutina que se realizan al ingreso a planta no son capaces de detectar este microorganismo. Al aplicar el método de la PCR en las 10 muestras, se observó en una de ellas (L1) la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, la cual representa el 10% de la población en estudio.

Palabras claves: PCR, ADN, *Mycobacterium tuberculosis*.

I. INTRODUCCIÓN

La leche, antes de su ordeño, si el animal está sano y bien alimentado, es estéril en el interior de la ubre. Sin embargo, después de su ordeño puede sufrir contaminación llegando a superar un nivel de 100,000 microorganismos por mililitro. Siendo las vacas, o los ganaderos y el personal que manipulen la leche, la fuente de contaminación más importante. En otras ocasiones, la contaminación viene producida por falta de higiene, poca limpieza de las vacas, del medio ambiente, de los sistemas de ordeño, etc. Cuando se encuentran microorganismos patógenos, el riesgo para la salud de los consumidores puede ser importante, debido a que se trata de un producto de amplio consumo, nutritivo y agradable para la mayoría de personas. El control sanitario de la leche y de sus productos derivados ha sido uno de los más estudiados y de los que más interés despierta por parte de los investigadores y de los consumidores. Es importante destacar que algunos microorganismos afectan al ganado vacuno y a otros animales productores de leche así como al hombre por contaminación. Entre estos patógenos llaman especialmente la atención los agentes responsables de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y de la brucelosis o fiebre de malta (*Brucella spp.*). Son patógenos claros, que han estado implicados, a lo largo de la historia, en procesos infecciosos de gran importancia.

El *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo que puede ser recto o algo curvado, con una longitud que oscila entre 1 y 4 micras, gram positivo, no esporulado, aerobio estricto, ácido alcohol resistente y de crecimiento lento. Pertenece al orden

como primers u oligos) con la misma secuencia que los extremos flanqueantes del ADN molde. Además, participan en la reacción la enzima Taq polimerasa, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), sales y un tampón.

I.1 IMPORTANCIA

El proyecto "Aplicación del Método Molecular de la PCR en la Detección *Mycobacterium tuberculosis* en Leche Cruda de Vaca" es importante porque:

- a) Permite la determinación de *Mycobacterium tuberculosis* en leche cruda empleando un método de alta sensibilidad y especificidad.
- b) Permite al control específico de *Mycobacterium tuberculosis* en leche cruda identificando a los animales portadores aparentemente sanos.
- c) La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) determina la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* a nivel molecular (ADN) en leche cruda.
- d) Posibilita la aplicación de procedimientos consecutivos para la desintegración de material orgánico, extracción de ADN, purificación del ácido nucleico y amplificación enzimática in vitro de un segmento del ADN del *Mycobacterium tuberculosis*.

Brinda un mejor control de calidad de la leche cruda, lo cual contribuye al beneficio del consumidor.

Actinomicetal, familia Mycobacteriaceae y género mycobacterium. El genoma del *Mycobacterium tuberculosis* está compuesto por 4,4 millones de pares de bases y contiene 4 mil genes con alta contenido de citosina y guanina. Cuando la leche ingresa a la planta de leche se realizan los siguientes análisis físico-químicos rutinarios para reconocer su calidad: prueba del azul de metileno y del alcohol, acidez, medida de pH, densidad, temperatura y grasa.

El empleo de leches crudas para la elaboración de quesos, se debe a que con la pasteurización se produce una eliminación de los microorganismos naturales (importantes para denominaciones de origen por los aromas y sabores que producen) y se induce a la desnaturalización de proteína propias de la leche, responsables de matices de sabor, que resultan muy agradables para el consumidor. Por esto se deben desarrollar estudios que permitan evaluar la presencia de microorganismos patógenos en la leche cruda.

Una nueva forma de determinar la presencia de estos microorganismos es utilizando el método molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es un método enzimático que permite la amplificación in vitro (aumento del número de copias) de una región específica de ADN. Al final de la reacción se obtienen millones de copias de la secuencia de interés.

Las bases teóricas de la PCR son conocidas. En la reacción intervienen tres segmentos de ADN: el segmento de doble cadena que queremos amplificar y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, los oligonucleótidos (conocidos también

I.2 EL PROBLEMA

La leche es uno de los pocos alimentos que puede ser considerado como equilibrado, independientemente de la edad de los consumidores. La leche puede utilizarse como ingrediente para muchos productos alimenticios debido a su alto valor nutritivo, el cual puede verse afectado con la existencia accidental de uno o varios tipos de contaminantes físicos, químicos y biológicos. La leche desde su producción está expuesta a contaminarse con un sin número de microorganismos. La cantidad de estos microorganismos esta en función de las prácticas de higiene y sanidad dadas del manejo, de la manipulación u ordeñadores, del lugar donde se realiza el ordeño (establo), de los envases, etc. La contaminación de la leche puede ser de dos orígenes: mamario o durante el curso de manipulaciones inadecuadas. Entre los microorganismos que proliferan la glándula mamaria de la vaca esta *Streptococcus Sp.*, *Staphylococcus Sp.*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*. Otro tipo de microorganismos que infecta a la glándula mamaria es el *Mycobacterium tuberculosis* que puede ocasionar tuberculosis nodular en el humano y también en el ganado vacuno, *Brucella abortus* y *Coxiella burnetti*, que contaminan la leche durante su producción. El bacilo tuberculoso de la variedad humana puede contaminar directamente la leche a partir de los ordeñadores u otros operarios y llegar al consumidor del mismo modo que otros gérmenes patógenos transmitidos por la leche a menos que se destruya a tiempo con un tratamiento térmico adecuado. El uso de cultivos convencionales puede realizar la detección del género *Mycobacterium* con una gran sensibilidad y especificidad pero en un tiempo mayor.

En consecuencia es fundamental detectar la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en leche cruda utilizando un método de alta sensibilidad como lo es la PCR a fin de evitar que el consumidor contraiga la enfermedad producida por este microorganismo.

Finalmente, la investigación efectuada quedó planteada bajo las siguientes interrogantes:

- ¿El grado de sensibilidad y el tiempo de duración que tiene el método molecular de la PCR justifica su aplicación?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* por el método molecular de la PCR en la leche cruda de vaca.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Correlacionar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* con las condiciones del establo.
- b) Correlacionar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* con las propiedades físico-químicas de la leche cruda recién ordeñada.

II. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES NACIONALES

En el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú; Sánchez, N. y Ayala, J. (1996) aplicaron la técnica de la PCR en la detección de patógenos. Reportaron la estandarización de las reacciones de amplificación para tres patógenos importantes en alimentos pesqueros: *Vibrium cholerae*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

Las pruebas fueron realizadas con cepas de los patógenos, que se inocularon en conchas de abanico y harina de pescado. Los ensayos de especificidad se realizaron con cepas de otros géneros. Las amplificaciones fueron realizadas en una parte de la toxina colérica de *Vibrium cholerae*, en una parte de la secuencia de una proteína de unión al ADN para *Salmonella* spp. y en parte del gen de la listeriolisina o para *Listeria monocytogenes*.

La mezcla de reacción para todos los casos fue preparada usando tris-HCl 10µM, KCl 50 µM, 0.1gr/100ml de albúmina de suero bovino, MgCl₂ 1.5mM, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µM de cada cebador específico para el patógeno, con 2 – 10% de lisado de bacteria y 1.5 µ de Taq. polimerasa, el volumen de reacción fue de 50 µl.

Las condiciones de desnaturalización, hibridación y extensión fueron diseñadas de acuerdo a los componentes de reacción.

chilenos. Y, al mismo tiempo, se mitigaría notoriamente su propagación entre los seres humanos.

Lee, Eun y Choi (1997), señalan que el método de la PCR puede detectar la producción de bacterias patógenas en alimentos con simplicidad, especificidad y velocidad se compararon diferentes medios y condicione de cultivo a fin de mejorar la sensibilidad y velocidad de los métodos de la PCR para la detección de *Vibrio vulnificus* en pequeños especies de pulpos. Los medios modificados de la infusión cerebro-corazón contenían 2% de NaCl y ajustado a un pH de 8,0 y 30°C fueron más efectivos para el enriquecimiento de las bacterias. Los procedimientos que afectaban la eficiencia de la extracción del ADN de la plantilla y la amplificación del ADN blanco fueron también optimizados por estos esfuerzos combinados, un procedimiento de PCR es capaz de detectar *Vibrio vulnificus* en bajas concentraciones, dentro de diez horas posteriores a su desarrollo.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Definición de leche

Según la NTP 202.08501, (1982) leche es el producto de la secreción mamaria, sin adición ni sustracción alguna y que ha sido obtenido mediante el ordeño. La designación de "leche", sin especificación de la especie productora, corresponde exclusivamente a la leche de vaca.

3.2 Análisis físico-químicos de la leche

Las determinaciones que se realizan comúnmente en el análisis químico de la leche, permiten: comprobar si sus valores responden a las características de composición genuina y a su vez poner al descubierto posibles alteraciones y adulteraciones. (Silva Jara, José 1980)

- **Determinación de densidad:** se puede determinar por pesado mediante el empleo del picnómetro, pero el de uso más generalizado es mediante los lactodensímetros. (Silva Jara, José 1980)

- **Determinación de Acidez titulable.-** La leche fresca tiene una acidez titulable equivalente a 13 hasta 20 mL de NaOH 0,1 N/100 mL (0,12 - 0,18 % ácido láctico) debido a su contenido de anhídrido carbónico, proteínas y algunos iones como fosfato, citrato, etc. Normalmente la leche no contiene ácido láctico; sin embargo, por acción bacteriana la lactosa sufre un proceso de fermentación formándose ácido láctico y otros componentes que aumentan la acidez titulable. De allí que esta

determinación representa una información valiosa sobre la calidad sanitaria del producto. (Universidad del Zulia-Maracaibo, 2003).

En una leche normal la acidez fluctúa entre 0.15-0.16% siendo su valor máximo de 0.18% expresada en ácido láctico. (Silva Jara, José 1980)

- **Prueba del alcohol (reacción de estabilidad proteica).**- Esta prueba sirve para determinar la facilidad de coagulación de leche expuesta al calor; si la leche se coagula en presencia de alcohol significa que no puede ser sometida a tratamiento térmico. La coagulación de la leche en esta prueba puede ser debida a la presencia de calostro, de leche ácida, leche de lactancia avanzada o leche con desbalance de sales; por ello no se puede depender de esta prueba para aceptar o rechazar la leche en una planta. (Revilla Aurelio, 1985)

- **Determinación pH.**- El pH normal de la leche fresca es de 6,5 - 6,7. Valores superiores generalmente se observan en leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican presencia de calostro o descomposición bacteriana.

La determinación del pH de la leche puede hacerse por un método colorimétrico utilizando indicadores, pero resulta inexacto por la opacidad de la leche que interfiere en la lectura del color solo da valores aproximados. El método más adecuado es el electrométrico empleando un electrodo de vidrio en combinación con un electrodo de referencia. El potencial se mide directamente en términos de pH en la escala de un potenciómetro calibrado con una solución buffer de pH conocido. (Universidad del Zulia-Maracaibo, 2003.)

-Ensayo de reductasa o del azul de metileno.- Esta prueba ha sido mal llamada "reductasa" cuando realmente esta enzima no interviene en ella. El verdadero principio es el siguiente: el potencial de óxido-reducción (Eh) de la leche fresca aireada es de +0,35 a +0,40 voltios (350 a 450 milivoltios), el cual se debe principalmente al contenido de oxígeno disuelto en el producto. Si por cualquier causa ese oxígeno es separado, el Eh disminuye. Esto ocurre cuando los microorganismos crecen en la leche y consumen el oxígeno. Si el número de microorganismo es muy elevado, el consumo de oxígeno será mayor y por consiguiente el Eh caerá rápidamente; si por el contrario, el número de microorganismos es pequeño, el Eh disminuirá lentamente.

El principio anterior encuentra aplicación en la determinación de la calidad sanitaria de la leche, utilizando como indicador de óxido-reducción al azul de metileno (APHA, 1972) este se presenta de color azul en su forma oxidada y es incoloro en su forma reducida (leucobase). En solución acuosa de pH 7,0 su oxidación es completa a Eh +0,075 voltios y su reducción es completa a Eh - 0,015 voltios.

En la leche, por existir un pH menor de 7 (6.5 - 6.7), la reducción completa del azul de metileno ocurre a un Eh más positivo, habiéndose demostrado que esto tiene lugar a un Eh entre +0,075 a +0,225. El tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora) bajo condiciones controladas es proporcional a la calidad sanitaria de la leche y aunque no es posible establecer con exactitud el número de microorganismos, es factible clasificar el

producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables, en base a los siguientes valores:

Buena a excelente.....	más de 8 horas
Regular a buena.....	6 - 8 horas
Aceptable.....	2 - 6 horas
Mala.....	Menos de 2 horas

(Universidad del Zulia-Maracaibo, 2003. Hipervínculo: <http://members.tripod.com.ve/tecnologia/Introduccion.htm>)

3.3 Microorganismos en la leche

El consumo de leche cruda representa el vehículo principal por el que los bacilos tuberculosos pasan del animal al hombre. Las vacas lecheras infectadas son con mucho el reservorio más importante de bacilos tuberculosos. La incidencia de tuberculosis en el hombre depende sobre todo de su presencia en el ganado vacuno y de la cantidad de leche cruda o insuficientemente tratada que consume la población. Los bacilos tuberculosos de la leche proceden unas veces del medio exterior contaminado (estiércol, polvo, etc.) y otras, las más, de las ubres afectadas; se ha observado, sin embargo, que los bacilos pueden pasar de la sangre a la leche a través de la ubre sin lesiones clínicas perceptibles. En términos generales puede decirse que el 4% aproximadamente de las vacas tuberculina-positivas eliminan bacilos tuberculosos en la leche, pero que sólo el 25% de los animales que excretan bacilos presenta lesiones evidentes de la ubre.

El bacilo tuberculoso puede contaminar directamente la leche a partir de los ordeñadores y otros operarios, y llegar al consumidor del mismo modo que tantos

otros gérmenes patógenos transmitidos por la leche, a menos que se destruya a tiempo con un tratamiento térmico adecuado. (Magariños H. 2001)

- Microorganismos derivados de la ubre.

La leche extraída asépticamente de ubres sanas no es estéril, pero solamente contiene un pequeño número de bacterias, que se conocen como "microorganismos de la ubre". Entre ellos predominan los micrococos y estreptococos, aunque también son bastantes frecuentes las bacterias corineformes incluyendo *Corynebacterium bovis*. Estas bacterias no suelen causar mastitis y no tienen un efecto importante en la calidad ni sobre el rendimiento lechero.

El contenido bacteriano de la leche recién ordeñada aumenta significativamente por la mastitis. Los microorganismos causantes entran en la ubre por los pezones a través del canal del pezón que está frecuentemente queratinizado y retiene restos de leche, aunque la queratina puede tener propiedades antibacterianas. El canal del pezón, especialmente la zona adyacente al orificio, puede ser colonizado por microorganismos como *Staphylococcus aureus*, que permanece durante muchas semanas, contaminando la leche cuando sale de la ubre pero sin penetrar en la cisterna de leche.

Muchos microorganismos pueden originar mastitis en circunstancias especiales, pero los más frecuentes y los que causan las mayores pérdidas económicas, son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*.

Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* son patógenos para el hombre aunque no está clara la patogenicidad de las cepas de *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* causantes de mastitis. Sin embargo, se ha demostrado que algunas cepas productoras de mastitis de *Staphylococcus aureus* producen enterotoxinas. Otros patógenos para el hombre causan mastitis ocasionalmente, entre ellos se incluyen *Streptococcus pyogenes*, agente etiológico de escarlatina y faringitis, *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia spp.* Y *Cryptococcus neoformans* así como los enteropatógenos *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*.

- Microorganismos que provienen del medio ambiente

La importancia del ambiente como fuente de microorganismos en la leche cruda varía considerablemente. Los alimentos y la paja que sirve de cama pueden ser fuente de microorganismos y en particular, son importantes en relación con los microorganismos termofílicos causantes de alteraciones. Las heces, que contaminan la paja de la cama, y por lo tanto las ubres y la piel del animal, son la fuente más importante de enteropatógenos, incluyendo *Salmonella* y *Campylobacter*.

- Equipos de ordeño

Los equipos ordeño son una importante fuente de microorganismos en la leche y la principal de bacterias psicrótrofas Gram negativas causantes de alteraciones (Varnam 1995).

- Personal

La contaminación directa de la leche por las manos de los empleados puede producirse durante el ordeño manual y mecánico ya que también es posible que la leche se contamine a través de las manos que tocan las superficies de las ordeñadoras que contactarán con la leche (Varnam 1995)

3.4 *Mycobacterium tuberculosis*

- El género *Mycobacterium* es adscrito taxonómicamente a las micobacterias, único de la familia Micobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomycetales. Aunque este orden comprende microorganismos diversos, las micobacterias y taxones emparentados con ellas se distinguen fácilmente del resto por su capacidad de sintetizar ácidos micólicos (N. Rastogi, E. Legrand & C. Sola N. Rastogi, E. Legrand & C. Sola, 2001)

3.4.1 Descripción de *Mycobacterium tuberculosis*.

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* está compuesto por 4.4 millones de pares de bases y contiene unos cuatro mil genes, lo que constituye un genoma de tamaño considerable, sólo menor al de *Escherichia coli* en la lista de genomas bacterianos hasta ahora conocidos. Se han identificado genes involucrados en regulación transcripcional que indican la capacidad de respuestas adaptadas a

condiciones cambiantes del medio donde la bacteria se encuentre. Una de las características sobresalientes del bacilo de Koch es la estructura de su pared que la protege de factores nocivos y que está compuesta por una mezcla compleja de lípidos, azúcares y proteínas (Mancilla, R. 1998)

Casal y col. (1999) mencionan que si bien las micobacterias en general pueden variar mucho en su morfología, desde cocoides pequeños a largos filamentos, *Mycobacterium tuberculosis* suele tener una morfología característica, bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada en frotis teñidos, y su tamaño suele ser de 1-4 micras de largo por 0,3-0,5 micras de ancho. Ocasionalmente, forma ramificaciones verdaderas que se observan en cultivos enriquecidos y en frotis de ganglios linfáticos caseosos. Son bacilos ácido-alcohol resistentes por lo que la tinción de Ziehl Neelsen es útil para la coloración de estos microorganismos obtenidos de muestras clínicas o de cultivo. Con esta tinción, los bacilos aparecen de color rojo brillante sobre un fondo azul. Los bacilos tuberculosos son difíciles de teñir con la tinción de Gram, y se observan como bacilos gram positivos con tinción irregular (Tinción Ziehl Neelsen),

Son bacilos no formadores de esporas, sin flagelos ni cápsula. La estructura celular de *Mycobacterium tuberculosis* consta de una gruesa pared, separada de la membrana celular por el espacio periplásmico, con cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glicolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cortas cadenas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente, hay otras 3 capas compuestas una por polímeros de arabinosa y

galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son ácidos grasos derivados, de gran importancia taxonómica en micobacterias) y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos y los micósidos que son al igual que el anterior glicolípidos. No difiere del resto de las bacterias en cuanto al citoplasma y el ADN nuclear. Las micobacterias son aerobios estrictos y no crecen en ausencia de oxígeno. La mayoría de la micobacterias, y entre ellas *Mycobacterium tuberculosis*, se desarrollan de forma adecuada en medios simples que contienen una fuente de carbono, una de nitrógeno e iones de metales esenciales entre ellos hierro y magnesio. Para el aislamiento primario de muestras clínicas, se requiere un medio más complejo que contenga una base de patata-huevo o una base de agar-suero. Los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento incluso en condiciones óptimas y requiere de 10 a 20 días de incubación a 37°C. Aunque la proliferación puede tener lugar a un pH que oscila entre 6 a 7.6, el pH óptimo de crecimiento es de 7. El tiempo de duplicación de *Mycobacterium tuberculosis* en condiciones óptimas de cultivo es de 15 a 18 horas, tardando varias semanas (1 a 3) en aparecer colonias visibles en medios de cultivo. Las micobacterias son muy resistentes a la desecación. El medio ambiente en el que se encuentran constituye un factor muy importante para su viabilidad. Por ejemplo, cuando se exponen a la luz solar directa, los bacilos tuberculosos de los cultivos son destruidos en 2 horas, pero si estos están presentes en el esputo, pueden permanecer viables durante periodos más largos. Las micobacterias son más resistentes a la desinfección con productos químicos que otros microorganismos no formadores de esporas, probablemente como consecuencia de su contenido en lípidos. Son sensibles al

calor húmedo y pueden ser destruidas por temperaturas de pasteurización (Casal y col. 1999).

3.4.2 Vías de infección de la tuberculosis

El bacilo de la tuberculosis puede penetrar en el cuerpo a través del sistema respiratorio, el tubo digestivo, el sistema genitourinario, la conjuntiva o la piel.

El sistema respiratorio es la vía más importante, y se puede demostrar la facilidad con que se produce la infección por esta vía tanto en condiciones naturales como controladas. Las partículas infecciosas que se encuentran en el aire inspirado se filtran y se depositan en las superficies mucosas de la nariz, la boca y la faringe. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, las partículas infecciosas que se encuentran en aerosoles y en el polvo son suficientemente pequeñas como para entrar en los alvéolos y adherirse a estas superficies mucosas. Después de depositarse, penetran en los tejidos para establecer un foco primario de infección; desde donde, los bacilos pueden diseminarse, primero a los ganglios linfáticos regionales y después a otros tejidos (Organización Panamericana de la Salud, 1963).

3.5 Concentración de bacilos tuberculosos en la leche

La leche de vacas infectadas contiene, por lo general relativamente pocos bacilos tuberculosos. Por lo tanto es necesario concentrar los microorganismos presentes por medio de la centrifugación o colocando la muestra en el refrigerador durante 24

horas por lo menos. La grasa (o crema) sube a la superficie mientras la mayor parte de las sustancias extrañas, tales como partículas de tierra, estiércol, leucocitos o fragmentos de tejidos que se pueden haber originado en úlceras tuberculosas tienden a asentarse. La mayoría de las bacterias incluyendo los bacilos tuberculosos, se encuentran en estas dos capas por eso es conveniente examinar estas porciones, ya sea por separado o en combinación (Organización Panamericana de la Salud, 1963)

3.6 Método de examen en leche

Los tres métodos empleados para descubrir bacilos tuberculosos en leche según la Organización Panamericana de la Salud (1963) son:

3.6.1 Examen de microscopio directo.- pueden reconocerse los bacilos tuberculosos por sus propiedades de ácido resistencia en los frotis coloreados de sedimentos de leche. Cuando hay pocos bacilos estos pueden pasar inadvertidos y aún cuando se descubran debe procederse con cautela en identificarlos como bacilos tuberculosos. Existen muchos microorganismos saprofiticos y ácido resistentes, algunos de los cuales pueden encontrarse en leche y son difíciles de distinguir de los bacilos tuberculosos por su morfología y capacidad colorante. Se pueden encontrar cuerpos extraños en la crema y confundirlos con bacilos ácido resistentes.

3.6.2 Método de cultivo.- el cultivo de bacilos tuberculosos; provenientes de productos lácteos se dificulta a menudo debido a la presencia de otras bacteria que crecen más rápidamente que las colonias de bacterias tuberculosas. Estos microorganismos no ácido resistentes pueden ser destruidos por varios métodos sin dañar a muchos de los bacilos tuberculosos presentes. Se recomienda tratar la muestra que se va a cultivar con NaOH seguido por neutralización antes del cultivo, o con NaPO_4 . Para el aislamiento primario de los bacilos tuberculosos deben usarse medios de cultivo que contengan yema de huevo, suero o ambos. Generalmente los medios de Lowenstein-Jensen, de Dorset, de Petragami u otros similares que se usan en trabajos de rutina son satisfactorios para el cultivo de bacterias tuberculosas.

3.6.3 Método de inoculación de animales.- la comprobación de bacilos tuberculosos por medio de la inoculación de animales de laboratorio es un método más seguro que el método del microscopio o el de cultivo, sobre todo si el número de microorganismos es pequeño o la muestra que se va a examinar contiene grandes números de microorganismos contaminantes centrifugar la leche puesto a la venta o las muestras obtenidas de vacas individualmente, combinar la crema y el sedimento, inyectar el material, por vía intraperitoneal en dos animales por lo menos.

3.7 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR se dio a conocer por Kary Mullis en 1983, él cual indica que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de DNA 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 DNA.

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5'→ 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

3.7.1 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

A continuación se describen las diferentes etapas de la PCR:

3.7.1.1 Denaturación inicial

Algunas veces con el fin de remover sustancias tales como proteasas o cloroformo en la muestra, se puede realizar un calentamiento previo a la reacción a 95°C por 10 minutos

3.7.1.2 Ciclos de amplificación

El número de ciclos en una Reacción en Cadena de Polimerasa, se determina tomando en cuenta la concentración del ADN a amplificar, los iniciadores, los deoxinucleótidos y la enzima. Un número de ciclos excesivo conllevaría al agotamiento de los primers y de los deoxinucleótidos, y sobre todo al peligro de la degradación del producto amplificado. Un número de ciclos reducidos para muestras con una concentración baja de ADN a amplificar dificulta la detección del producto amplificado. (Lozada 2002, citado en www.monografias.com).

4.7.1.3 Etapa I: Denaturación

Es la primera etapa del PCR y consiste en incubar el tubo de reacción a temperaturas altas (95°C aproximadamente) por un periodo de tiempo dependiente del tamaño del fragmento de ADN que se desea amplificar. El objetivo de esta etapa es el de obtener moléculas de ADN de una sola hebra para que los iniciadores o primers puedan unirse con sus secuencias complementarias (Montoya 1996).

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93°C-97° C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya (Lozada 2002, citado en www.monografias.com)

3.4.1.4 Etapa II: Hibridación

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la reducción de la temperatura entre 50°C y 65°C (Lozada, 2002 citado en www.monografias.com).

3.7.1.5 Etapa III: Extensión

La temperatura de extensión depende de la temperatura óptima para la ADN polimerasa. La enzima Taq Polimerasa, comúnmente usada, alcanza su máxima actividad a los 72° C. El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento que se desee amplificar (Montoya 1996)

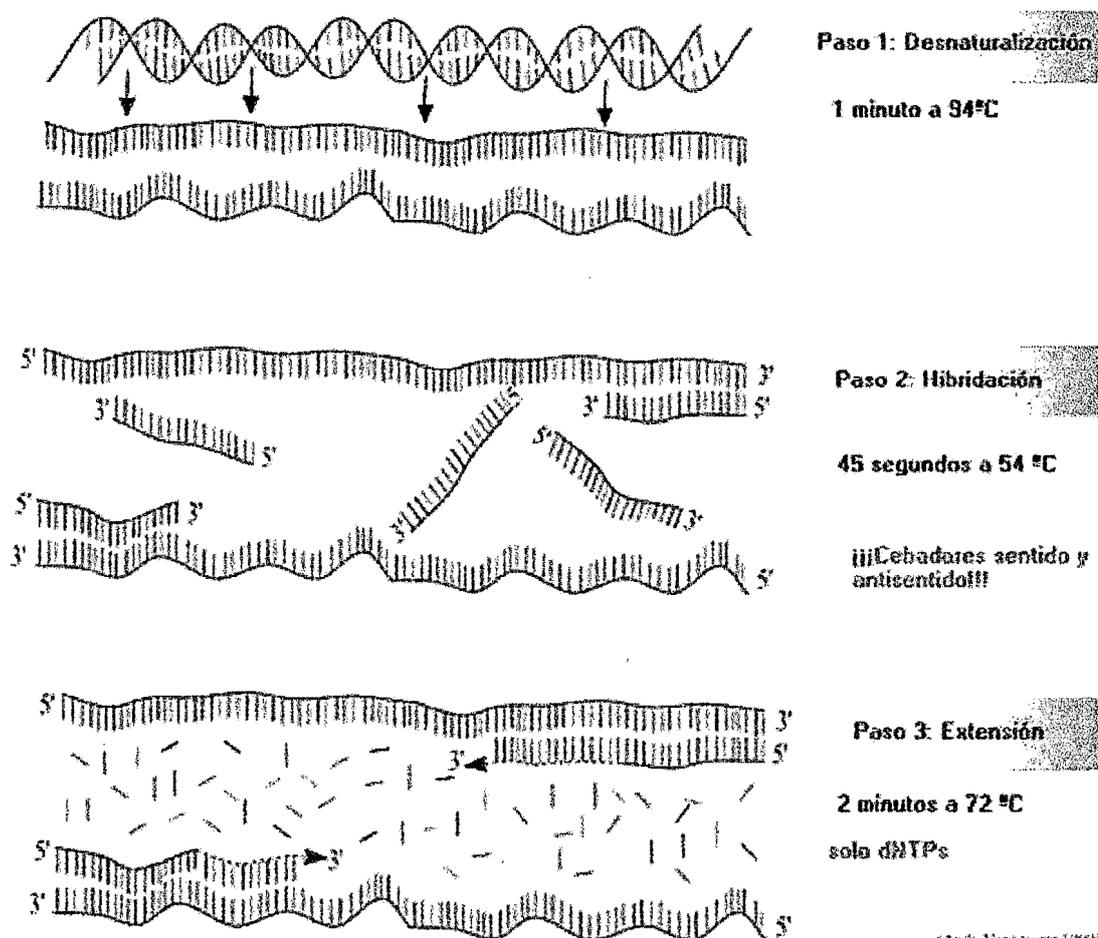
En la tercera etapa (elongación) se efectúa la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Todos estos pasos se pueden apreciar gráficamente en la **Figura 1**.

FIGURA 1: Pasos básicos de la PCR (Andy Vierstracte 1999, tomado de www.monografias.com)

PCR : Polymerase Chain Reaction

una técnica de laboratorio para la amplificación de cantidades pequeñas de un determinado segmento de DNA.

30-40 ciclos de 3 pasos:



(Andy Vierstracte 1999)

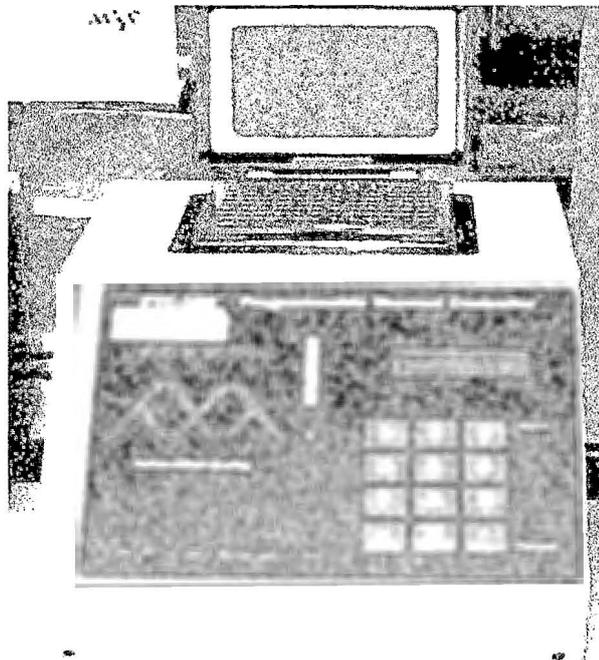
3.7.1.6 Extensión final

Después del último ciclo se da lugar a una etapa de extensión final de 72° C por 10 minutos, para permitir que los productos de amplificación parciales terminen de

polimerizarse y obtener una mayor cantidad de ADN. Luego de este periodo, las muestras pueden ser almacenadas a 4° C hasta su posterior análisis (Montoya 1996).

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador (Fig.2). Este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.

FIGURA 2: Termociclador para reacciones de PCR



En las figuras 3a y 3b, observamos que una vez completado el primer ciclo, disponemos de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo tenemos 4, al final del tercero 8...Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos

una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

FIGURA 3a: Amplificación exponencial del PCR (de Andy Vierstracte 2001)

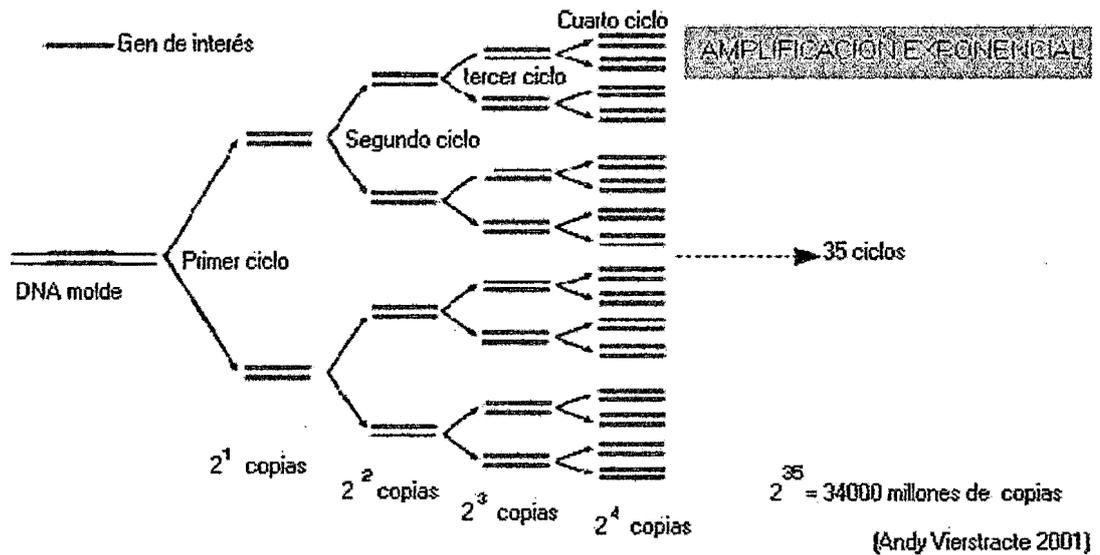
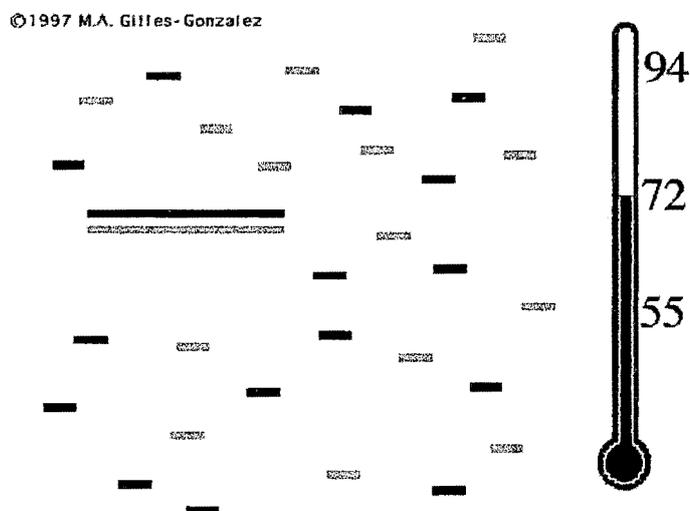


Figura 3b: Amplificación exponencial del PCR (M.E. Gilles-González 1997, tomado de www.monografias.com)



Es importante recalcar que los productos obtenidos tras la tercera etapa son de dos tipos: "producto corto" y "producto largo". El producto corto tiene una longitud perfectamente definida por los extremos 5' de los cebadores y contiene exactamente la secuencia que se desea amplificar. Es el fragmento que se almacena de manera exponencial durante la reacción. El producto largo es el que incorpora las cadenas de ADN originales de la muestra y cuyos extremos 3' no están definidos. Sin embargo, es importante aclarar que al final de la PCR, la cantidad del producto corto sintetizado es muy superior al producto largo, por lo que generalmente se desestima.

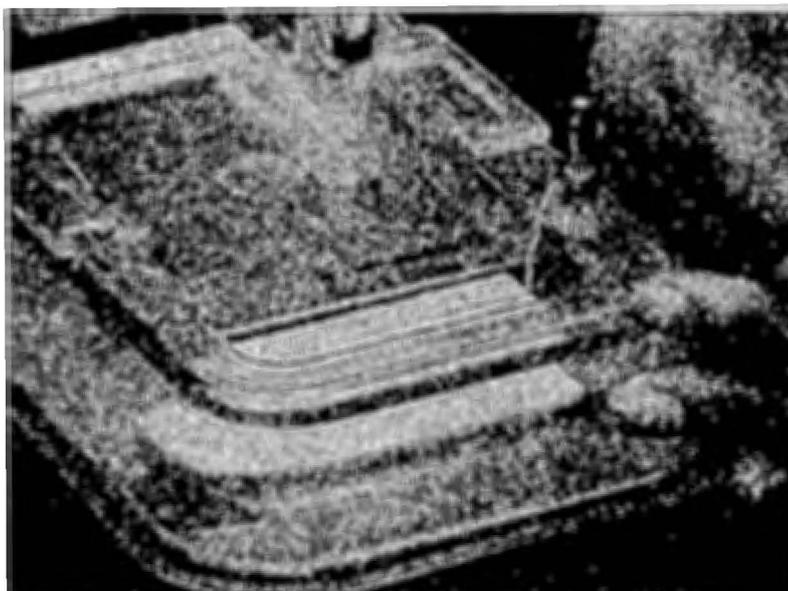
3.7.1.7 Detección de los productos de amplificación

El método más empleado de detección de los productos de amplificación es la electroforesis en geles de agarosa, mediante la cual se logra separar los fragmentos de ADN de acuerdo a su tamaño molecular y luego de una tinción del ADN con bromuro de etidio se logra visualizar las bandas de ADN en una cámara de luz ultravioleta. El bromuro de etidio es un agente que se intercala entre las hebras de ADN y que flúorese cuando incide sobre las radiaciones ultravioletas. Cuando el número de copias del producto amplificado se encuentre por debajo del límite de detección por bromuro de etidio se puede aumentar la sensibilidad en la detección del producto amplificado por medio de la técnica de hibridación (Montoya 1996).

La detección del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza normalmente mediante corrido electroforético (Fig. 5) dependiendo del tamaño de la

amplificación y la resolución que deseemos, se utilizará diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia o radioactividad (Lozada, 2002 citado en www.monografias.com)

FIGURA N°4: Preparación del corrido electroforético



En la actualidad se desarrollan métodos para poder cuantificar el producto de la PCR, visualizando in situ sobre tejidos (Cao, Y. y col. 2000) lo que hace prever un mayor uso de la técnica de la PCR.

3.7.2 Componentes de PCR

A continuación trataremos de profundizar en los componentes y parámetros más importantes para obtener una amplificación óptima.

3.7.2.1 Muestra de ADN

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción:

- Integridad del ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños del que queremos amplificar.
- Origen de la muestra y proceso de extracción: la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg en la disolución. Tampoco debe haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes, etc.; que inhiban la actividad de la polimerasa.
- Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN genómico de copia única se usan cantidades de 100ng a 500 ng. En el caso de zonas repetidas se puede reducir esta cantidad a 10ng a 50 ng. El mínimo oscila entre 10ng y 100 ng. y el máximo entre 400ng y 500 ng.

3.7.2.2 iniciadores o primers.

Los iniciadores o primers son oligonucleótidos pequeños (15 a 20 nucleótidos) de cadena simple que se diseñan de tal manera que sean complementarios a regiones que flanqueen al segmento de ADN que se desea amplificar. Cada primer es complementario al extremo 3' OH de una de las dos cadenas del ADN molde que se desea amplificar, de tal manera que el producto amplificado es de doble cadena.

La especificidad del PCR depende del diseño de los primers, se busca dirigir los primers a regiones presentes sólo en el organismo que se desea detectar. Asimismo los primers no deben ser complementarios entre sí, ni deben formar estructuras secundarias (Montoya, Y 1996).

Para la elección de los primers, existen una serie de normas que nos pueden ayudar, aunque hay que indicar también que existen programas de ordenador que nos facilitan esta tarea (DNAsis, Primer3, etc.).

- El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas / pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base.
- No seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria.
- Se recomienda que los extremos las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de iniciadores. Si esta existe entre los extremos 3' existe la posibilidad de que se formen dímeros de iniciadores.
- Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.
- La Temperatura de hibridación de los cebadores debe ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre los 45 y 60 ° C.
- Si el primer es menor a 20 pb, la temperatura de fusión (T_m), se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Siendo G, C, T y A el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos. La temperatura de hibridación debe ser aproximadamente 5° menor que la temperatura calculada.

3.7.2.3 DNA Polimerasa

Son enzimas que sintetizan ADN a partir de un iniciador y una hebra molde. Debido a los ciclos de altas temperaturas que se aplican a la muestra para denaturar la doble hebra de ADN, se necesita que la ADN Polimerasa para PCR sea termoestable, es decir que sea capaz de soportar altas temperaturas (Montoya, Y 1996)

Existen diferentes tipos de DNA polimerasa que llevan a cabo la replicación del ADN, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en:

- Termolábiles: T° óptima de 37-42° C. Se desnaturalizan con el calor. (Estas se señalan en la tabla N°1)

CUADRO N°1

TÍTULO: Tipos de enzimas termolábiles

TIPO	DNA polimerasa I (<i>E. coli</i>)	Fragmento Klenow de DNA polimerasa I (<i>E. coli</i>)	T4 DNA polimerasa (<i>E. coli</i>)	DNA polimerasa dependiente de RNA (retrovirus)
5'→3' polimerasa	Sí (baja)	Sí (baja)	Sí (medio)	Sí
5'→3' exonucleasa	Sí	No	No	Exorribonucleasa
3'→5' exonucleasa	Sí (baja)	Sí (baja)	Sí (alta)	Exorribonucleasa

· Termoestables: T° óptima de 74 °C. Resiste durante 40-50 minutos a 96°C. (Estas se señalan en la tabla N°2)

CUADRO N°2

TÍTULO: Tipos de enzimas termoestables

Tipo	Taq DNA polimeras (94 Kda)	Taq DNA polimeras (61 Kda)	Replicasa	Tth polimerasa
5'→3' polimerasa	Sí	Sí	Sí	Sí
5'→3' exonucleasa	Sí	No	?	?
3'→5' exonucleasa	No	No	No	?

Inicialmente se usó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *Escherichia coli* (Saiki y cols., 1985) la cual posee actividad 3'→5' exonucleasa que le proporciona la capacidad de cambiar el nucleótido que ha sido erróneamente incorporado. La importancia de esta actividad radica en que aumenta la fidelidad de la replicación del ADN original. Sin embargo, se trata de una enzima termolábil por lo que no soporta los ciclos y temperaturas utilizados en una PCR.

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa (Estivil, 1991). Es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. La Taq polimerasa ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador).

Como se observa en las Tablas anteriormente descritas, las polimerasas termoestables, como la Taq polimerasa, carecen de actividad 3'→5' exonucleasa, lo que las hace menos seguras a la hora de comparar las fidelidades. Por ello se debe intentar conseguir las mejores condiciones como por ejemplo:

- No usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de estos. Normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-30.
- La concentración de los deoxinucleótidos (dNTPs) debe ser igual para los 4 y debe ser la más baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de ADN necesaria.
- Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa.
- La concentración de Mg⁺⁺ en la reacción oscila entre 0,50 y 2,5 mM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad de la PCR.

3.7.2.4 Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Son esenciales para la reacción de síntesis del ADN. La concentración de cada uno de ellos en la mezcla de reacción debe ser equimolar (Montoya, Y. 1996).

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Los dNTPs pueden captar Mg^{++} , por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ello de manera independiente. Se aconseja que la concentración de Mg^{++} sea de 0.5 – 1.0 mM veces superior a la concentración de dNTPs (Lozada, 2002)

3.7.2.5 Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales.

- Cloruro potásico (KCl). Infiuye en la desnaturalización del ADN.

Elevadas concentraciones del ión K^+ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN.

Bajas concentraciones de K^+ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN.

- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Aumenta la temperatura de hibridación del DNA. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción.

Altas concentraciones de Mg^{++} disminuyen la especificidad de la reacción.

Bajas concentraciones de Mg^{++} aumentan la especificidad de la reacción

(Lozada, 2002)

3.7.2.6 Buffer de reacción

Por lo general está formado por: 10 mM tris-HCl (pH=8.4 a T° ambiente), 50 mM KCl, 0.1% w/v gelatina y 1.5 mM MgCl₂.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudan a aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción en cadena de la polimerasa. El dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN (Anderson, 1990). También se pueden usar detergentes como el tween 20, laureth 12 (0.1%) o Tritón x10, que permiten a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, seroalbúmina bovina (BSA), etc., aunque no son en ningún caso imprescindibles.

3.7.2.7 Agua

Un factor muy importante en PCR es la calidad del agua utilizada, debe ser de alta pureza, tridestilada, desionizada, libre de ADN contaminante o de ADNsas, todo lote de agua debe guardarse en alícuotas y debe probarse en un sistema de PCR que esté funcionando. (Montoya, Y 1996).

3.7.3 Temperaturas y tiempos de los ciclos

Como hemos explicado anteriormente la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza en tres etapas que constituyen un ciclo, que repite durante un número de 30 ciclos. El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes

en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos podemos optimizar la reacción.

Las primeras reacciones se realizaban manualmente cambiando continuamente los tubos de un baño María a otro de diferente temperatura (la temperatura de desnaturalización, la de hibridación y la de elongación). El proceso resultaba demasiado tedioso y era difícil alcanzar las temperaturas y los tiempos correctos, por lo que se desarrolló el termociclador que lo hacía de manera automática.

3.7.4 Contaminación en la PCR

La Reacción en cadena de la Polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no sea real. Vemos una de las mayores ventajas del método, se convierte a la vez en el principal inconveniente (Kwok e Higuchi, 1999)

Existen una serie de normas que ayudan a evitar las contaminaciones, como las que se citan a continuación

Lugar físico para realizar la PCR.

Uso de instrumental exclusivo para la PCR.

Utilización de reactivos y tubos estériles.

Uso de guantes por el manipulador.

Realización de controles blancos (se añade agua en lugar de ADN, no debe existir amplificación) (Lozada 2002).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Material para la evaluación del establo

- Se utilizó una ficha de evaluación del establo (Anexo A)

4.1.2 Material para la evaluación del ganado

- Se utilizaron fichas de identificación de las vacas (Anexo B)

4.1.3 Material biológico

Leche cruda de vaca, procedente del establo San Carlos, ubicado en la avenida Rosa Luz, distrito de Puente Piedra.

4.1.4 Materiales para el análisis físico-químico

- Probeta 500 ml.
- Pipetas 10 ml.
- Tubos de Ensayo.
- Beackers 100 ml.
- Tubos de Ensayo.
- Gradilla.
- Termómetro.
- Lactodensímetro QUEVENNE.
- Baño María.
- Hidróxido de sodio 0.1N.
- Azul de metileno.
- Fenolftaleína 1 %.

- Alcohol al 68%.
- Agua Destilada.

4.1.5 Materiales para el método de la PCR

- Frascos.
- Pipetas Pasteur
- Pipetas 10 ml.
- Espátulas.
- Tubos Eppendorf 1.5 ul, 0.2 ul
- Pizetas.
- Guantes quirúrgicos.
- Papel Parafilm.
- Gradillas.
- Dispensador.
- Guantes Térmicos.
- Papel filtro.
- Espátula de Madera.
- Agujas hipodérmicas.
- Mascarillas.
- Gorro.
- Guardapolvo.
- Baño María.
- Microcentrífuga 10 000 RPM.
- Micropipetas 0.1-10 ul, 40-200 ul, 200-1000 ul.

- Tips 0.1-10 ul, 40-200 ul, 200-1000 ul.
- Termociclador.
- Cámara Electroforética (100 voltios)
- Ultra congeladora (-36°C).
- Refrigeradora.
- Transiluminador.
- Lámpara de rayos ultravioleta.
- Estufa.
- Horno Microondas.
- Phmetro
- Timer.
- Portagel.
- Peine (pozos).
- Fuente de poder (110 V).
- Balanza.
- Ventilador.
- TNE (tris sodio EDTA, pH 8).
- PBS (Solución de buffer fosfato, pH 7.4).
- SDS 10% (Duodecil sulfato de sodio, pH 7.2).
- Proteinasa K (concentración de 20 mg/ml.).
- Cloroformo.
- Alcohol isoamilico.
- Fenol (pH 8).

- Acetato de sodio 3M (pH 6).
- Etanol absoluto helado.
- Enzima Taq. Polimerasa.
- Master Mix:
 - Agua desionizada.
 - Buffer 10x.
 - $MgCl_2$.
 - Cebadores (sentido y antisentido).
- DNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
- ADN muestra.
- Gel de Agarosa.
- Buffer de corrido.
 - TAE (tris acetato EDTA. pH 8.2).
 - Bromuro de etido.
 - Loading buffer.
- Marker.

4.2 Métodos

4.2.1 Población y muestra

- Población

La población estuvo constituida por 10 vacas aparentemente sanas de raza Holstein algunas de ellas con reacción positiva a la prueba de tuberculina (un año antes de realizarse el estudio), a las cuales se les extrajo las muestras de leche con el fin de investigar sus propiedades físico-químicas y la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

La toma de muestras de leche fue en horas de la tarde (de 2:30 pm. a 5:30 pm.), intervalo de tiempo en el cual se realiza el segundo ordeño en el establo estudio.

- Muestra

Fue materia de estudio del presente proyecto 10 muestras de leche cruda obtenida de 10 vacas aparentemente sanas. Se colectó 500 ml. de leche para el análisis físico-químico y 30 ml. para el método molecular de la PCR.

4.2.2 Evaluación del Establo:

Se evaluaron algunas características del establo tales como: instalaciones (manutención y buena distribución) (Anexo A)

4.2.3 Evaluación del Ganado Vacuno:

Se realizó mediante el uso de la ficha de calificación de las vacas (Anexo B).

4.2.4 Análisis físico-químicos

Toma de muestra

Se tomó aproximadamente 500 ml. de leche recién ordeñada (AOAC, 1981) las cuales fueron colectadas en envases de plástico. Las muestras fueron minuciosamente codificadas antes de ser sometidas el análisis físico-químico en el laboratorio de Investigación y Diagnóstico molecular MAMLAB.

Se realizaron las evaluaciones que comprenden los análisis rutinarios de la leche al ingreso de la planta tales como: pH, acidez, densidad, prueba del alcohol y la prueba del azul de metileno. La toma de muestra se realizó una vez y por cada muestra se realizó cinco repeticiones para el análisis físico-químico.

- Determinación del pH: (AOAC, 1982).

Procedimiento:

1. Preparar el potenciómetro de acuerdo con las instrucciones del aparato y haciendo la calibración con la solución buffer de pH conocido (4 y 7).
2. Ajustar el control de temperatura del aparato a la temperatura de la muestra.
3. Medir el pH y anotar los resultados

- **Determinación de la acidez titulable:** (NTP 202.09 Leche. Ensayo de acidez, 1981)

1. Se mide o pesa una cantidad adecuada (aproximadamente 10 cm³ ó 10g) de muestra en un recipiente conveniente y se diluye al doble su volumen con agua libre de CO₂.
2. Se añade 6 gotas de fenolftaleína y se titula con la solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta viraje a un color rosa persistente. La titulación debe hacerse contra un fondo blanco.

Cálculos:

Porcentaje de acidez de la leche se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$A = \frac{V \times N \times 0.0090}{q} \times 100$$

Donde:

A= Acidez en gramos de la solución de ácido láctico/100 cm³ o 100 g de leche.

V= Gasto de la solución 0.1 N de hidróxido de sodio en cm³.

N= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

0.0090= Factor de ácido láctico.

q= Cantidad de muestra, en peso.

Se informa la acidez de la muestra, expresándola en gramos de ácido láctico por 100g de leche.

- Determinación de densidad (AOAC 925.22, 1990)

- Enfriar la muestra asignada a una temperatura por debajo de 15°C y transferirla a un cilindro graduado de 500 ml. evitando la formación de burbujas.
- Introducir el lactodensímetro en la muestra dejándolo flotar libremente por 30 segundos, teniendo cuidado de que no se adhiera a las paredes del recipiente y de que no permanezcan burbujas en la superficie del líquido.
- Tomar la lectura lactométrica.
- En caso de que la lectura se tome a una temperatura diferente a la lectura de gradación del lactodensímetro deben hacerse las correcciones correspondientes utilizando el factor de conversión ± 0.002 por cada grado que la temperatura de medición difiera de la temperatura de calibración del termómetro.

- Determinación de la prueba del alcohol: (NTP 202.030 Leche. Ensayo Preliminares: Ebullición, Alcohol, Alizarol, 1979)

- Se colocan en un tubo de ensayo, partes iguales de leche y alcohol. Se mezclan, invirtiendo el tubo una o dos veces y sin agitar. Se observa si la leche coagula.

Se informa si la leche coagula o no.

- Prueba del azul de metileno: (NTP 202.014 Leche cruda. Ensayo de reductasa, 1998)

1. En un tubo de ensayo se introducen asépticamente 1 cm³ de leche y 1 cm³ de la solución de azul de metileno.

2. Se tapa el tubo de ensayo con el tapón de jebe y se mezcla invirtiendo el tubo 2 veces y poniéndolo luego en su posición normal.
3. Se sumerge el tubo en baño María (manteniendo a una temperatura de 37°C), hasta que el nivel del agua del baño María sobrepase en 1 cm. El nivel del contenido.
4. Se invierte cada 30 minutos el tubo hasta cuando no se note indicios de reducción poniéndolo luego en posición normal. Esta operación tiene por objeto obtener una mejor distribución microbiana y ya no se realiza en los tubos en que la reducción ha comenzado.
5. Se anota el tiempo transcurrido hasta la reducción completa del azul de metileno. (Se considera reducción completa cuando el total o por lo menos la 4/5 partes del líquido contenido en el tubo se encuentra de color blanco).
6. Como se utilizan dos tubos conteniendo el primero 10 cm³ de leche y 1cm³ de la solución de azul de metileno y el segundo 10 cm.³ de leche y 1 cm³ de agua destilada previamente calentada en baño María en ebullición para destruir la acción reductora natural de la leche.
7. La comparación del tubo que tiene la muestra en ensayo, con el primero de los tubos testigo, indicará el inicio de la reducción, y con el segundo el final de la misma.

4.2.5 Procedimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa: (Anexo C)

- Toma de muestra

Se tomó aproximadamente 30 ml. de leche recién ordeñada las cuales fueron colocadas en frascos de vidrio, esterilizados mediante exposición a rayos ultravioleta (uv) y manipulados en todo momento con guantes. Las muestras fueron minuciosamente codificadas antes de ser sometidas al estudio molecular en el laboratorio de Investigación y Diagnóstico molecular MAMLAB.

a.- Extracción y Purificación del ADN

El material biológico (leche cruda) fue sometido a digestión enzimática con una proteasa (proteínaza K), para la degradación de las proteínas, un detergente (SDS) al 20% y TNE los cuales degradan la parte lipídica de la membrana celular, luego fue llevado a una temperatura de 56°C durante una hora, posteriormente se purificó el ADN con una mezcla de fenol (200 ul) y cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción de 24:1), para la degradación de restos de proteínas y lípidos del núcleo que hubieran quedado; luego se precipitó el ADN con etanol absoluto (600 ul) y acetato de sodio 3M (60 ul) a -36°C durante dos horas (o toda la noche), finalmente se liofilizó y resuspendió con 100 ul de TE.

b.- Reacción en Cadena de la Polimerasa:

El ADN obtenido de cada muestra fue incorporado a una mezcla compuesta por acetato de sodio (para la precipitación del DNA) y etanol helado, luego se centrifugó y se procedió a eliminar el sobrenadante, y fue resuspendido en agua

destilada e incorporado a una mezcla de reacción la cual se preparó en un volumen de 50 ul, bajo las siguientes condiciones: 100 pmol de cada cebador, 200 mM de dNTP, 2.5 U de DNA polimerasa, 5 ul del ADN en estudio, buffer PCR 1X y 3mM de $MgCl_2$, para luego proceder a la amplificación del segmento de ADN en estudio del *Mycobacterium*.

La mezcla se sometió a 30 ciclos de amplificación constituidos por un paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante un minuto, hibridación de los cebadores a 55°C por un minuto y la extensión de los cebadores a 72°C por un minuto en un termociclador Applied Biosystem modelo 9700. En el estudio se empleó controles positivos, negativos y blancos conocidos, con cada muestra. El control positivo lo constituirá un cultivo positivo de bacilo tuberculoso.

c.- Electroforesis:

Se tomó una alícuota del producto de amplificación y de un marcador de peso molecular conocido los cuales fueron sometidos a un corrido en gel de agarosa al 4% y coloreados con bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis para detectar los productos de amplificación. Una banda correspondiente a un fragmento de 164 pares de bases (pb) fue observado con la ayuda de un transiluminador con luz ultravioleta para el producto de amplificación del segmento del gen del *Mycobacterium tuberculosis* en los casos positivos.

Se emplearon para cada caso controles positivos, negativos y blancos conocidos. El control positivo lo constituyó una muestra del bacilo tuberculoso.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados

5.1.1 Resultados de la evaluación del establo

El establo cuenta con una pequeña área para los becerros. Se observa que el establo no posee piso de cemento sino que está cubierto de tierra. Las horas de ordeño de las vacas en el establo San Carlos son: 4:00 a.m.-6:00 a.m. y 2:30 p.m.-5:00p.m.

Se observó que en el establo se encuentran también otros animales tales como: patos, gallos, gallinas, palomas y perros.

El ordeño es realizado por una sola persona, cuyos datos se citan a continuación en:

Datos del ordeñador

Nombre	Paulino Nava
Procedencia	Ayacucho
Presenta alguna enfermedad	No
Carnet de sanidad	Sí

La alimentación de las vacas, consiste de una mezcla de forraje, harina de pescado, soya, afrecho, pasto de algodón, maíz industrial, panca seca molida, chala y hojas de camote.

El establo con que se trabajó todas las muestras experimentales, tuvo un área aproximada de 1 hectárea. La evaluación del establo se realizó un total de 10 veces.

Se observó que el establo presentaba un área por animal mayor de 30 m², con mandil y el comedero tiene un espacio menor de 0.80 m. por animal, ausencia de sombra en el corral, ya sea techada o por arbolera. Los bebederos son cilindros de acero, el estado de conservación del corral es regular, piso y mandil seco con remoción diaria de estiércol. Los comederos limpios y los bebederos con agua limpia y fresca

SALA DE ORDEÑO:

El ordeño se realiza en el mismo lugar donde se alimenta al ganado vacuno, el cual presenta un mandil de cemento, con canaleta de desagüe, dispone de agua potable. El comedero en la sala de ordeño es de alimentación colectiva, libre de agentes contaminantes en su proximidad tales como: estiércol, aguas residuales, aguas estancadas, basura, etc., ya que se realiza una limpieza de la zona antes del ordeño y esto se verificó antes de cada toma de muestras, siendo un promedio de 10 veces cada verificación. Los pisos limpios con ligera producción de polvo.

UTENSILIOS:

Los utensilios utilizados en el ordeño se encuentran en buen estado y dispone de todos los accesorios necesarios para el ordeño tales como paños limpios, mandil para el ordeñador y recipiente para la recepción de la leche.

LECHERÍA O CASA DE LA LECHE

Los pisos, paredes y techos de la lechería o de la casa de la leche son lisos y sin grietas. La iluminación es buena. Tiene agua potable, pero no agua caliente.

El enfriamiento de la leche se realiza a menos de 10°C. La lechería presenta buena limpieza y libre de malos olores.

ORDEÑO Y MANIPULACIÓN DE LA LECHE:

Los manipuladores presentan una falta de higiene en especial de las manos. La leche luego de ser ordeñada es conducida después de pasar aproximadamente 30 minutos a la zona de acopio.

5.1.2 Resultados de la evaluación del ganado vacuno

Los datos recopilados de las 10 vacas se muestran en el cuadro N°3:

CUADRO N° 3: Resultados de la evaluación del ganado vacuno.

	Raza	Edad	Peso	Con aparición sana y ubres normales	Las vacas están dentro del control oficial para la erradicación de la tuberculosis y brucelosis	Limpieza general (Rastro general de suciedad , estiércol pegado, pelos suelos)	Limpieza de las ubres y áreas cercanas
L1	Holstein	6	450	Sí	Si están en el programa de erradicación pero aún tiene animales enfermos	En el 50% de las vacas	En el 50% de las vacas
L2	Holstein	5	500	Sí			
L3	Holstein	3	300	Sí			
L4	Holstein	4	400	Sí			
L5	Holstein	5	500	Sí			
L6	Holstein	7	500	Sí			
L7	Holstein	6	500	Sí			
L8	Holstein	6	450	Sí			
L9	Holstein	4	450	Sí			
L10	Holstein	5	350	Sí			

Fuente: Elaboración propia

A continuación se muestran datos adicionales de las 10 vacas en estudio, en el cuadro N° 4:

CUADRO N° 4: Datos de las 10 vacas en estudio

	Número de pariciones	Litros de leche producidos	Tipo de enfermedades padecidas	Tiene cuidado veterinario
L1	3	20	ninguna	Sí
L2	2	25	ninguna	Sí
L3	1	15	ninguna	Sí
L4	1	16	ninguna	Sí
L5	2	16	ninguna	Sí
L6	4	18	ninguna	Sí
L7	3	14	ninguna	Sí
L8	3	25	Antecedentes de tuberculina positiva	Sí
L9	1	18	Antecedentes de tuberculina positiva	Sí
L10	1	6	Antecedentes de tuberculina positiva	Sí

Fuente: Elaboración propia

5.1.3 Resultados de las pruebas físico-químicas

a.- **Determinación de pH:** En el cuadro N° 5 se muestran los valores de pH obtenidos de las 10 muestras de leche tomadas:

CUADRO N° 5: Valores de pH obtenidos de las 10 muestras

MUESTRAS DE LECHE									
L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (cuadro N° 6), los promedios de pH de las leches procedentes de las 10 muestras de leche evaluadas difieren estadísticamente con un nivel de significancia del 5% (Anexo N°D).

CUADRO N° 6: Resultados del análisis de varianza (Anexo N°G):

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Entre muestras	9	1.125	0.125	
Error	40	0	0	∞
Total	49	1.125		

Fuente: Elaboración propia

b.- Para la Densidad: En el cuadro N° 7 se muestran los valores de densidad obtenidos de las 10 muestras de leche tomadas:

CUADRO N° 7: Valores de Densidad obtenidos de las 10 muestras

MUESTRAS DE LECHE									
L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
1.046	1.032	1.037	1.034	1.030	1.030	1.030	1.030	1.029	1.029
1.042	1.032	1.037	1.032	1.032	1.032	1.030	1.029	1.029	1.029
1.046	1.030	1.037	1.034	1.030	1.030	1.030	1.030	1.028	1.029
1.048	1.034	1.037	1.034	1.028	1.030	1.030	1.031	1.031	1.029
1.048	1.032	1.037	1.036	1.030	1.028	1.030	1.030	1.029	1.029

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (cuadro N° H), los promedios entre densidad de las 10 muestras evaluadas no difieren estadísticamente con un nivel de significación del 5% (Anexo N°E).

CUADRO N° 8: Resultados del análisis de varianza (Anexo G)

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Entre muestras	9	$1.248 \cdot 10^{-3}$	$1.387 \cdot 10^{-4}$	
Error	40	0.0247	$6.175 \cdot 10^{-4}$	0.225
Total	49	0.0259		

Fuente: Elaboración propia

c.- Para la Prueba de acidez: En el cuadro N° 9 se muestran los valores de acidez obtenidos de las 10 muestras de leche tomadas:

CUADRO N° 9 Valores de acidez (gr. ácido láctico/100 gr. de muestra) obtenidos de las 10 muestras

MUESTRAS DE LECHE									
L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
0.162	0.180	0.180	0.162	0.180	0.180	0.180	0.180	0.153	0.180
0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.162	0.153	0.153	0.144	0.180
0.180	0.144	0.189	0.180	0.162	0.171	0.153	0.165	0.135	0.177
0.171	0.165	0.189	0.171	0.180	0.171	0.162	0.165	0.153	0.171
0.171	0.165	0.171	0.171	0.162	0.171	0.162	0.162	0.135	0.177

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza (cuadro N° 10), los promedios entre acidez de las 10 muestra difieren estadísticamente con un nivel de significancia del 5% (Anexo F).

CUADRO N° 10: Resultados del análisis de varianza (Anexo G):

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Entre muestras	9	50675	0.631	
Error	40	-50667	-0.142	-4.444
Total	49	$8 \cdot 10^{-3}$		

Fuente: Elaboración propia

- Para la prueba del alcohol: Se observó que las 10 muestras de leche (cada una con 5 repeticiones) no coagularon.

-Para la prueba del azul de metileno: Se observó la reducción del azul de metileno en las 10 muestras de leche (cada una con 5 repeticiones) cada 30 minutos.

- Los promedios de las pruebas de pH, densidad y acidez; así como de la prueba del alcohol y azul de metileno se muestran en el cuadro N° 11.

CUADRO N° 11: Resultados de las pruebas físico-químicas

Muestra	densidad (gr/cm ³)	Acidez (gr. de ácido láctico)	pH	Prueba del alcohol	Prueba del Azul de metileno
L0	Mín. 1.0296* Máx. 1.0340	Mín. 0.14* Máx. 0.18	6.5**	No coagulable*	Mín. 3 horas*
L1	1.046	0.170	6.5	No coagula	Muy buena
L2	1.032	0.165	6.5	No coagula	Muy buena
L3	1.037	0.180	6.5	No coagula	Muy buena
L4	1.034	0.171	6.5	No coagula	Muy buena
L5	1.030	0.171	6.5	No coagula	Buena
L6	1.030	0.171	6.5	No coagula	Buena
L7	1.030	0.162	6.1	No coagula	Aceptable
L8	1.030	0.165	6.5	No coagula	Buena
L9	1.029	0.144	6.5	No coagula	Muy buena
L10	1.029	0.177	6.5	No coagula	Aceptable

* Según Norma Técnica ITINTEC N° 202.001, 1991. Leche cruda requisitos.

**Según AOAC (1982)

5.1.4 Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

De las 10 muestras estudiadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se detectó un caso positivo para el ADN del *Mycobacterium tuberculosis* la cual correspondía a la muestra de leche proveniente de la vaca N°1, con codificación "L1", la cual no presentaba antecedentes de tuberculina positiva (Anexo H). Los resultados se consignan en el cuadro N°12:

CUADRO N° 12: Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Código de muestra	ADN- Mbt	Control +	Control -	Control blanco
L1	positivo	Positivo	Negativo	Negativo
L2	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L3	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L4	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L5	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L6	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L7	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L8	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L9	negativo	Positivo	Negativo	Negativo
L10	negativo	Positivo	Negativo	Negativo

Fuente: Elaboración propia

Esta etapa no contó con repeticiones por la alta sensibilidad de la prueba, que es del orden del 99,9 por ciento. Para evaluar si la población (ganado vacuno) proviene de una población normal se realizó una prueba de ji-cuadrado:

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - e_i)^2}{e_i}$$

Donde:

O_i : Observados.

e_i : Esperados.

CUADRO N° 13: Análisis de ji-cuadrado

Muestras de leche	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Observados (O_i)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Esperados (e_i)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

$X_c = 9$

$X(9)_{0.05} = 16.919$ (Anexo J)

Al aplicar la prueba de ji-cuadrado se determinó que las muestras tomadas siguen una distribución normal (Anexo I).

5.2 Discusión de Resultados

- El estudio realizado por el instituto de Investigación Paseo (2000), indica que los bacilos tuberculosos de la leche proceden unas veces del medio externo contaminado con estiércol, polvo, etc. y otras de los ordeñadores y operarios, lo cual contribuye a la contaminación del alimento que consume el ganado pasando luego a la leche. En el establo en estudio no poseía piso, lo cual contribuyó a la contaminación de la leche, además de encontrarse expuesto a todas las personas que llegaban a adquirir la leche; la contaminación podía proceder del personal que realizaba el ordeño ya que aunque contaba con carnet de sanidad, este no garantiza que el poseedor tenga tuberculosis.
- El valor normal de pH de la leche según Hayes 1992 es de 6.5, la cual es normal en 9 de las 10 muestras de leche tomadas, observándose que la muestra L7 tiene un valor de pH de 6.0, lo cual indica la presencia de otros microorganismos. Los valores de pH no difieren debido a que el tiempo en el que se realizó el análisis era el mismo para todas las muestras analizadas. La muestra L1 presenta un valor de pH normal, lo cual nos indica que esta prueba no es un indicador de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* ya que este no afectaría el valor de pH.
- Los valores de acidez de las 10 muestras de leche se encuentran en el rango establecido en la Norma Técnica (ITINTEC N° 202.001, 1991 Leche cruda

requisitos), lo cual indica que la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* no influye en el valor de acidez de la leche.

- La prueba del alcohol resultó negativa para todas las muestras de leche, lo cual indica que la leche es estable al calor, según MIF, 1964. Según Revilla, 1985, una reacción positiva depende de la presencia de calostro, leche ácida, leche de lactancia avanzada o leche con un desbalance de sales; y no precisamente a la presencia de microorganismos, lo cual hace que esta prueba tampoco sería sensible a la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*.
- En la prueba del azul de metileno se observó que las muestras L1, L2, L3, L4 y L5, tienen una calificación de muy buena; es decir, el azul de metileno no ha sido oxidado por la presencia de microorganismos, a pesar de que la muestra L1 presenta el *Mycobacterium tuberculosis*. Para el caso de la muestra L7, la cual tiene la calificación de aceptable, la reducción del azul de metileno se debe a la presencia de microorganismos capaces de reducir el azul de metileno y que están presentes como contaminantes, generalmente del tipo coliformes.

VI. CONCLUSIONES

- Las 10 muestras se tomaron en condiciones de esterilidad por lo cual se concluye que las condiciones del establo contribuyen a la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, ya que el ganado y su alimento se encuentran expuestos al contacto con diferentes personas que acuden al establo para adquirir leche y con otros animales que se encuentran en el lugar.
- La vaca con *Mycobacterium tuberculosis* no mostró síntomas visibles de presentar este patógeno, lo cual podría sugerir que es un animal portador.
- Los valores de pH, acidez y densidad se encuentran en los parámetros establecidos, por lo que se concluye que estos análisis rutinarios no dan indicios de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en leche cruda.
- Los valores de pH no varían debido a que los análisis de las 10 muestras y sus respectivas repeticiones se realizaron con un intervalo de tiempo muy corto (menos de un minuto).
- Se observa un incremento anormal de la densidad en la muestra de leche L1, esto se debe a la presencia de inmunoglobulina, las cuales se han generado por la propia enfermedad. Para el caso de las vacas cuyas muestras corresponden a L9 y L10 se observó que acusan una menor producción de leche y menor densidad (tanto en sólidos no grasos como sólidos grasos), esto se debe a que a estas vacas se les han venido suministrando antibióticos para el tratamiento de tuberculosis bovina.

- El ensayo del azul de metileno es una prueba que no permite determinar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* ya que la leche contaminada con este microorganismo tiene un calificativo de muy buena.
- La prueba del alcohol depende de muchos factores, lo cual hace que este análisis no indique la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* pues no afecta la estabilidad de la leche.
- El uso de PCR ayuda a tomar decisiones rápidas debido al diagnóstico confiable que realiza, lo cual permite controlar la infección y prevenir la diseminación de la enfermedad en el establo, en el menor tiempo posible.

VII. RECOMENDACIONES

Debido al nivel de peligrosidad del *Mycobacterium tuberculosis* y a la extremada sensibilidad del método de la PCR, se sugieren medidas de laboratorio encaminadas principalmente a evitar el contagio y la contaminación de la muestra

- El laboratorio debe estar adecuadamente ventilado e iluminado y contar con servicios adecuados, funcionales y operativos de agua, luz y gas.
- El personal debe usar mandiles cerrados por delante y de mangas largas, mientras ejecuta el trabajo.
- El cabello debe estar protegido con un gorro de uso obligatorio.
- No usar ningún tipo de joya mientras se está trabajando en el laboratorio, ya que estos pueden producir accidentes o contaminarse fácilmente con las muestras clínicas o cultivos.
- Por el tipo de riesgo (nivel tres de bioseguridad), se debe utilizar mascarillas y guantes estériles cuando se manipulan las muestras.
- Nunca se debe pipetear las muestras de líquidos infecciosos o tóxicos con la boca, se debe usar propipetas, pipetas automáticas o dispensadores.
- Uso de puntillas nuevas y estériles, para evitar la contaminación del material genético.
- Incluir un testigo positivo y uno negativo.
- Uso de agua bi-destilada, desionizada y / o ultrapura.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. A.O.A.C. 1965 Methods of Analysis of Association of Analytical Chemists. A.O.A.C., P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.
2. A.O.A.C. 1982 Methods of Analysis of Association of Analytical Chemists. A.O.A.C., P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.
3. APHA 1972 Standard Methods for the Examination of Dairy products. American Public Health Association. Washington D.C.
4. Barrera, Lucía 2000 La Tuberculosis vista con el lente de aproximación de la biología molecular. Simposio Internacional. Buenos Aires. Volumen 60 N°1. Hipervínculo: www.medicinabuenosaires.com/vol60-00/latuberculosis.htm
5. Casal, Manuel y col 1999 Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Hipervínculo: www.seimc.org/protocolos/cap9.htm - 101k
6. Dr. Carrillo Parodia, Carlos marzo 1995 Manual de Normas de Bioseguridad para Laboratorio de Diagnóstico de tuberculosis, regionales, intermedios y locales. Red Nacional de Laboratorio de salud. Laboratorio de referencia nacional de Mycobacterias. Instituto Nacional de Salud. Serie de normas Técnicas N° 8 Lima- Perú.
7. Hayes, George 1992 D. Manual de datos para Ingeniería de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza - España.
8. ILADIBA agosto 1997 Tuberculosis

Hipervínculo. www.iladiba.com.co/revista/1997/08/arfon.asp

9. INDECOPI 1991 Norma Técnica Nacional –Leche. Lima –Perú.
10. INDECOPI 1981 NTP 202.009-Leche. Ensayo de acidez. Lima- Perú
11. INDECOPI 1979 NTP 202.030-Leche. Ensayo Preliminares: Ebullición, Alcohol y Alizarol. Lima-Perú.
12. INDECOPI 1998 NTP 202.014-Leche y Producto lácteos. Leche cruda. Ensayo de la reductasa o ensayo del azul de metileno. Norma Técnica Nacional. Lima: Perú.
13. Juste, Ramón A. 2000 Aplicación de la Biología Molecular al Diagnóstico de Enfermedades, Tuberculosis y paratuberculosis. Departamento de Agricultura y pesca. Gobierno vasco-España. Hipervínculo:

www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/bovinos/especialista/articulo31.htm

14. Lozada, Méndez 2002 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Hipervínculo: www.monografias.com/trabajos11/tamau/tamau.shtml
15. Magariños, Harold 2001 Una guía para la pequeña y mediana empresa. Producción y Servicios Incorporados S.A Calzada Mateo Flores 5- 55. Zona 3 de Mixco Guatemala Centroamérica 95 Pág. Producción y Servicios Incorporados S.A Calzada Mateo Flores 5- 55. Zona 3 de Mixco Guatemala Centroamérica 95 Pág.

Hipervínculo:www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/leche_all.pdf

16. Mancilla, Raúl 1998 decifran el Código Genético del Bacilo de Koch.
Departamento de Inmunología.
17. Hipervínculo: www.biomedicas.unam.mx/htm/gaceta98/jun1.htm
18. Merrington M. 1943 Biometrika- Tables of percentage points of the inverted beta (F) distribution. Volumen N°3. Cambridge University Press
19. Montoto, Mariana 2003 Tuberculosis-enfermedad emergente. Bacteriología. Laboratorio del Hospital Alemán. Laboratorio de bacteriología TBC. Programa de control de TBC. Hospital E. Tomú. G
20. Montoya, P Isabel y col. 1996 Aplicación de PCR en el Diagnóstico Clínico. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú.
21. Mossel, B 1996 Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia S.A. Zaragoza-España.
22. Novella, Rosa Aznar desde: 2001, hasta: 2003 "Detección e identificación rápida de bacterias alterantes de alimentos por PCR." Consejo Superior de Investigación Científica. Instituto de Agroquímico y Tecnología de Alimentos (IATA).

Hipervínculo: www.iata.csic.es/iata/dbio/taxo/pacti.htf?pyi
23. Pagano, Marcelo 2003 Fundamentos de Bioestadística 2da edición. Editorial Thomson Learning. México D.F.
24. Revilla, Aurelio 1985 Tecnología de leche. Procesamiento, manufactura y análisis. San José: Costa Rica. Editorial IICA.

25. Robertis, Eduardo 1998 Biología Celular y Molecular. Editorial El ATENEO. Argentina. 77pg
26. Rodríguez, Jerez 2001 Alimentos de Origen Animal. España. Hipervínculo: www.consumaseguridad.com
27. Sánchez, Neyra 1996 Técnicas del PCR para la Detección de Patógenos en Productos Pesqueros. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Lima - Perú
28. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo rural 2000. Seguridad de Leche y Derivados. México.

Hipervínculo: www.portalalimentaria.com/producción_leche.htm

29. Silva Laura, Alvarado Omar, Martínez Juan Pablo Marzo 1999 Fitopatología: La PCR como Herramienta de diagnóstico en Virología Vegetal. Lima- Perú N° 1 Volumen N°34.
30. Silva Jara, José 1980 Manual de análisis Físico- químico para leche cruda. UNALM. Lima-Perú.
31. Varnam, Alan 1995 Leche y Productos Lácteos, tecnología y Microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
32. Wayne, Daniel 2002 Bioestadística base para el análisis de las Ciencias de la Salud. Editorial Limusa. México D.F.
33. Yeon Lee, Jee y col. 1997 Improving detection of *Vibrio vulnificus* in *Octopus variabilis* by PCR- Journal of food science. N°1. Volumen N°62
34. Zarraga, Ana M. y col 2000 La tercera: Ciencia y Salud. Chile. Hipervínculo:www.latercera.cl/diario/2000/05/11/t-11.20.3acys.crean.html

35. Universidad Nacional Agraria la Molina 1990 Calificación de Establos. Lima-Perú
36. Universidad de Zulia 2003 Introducción al control de calidad de la leche cruda-Guía práctica. Departamento de producción animal. Maracaibo. Hipervínculo:
<http://members.tripod.com.ve/tecnologia/Introduccion.htm>

IX. ANEXOS

ANEXO A: Ficha de calificación del establo

FICHA DE CALIFICACIÓN DEL ESTABLO
Nombre del Establo
Dirección:
Localidad:
Propietario:
Número total de vacas
Número de vacas en ordeño:
CORRALES:
1.- ÁREA POR ANIMAL MÍNIMA 30m ²
- Más de 30m ² por animal.
- Menos de 30m ² por animal
2.- COMEDERO Y MANDIL DE CEMENTO O SIMILAR
- Tiene mandil. El comedero con espacio mayor de 0.80m por animal.
- Tiene mandil. El comedero con espacio menor de 0.80m por animal.
- Tiene mandil y/o comedero de material no aparente o en mal Estado.
3.- ÁREA DE SOMBRA EN EL CORRAL, SEA TECHADA O POR ÁRBOLES 2m ² POR VACA MÍNIMO
- Tiene el área sombra apropiada.
- Tiene sombra escasa.
- No tiene sombra.
4.- BEBEDEROS DE CEMENTO O SIMILAR
- Tiene bebederos de cemento en buen Estado.
- Tiene bebederos pero no son de material aparente, o están en mal Estado.
- No tiene bebederos.

5.- ESTADO DE CONSERVACIÓN GENERAL DEL CORRAL

- Bueno.
- Regular.
- Malo.

6.- PISOS

- Seco o ligeramente húmedo.
- Pisos húmedos con áreas enfangadas o charcos

7.- MANDIL (Franja donde se paran las vacas frente al comedero)

- Mandil seco o ligeramente húmedo con remoción diaria de estiércol.
- Mandil sucio y húmedo, lleno de estiércol.

8.- COMEDEROS

- Limpios.
- Sucios y con presencia abundante de moscas.

9.- BEBEDEROS.

- Con agua limpia y fresca.
- Con algas y sedimentos.
- Sucia y antihigiénica.

SALA DE ORDEÑO:

10.- PISOS DE CEMENTO O SIMILAR.

- Tiene piso de cemento en buen estado.
- Tiene pisos de cemento en estado regular.
- No tiene pisos de cemento o están en mal Estado.

11.- CON CANALETA O SISTEMA DE DESAGÜE.

- Con canaleta en buen estado.
- Con canaleta en Estado regular.
- No tiene canaleta o están en mal Estado.

12.- DISPONIBILIDAD DE AGUA POTABLE.

- Tiene.
- No tiene.

13.- ESTADO DEL COMEDERO EN LA SALA DE ORDEÑO

- Pude ser de alimentación colectiva o individual, sí el sistema de nutrición lo

requiere.

14.- LIBRE DE AGENTES CONTAMINANTES EN SU PROXIMIDAD TALES COMO ESTIÉRCOL, AGUAS ESTANCADAS, CAMINOS POLVORIENTOS, BASURA, ETC.

15.- LIMPIEZA DE PISOS.

- Limpios.
- Con suciedades escasas del día anterior (estiércol, basura).
- Sucios con acumulación de estiércol o basura del día anterior.

16.- LIBRE DE POLVO DURANTE EL ORDEÑO.

- No se produce polvo.
- Se produce polvo.

UTENSILIOS:

17.- CONSTRUCCIÓN Y ESTADO DE LOS UTENSILIOS DE LECHERÍA, BALDES, PORONGOS, ETC.

- Utensilios en buen Estado.
- Utensilios abollados.
- Utensilios abollados y oxidados.
- Utensilios abollados, oxidados y difíciles de limpiar.

18.- DISPONIBILIDAD DE ACCESORIOS PARA EL ORDEÑO

- Uniformes de ordeñadores, tasa probadora o similar, juego de baldes por ordeñador, uno para la limpieza de ubres, otro con desinfectante y el tercero para los paños sucios de limpieza.
- Tiene todos los accesorios necesarios.
- Tiene algunos accesorios.
- No tiene accesorios.

LECHERÍA O CASA DE LA LECHE

19.- PISOS, PADERES Y TECHOS LISOS Y SIN GRIETAS.

- Lisos y sin grietas.
- Con rajaduras y grietas que requieren reparación.

20.- ILUMINACIÓN.

- Bueno.
- Regular.
- Mala.

21.- AGUA POTABLE

- Tiene.
- No tiene.

22.- AGUA CALIENTE.

- Tiene.
- No tiene.

23.- FACILIDADES PARA EL ENFRIAMIENTO.

- Enfriamiento a menos de 10°C.
- Enfriamiento a menos de 20°C.
- No se enfría.

24.- LIMPIEZA GENERAL DE LA LECHERÍA.

- Todo limpio.
- Piso limpio, lo demás sucio.
- Paredes, techos, ventanas y puertas limpias, pisos sucios.
- Pisos, paredes, techos, ventanas y otros sucios.

25.- LIBRE DE MALOS OLORES.

- Sin olores.
- Con malos olores.

ORDEÑO Y MANIPULACIÓN DE LA LECHE:

26.- HIGIENE DE LOS TRABAJADORES EN ESPECIAL DE LAS MANOS.

- Buen Estado de higiene.
- Estado regular de higiene.
- Mal Estado de higiene.

27.- CONDUCCIÓN DE LA LECHE A LA CASA DE LA LECHE INMEDIATAMENTE DESPUÉS DEL ORDEÑO.

- Si la leche permanece en la sala de ordeño expuesta a contaminación, mayor tiempo requerido.

28.- AUSENCIA DE IMPUREZAS VISIBLES EN LA LECHE DESPUÉS DEL ORDEÑO.

- Si la leche necesita de un cedazo para eliminar las impurezas visibles.

29.- ENFRIADA INMEDIATAMENTE DESPUÉS DEL ORDEÑO.

- Enfriada dentro de la primera hora que sigue al ordeño.
- Enfriada entre una a dos horas después del ordeño.
- Enfriada después de dos horas de terminado el ordeño.

30.- LA LECHE ES ENFRIADA Y ALMACENADA.

- A 4°C o menos.
- De 4°C a 10°C.
- De 10°C a 15°C.
- De 15°C a 20°C.

Fuente: UNALM 1990

ANEXO B: Ficha de calificación de las vacas

FICHA DE CALIFICACIÓN DE LAS VACAS

RAZA:

EDAD:

PESO:

1.- CON APARIENCIA SANA Y UBRES NORMALES.

- Si se encuentra un animal con síntomas claros de enfermedades (principalmente problemas de ubre) ó aislado.
- Si el animal no está aislado y permanece con el resto de vacas en producción.
- Si se encuentra más de dos animales visiblemente enfermos.

2.- LAS VACAS ESTÁN DENTRO DEL CONTROL OFICIAL PARA LA ERRADICACIÓN DE TUBERCULOSIS Y BRUCELOSIS.

- Si el establo tiene certificación oficial de estar libre de TBC y brucelosis.
- Si está en el programa de erradicación y ha eliminado sus animales enfermos, pero aún no tiene el certificado.
- Si está en el programa de erradicación, pero aún tiene animales enfermos.
- Si no está en el programa de erradicación.

3.- LIMPIEZA GENERAL (Rastro general de suciedad, estiércol pegado, pelos sueltos).

- En el 5% de las vacas.
- En el 10% de las vacas.
- En el 20% de las vacas.
- En el 50% de las vacas.

4.- LIMPIEZA DE LAS UBRES Y ÁREAS CERCANAS:

- En el 1% de las vacas.
- En el 5% de las vacas.
- En el 10% de las vacas.
- En el 20% de las vacas.
- En más del 50% de las vacas.

Fuente: Elaboración propia

ANEXO C

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO MOLECULAR DE LA PCR (Según el Laboratorio MAMLAB, en donde se desarrollo la tesis)

- 1.- Depositar 150 ul de PBS en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 2.- Tomar con una espátula de madera una alícuota de muestra y depositarla en el tubo eppendorf con PBS y mezclar.
- 3.- Centrifugar a menor velocidad (6000 rpm) por ocho minutos.
- 4.- Decantar.
- 5.- Adicionar 150 ul de TNE al botón celular y resuspenderlo.
- 6.-Adicionar 10 ul de SDS al 10 porciento.
- 7.- Adicionar 10 ul de proteinasa K (20 gr./ml).
- 8.- Incubar por una hora a 65°C.
- 9.- Adicionar 150 ul de fenol y mezclar por cinco minutos.
- 10.- Adicionar 150 ul de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 24:1) y mezclar por cuatro minutos.
- 11.- Centrifugar a 10 000 rpm por cinco minutos.
- 12.- Tomar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo de 1.5 ml
- 13.- Adicionar 150 ul de una mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 24:1) y mezclar por cinco minutos.
- 14.- Centrifugar a 10 000 rpm por cinco minutos.
- 15.- Tomar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo.
- 16.- Adicionar 50 ul. De acetato de sodio 3M y 600 ul de etanol helado y precipitar a -36°C por dos horas o toda la noche.
- 17.- Centrifugar a 10 000 rpm por veinte minutos.
- 18.- Eliminar el sobrenadante.

19.- Liofilizar al medio ambiente con papel parafilm por diez minutos con ventilador.

20.- Resuspender en 50 ul de agua desionizada.

21.- Llevar al termociclador programado para 30 ciclos.

ANEXO D:

Análisis ANVA para los datos de pH:

H₀: Los promedios de los valores de pH de las muestras evaluadas eran iguales

H₁: Al menos uno de los valores promedios de pH de las muestras de leche cruda evaluadas difiere de las otras.

	MUESTRAS DE LECHE									
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
R1	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
R2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
R3	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
R4	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
R5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5
Promedios	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5	6.5	6.5

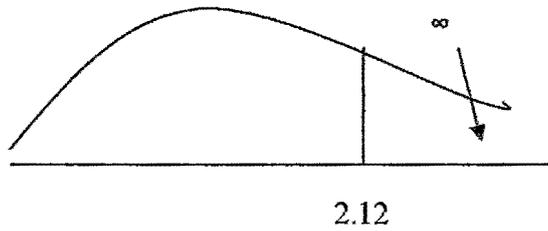
$$SCT = \frac{(6.5^2 + 6.5^2 + \dots + 6.5^2 + 6.5^2)}{50} - \frac{(322.5)^2}{50} = 1.125$$

$$SCC = \frac{(32.5^2 + 32.5^2 + \dots + 32.5^2 + 32.5^2)}{50} - \frac{(322.5)^2}{50} = 1.125$$

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Entre muestras	9	1.125	0.125	
Error	40	0	0	∞
Total	49	1.125		

$F(9,40) = 2,12$ con $\alpha = 0.05$

Conclusión: se concluye con un 95% de confianza que existe diferencia significativa entre los valores promedios de pH de las muestras de leche cruda analizadas.



ANEXO E:

Análisis ANVA para los datos de Densidad

H₀: Los promedios de los valores de densidad de las muestras evaluadas eran iguales

H₁: Al menos uno de los valores promedios de densidad de las muestras de leche cruda evaluadas difiere de las otras.

	MUESTRAS DE LECHE									
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
R1	1.046	1.032	1.037	1.034	1.030	1.030	1.030	1.030	1.029	1.029
R2	1.042	1.032	1.037	1.032	1.032	1.032	1.030	1.029	1.029	1.029
R3	1.046	1.030	1.037	1.034	1.030	1.030	1.030	1.030	1.028	1.029
R4	1.048	1.034	1.037	1.034	1.028	1.030	1.030	1.031	1.031	1.029
R5	1.048	1.032	1.037	1.036	1.030	1.028	1.030	1.030	1.029	1.029
Promedios	1.046	1.032	1.037	1.034	1.030	1.030	1.030	1.030	1.029	1.029

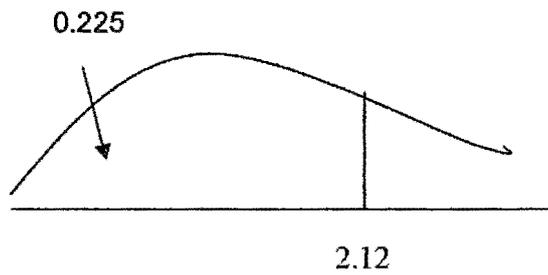
$$SCT = (1.046^2 + 1.042^2 + 1.046^2 + \dots + 1.029^2 + 1.029^2 + 1.029^2) - \frac{(51.639)^2}{50}$$

$$SCC = (5.23^2 + 5.16^2 + \dots + 5.146^2 + 5.145^2) - \frac{(51.639)^2}{50} = 0.72$$

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Entre muestras	9	1.248*10 ⁻³	1.387*10 ⁻⁴	
Error	40	0.0247	6.175*10 ⁻⁴	0.225
Total	49	0.0259		

$F(9,40) = 2,12$ con $\alpha = 0.05$

Conclusión: se concluye con un 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre los valores promedios de densidad de las muestras de leche cruda analizadas.



ANEXO F.

Análisis ANVA para los datos de Acidez

H₀: Los promedios de los valores de acidez de las muestras evaluadas eran iguales

H₁: Al menos uno de los valores promedios de acidez de las muestras de leche cruda evaluadas difiere de las otras.

	MUESTRAS DE LECHE									
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
R1	0.162	0.180	0.180	0.162	0.180	0.180	0.180	0.180	0.153	0.180
R2	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.162	0.153	0.153	0.144	0.180
R3	0.180	0.144	0.189	0.180	0.162	0.171	0.153	0.165	0.135	0.177
R4	0.171	0.165	0.189	0.171	0.180	0.171	0.162	0.165	0.153	0.171
R5	0.171	0.165	0.171	0.171	0.162	0.171	0.162	0.162	0.135	0.177
Promedios	0.170	0.165	0.180	0.171	0.171	0.171	0.162	0.165	0.144	0.177

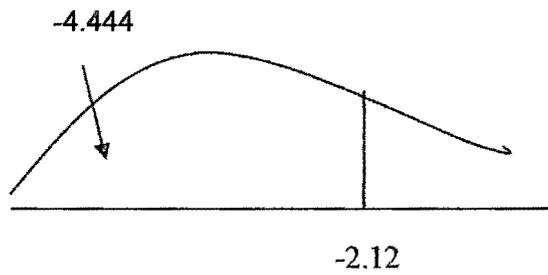
$$SCT = (0.162^2 + 0.171^2 + 0.180^2 + \dots + 0.177^2 + 0.171^2 + 0.177^2) - \frac{(8.405^2)}{50} = 5.667102$$

$$SCC = (0.855^2 + 0.825^2 + \dots + 0.72^2 + 0.885^2) - \frac{(8.045)^2}{50} = 5.67479$$

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	Fc
Entre muestras	9	50675	0.631	
Error	40	-50667	-0.142	-4.444
Total	49	8*10 ⁻³		

$F(9,40) = 2,12$ con $\alpha = 0.05$

Conclusión: se concluye con un 95% de confianza que existe diferencia significativa entre los valores promedios de acidez de las muestras de leche cruda analizadas.



ANEXO G: Puntos porcentuales de la distribución F

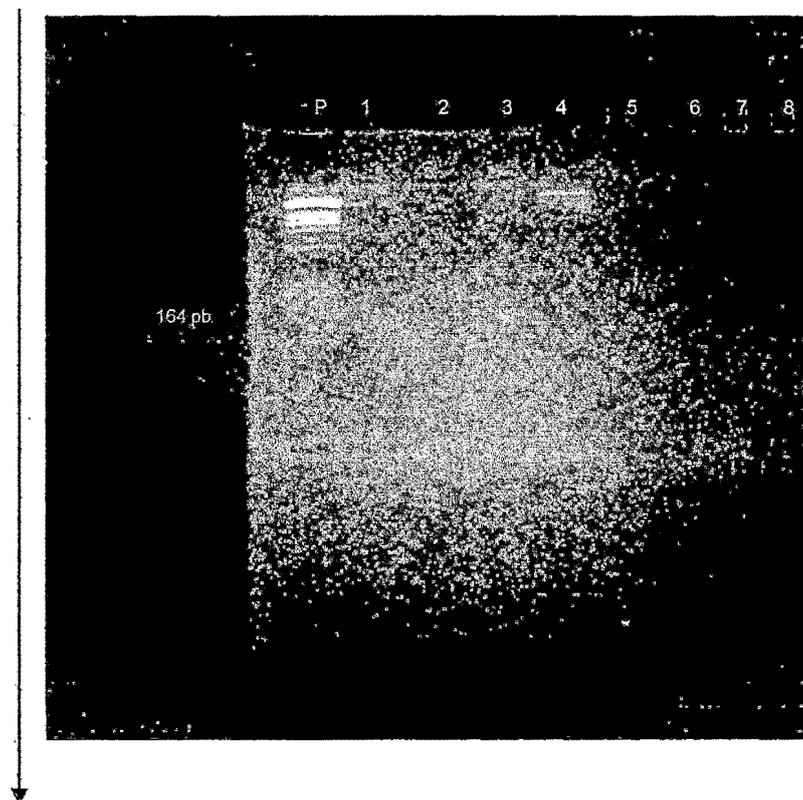
g.l. del denominador	g.l. del numerador									
	α	1	2	3	4	5	6	7	8	9
29	0.100	2.89	2.50	2.28	2.15	2.06	1.99	1.93	1.89	1.86
	0.050	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
	0.025	5.59	4.20	3.61	3.27	3.04	2.88	2.76	2.67	2.59
	0.010	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09
	0.005	9.23	6.40	5.28	4.66	4.26	3.98	3.77	3.61	3.48
30	0.100	2.88	2.49	2.28	2.14	2.05	1.98	1.93	1.88	1.85
	0.050	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
	0.025	5.57	4.18	3.59	3.25	3.03	2.87	2.75	2.65	2.57
	0.010	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07
	0.005	9.18	6.35	5.24	4.62	4.23	3.95	3.74	3.58	3.45
40	0.100	2.84	2.44	2.23	2.09	2.00	1.93	1.87	1.83	1.79
	0.050	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
	0.025	5.42	4.05	3.46	3.13	2.90	2.74	2.62	2.53	2.45
	0.010	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89
	0.005	8.83	6.07	4.98	4.37	3.99	3.71	3.51	3.35	3.22
60	0.100	2.79	2.39	2.18	2.04	1.95	1.87	1.82	1.77	1.74
	0.050	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
	0.025	5.29	3.93	3.34	3.01	2.79	2.63	2.51	2.41	2.33
	0.010	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72
	0.005	8.49	5.79	4.73	4.14	3.76	3.49	3.29	3.13	3.01
120	0.100	2.75	2.35	2.13	1.99	1.90	1.82	1.77	1.72	1.68
	0.050	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
	0.025	5.15	3.80	3.23	2.89	2.67	2.52	2.39	2.30	2.22
	0.010	6.85	4.79	3.95	3.48	3.17	2.96	2.79	2.66	2.56
	0.005	8.18	5.54	4.50	3.92	3.55	3.28	3.09	2.93	2.81
∞	0.100	2.71	2.30	2.08	1.94	1.85	1.77	1.72	1.67	1.63
	0.050	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88
	0.025	5.02	3.69	3.12	2.79	2.57	2.41	2.29	2.19	2.11
	0.010	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41
	0.005	7.88	5.30	4.28	3.72	3.35	3.09	2.90	2.74	2.62

Fuente: De: "Tabla of porcentaje points of the inverted beta (F) distribution.

ANEXO H: FOTOGRAFÍA DEL CORRIDO ELECTROFORÉTICO DE LAS MUESTRAS

Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa (4%) de los productos de amplificación obtenidos a partir de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Se observa una banda de amplificación de 164 pb en la muestra de leche (L1). La muestra fue corrida junto con un marcador de peso molecular. (P) marcador de peso molecular 164 pb.

Mayor peso
molecular



Menor peso
molecular

ANEXO I:

Análisis χ^2 para los datos de PCR

H_0 : La población de la cual fueron extraídas las muestras es normal

H_1 : La población de la cual fueron extraídas las muestras no es normal

Se tienen los siguientes datos:

Muestras de leche	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
Observados (O_i)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esperados (e_i)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

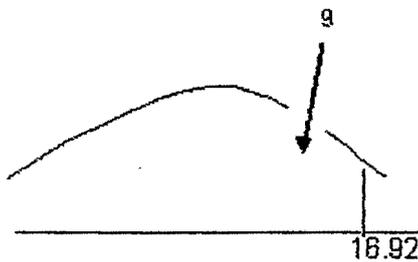
De la fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - e_i)^2}{e_i}$$

$$\text{Se tiene } \chi^2 = \frac{(1-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1} + \frac{(0-1)^2}{1}$$

$$= 9$$

El valor de $\chi^2_{(9),0.05}$ obtenido de la tabla es 16.92



Conclusión: Se concluye con un 95% de confianza que los datos provienen de una población normal (uniforme); esto quiere decir que la probabilidad de obtener un valor de ji-cuadrada de tamaño 9 cuando la hipótesis nula es verdadera es mayor que 5 en 1000

ANEXO J Porcentajes de distribución de la ji-cuadrada

Área de la sección superior					
d+	0.100	0.050	0.025	0.10	0.001
1	2.71	3.84	5.02	6.63	10.83
2	4.61	5.99	7.38	9.21	13.82
3	6.25	7.81	9.35	11.34	16.27
4	7.78	9.49	11.14	13.28	18.47
5	9.24	11.07	12.83	15.09	20.52
6	10.64	12.59	14.45	16.81	22.46
7	12.02	14.07	13.01	18.48	24.32
8	13.36	15.51	17.53	20.09	26.12
9	14.68	16.92	19.02	21.67	27.88
10	15.99	18.31	20.48	32.21	29.59
11	17.28	19.68	21.92	24.72	31.26
12	18.55	21.03	23.34	26.22	32.91
13	19.81	22.36	24.74	27.64	34.53
14	21.06	23.68	26.12	29.14	36.12
15	22.31	25.00	27.49	30.58	37.70
16	23.54	26.30	28.85	32.00	39.25
17	24.77	27.59	30.19	33.41	40.79
18	25.99	28.87	31.53	34.81	42.31
19	27.20	30.14	32.85	36.14	43.82
20	28.41	31.41	34.17	37.57	45.31
21	29.62	32.67	35.48	38.93	46.80
22	30.81	33.92	36.78	40.24	48.27
23	32.01	35.17	38.08	41.64	49.73
24	33.20	36.42	39.36	42.98	51.18
25	34.38	37.65	40.65	44.31	52.62

Fuente: Fundamentos de Bioestadística – Marcello Pagano