



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DESCRIPCIÓN EPIDEMIOLOGICA TRANSVERSAL DE TUBERCULOSIS,
PARATUBERCULOSIS Y FIEBRE Q, MEDIANTE UTILIZACIÓN DE
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, EN HACIENDA DE ALTA PRODUCCIÓN
LECHERA DEL SUBTRÓPICO, SANTO DOMINGO - ECUADOR.

AUTOR

DAVID ROBERT ALDÁS SILVA

AÑO

2020



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DESCRIPCIÓN EPIDEMIOLOGICA TRANSVERSAL DE TUBERCULOSIS,
PARATUBERCULOSIS Y FIEBRE Q, MEDIANTE UTILIZACIÓN DE
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, EN HACIENDA DE ALTA PRODUCCIÓN
LECHERA DEL SUBTRÓPICO, SANTO DOMINGO – ECUADOR.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista.

Profesor Guía

Ph.D. Marco Rafael Coral Almeida

Autor

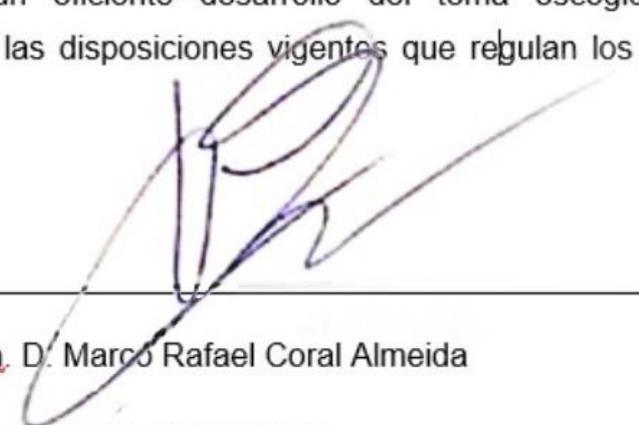
David Robert Aldás Silva

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Descripción epidemiológica transversal de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q, mediante utilización de pruebas diagnósticas, en hacienda de alta producción lechera del subtrópico, Santo Domingo – Ecuador, a través de reuniones periódicas con el estudiante David Robert Aldás Silva, en el 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



Ph. D. Marco Rafael Coral Almeida

Ci: 1714505821

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Descripción epidemiológica transversal de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q, mediante utilización de pruebas diagnósticas, en hacienda de alta producción lechera del subtrópico, Santo Domingo – Ecuador, del alumno David Robert Aldás Silva, en el 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

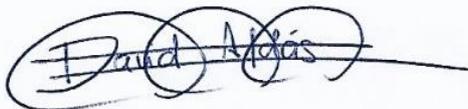


MVZ Olga Alexandra Angulo Cruz

CI: 1714976295

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mí autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "David Aldás", with a horizontal line extending to the right from the end of the signature.

David Robert Aldás Silva

C.I. 1724871007

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios. A mis padres quienes han hecho un inmenso sacrificio para que yo pueda emprender el vuelo hacia mi vida profesional. Por enseñarme los valores más importantes para ser un buen Médico Veterinario, pero, sobre todo, para ser una gran persona.

Agradezco al Dr. Jacobus H. de Waard por ser un gran pilar en el proyecto realizado y ser él quien guíe el trabajo.

Al Dr. Marco Coral quien fue un apoyo y siempre confió en mí para la realización del proyecto.

Al Dr. Darwin Changoluiza quien me impartió el conocimiento necesario para el manejo y la manipulación correcta de los animales que fueron parte de la investigación. Por su paciencia, dedicación y entrega para guiarme a lo largo de este camino.

A todos ustedes quienes leerán este escrito y me hacen honroso por ello.

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a mis padres que siempre me apoyaron en este duro camino.

Al Dr. Iván Lucero que fue quien me permitió iniciar mis prácticas preprofesionales y me hizo partícipe de ello. Fue quien me dio a conocer la esencia de la Medicina Veterinaria.

RESUMEN

El presente trabajo está orientado a una descripción epidemiológica, en donde se identificó la prevalencia de tuberculosis bovina (TBB), paratuberculosis (PTB) y fiebre Q en un predio de alta producción lechera en el subtrópico, Santo Domingo – Ecuador. Se realizó un muestreo sanguíneo en 1130 animales que correspondían a la totalidad del hato, participaron animales de tres razas, Sahiwal, Jersey y Gyr.

Se efectuaron pruebas diagnósticas para todas las enfermedades en cuestión, tanto de campo como confirmatorias de laboratorio. En campo, para tuberculosis, se implementó tuberculinización, pruebas cervicales simples y comparativas, y para confirmar en laboratorio, interferón gamma. Respecto a paratuberculosis se realizaron pruebas cervicales comparativas en campo y en laboratorio ELISA indirecto. Finalmente, para fiebre Q en campo, únicamente se extrajo sangre y en laboratorio se ejecutó ELISA indirecto. Respecto al análisis de datos se emplearon pruebas estadísticas como Regresión Logística, ecuación de Rogan y Gladen (para obtener la prevalencia real), tablas de contingencia, Chi- cuadrado y prueba de Wald. Se obtuvo una prevalencia de 0,97% para tuberculosis, 5,2% para paratuberculosis y 41,8% para fiebre Q.

Es importante mencionar que ninguna de las enfermedades en este predio, se asociaron a un factor demográfico específico, pues se encontraban distribuidas uniformemente en todas las categorías de edad, raza, etapa reproductiva, veces inseminada y/o producción de leche.

Este es el primer estudio en el país en donde se lleva a cabo la determinación de prevalencia para TBB, PTB y fiebre Q simultáneamente dentro de la totalidad de un mismo hato y es uno de los pocos en donde se establecen datos relevantes de fiebre Q en Ecuador.

Por otra parte, se sugiere que, en futuros estudios, se determine la prevalencia de estas enfermedades en zonas aledañas para establecer comparaciones congruentes y ejecutar posibles medidas de eliminación de estas enfermedades, las cuales representan un problema para Salud Pública y para la producción bovina.

ABSTRACT

The present work is oriented to an epidemiological description, where the prevalence of bovine tuberculosis (TBB), paratuberculosis (PTB) and Q fever was identified in a high milk production site in the subtropics, Santo Domingo - Ecuador. Blood sampling was performed on 1130 animals that corresponded to the entire herd, with three breed animals, Sahiwal, Jersey and Gyr.

Diagnostic tests were performed for all the diseases, both field and laboratory confirmatory. In the field, for tuberculosis, tuberculinization, simple and comparative cervical tests were implemented, and to confirm in the laboratory, interferon gamma. Regarding paratuberculosis, comparative cervical tests were performed in the field and in the indirect ELISA laboratory. Finally, for Q fever in field, only blood was drawn and indirect ELISA was performed in the laboratory.

Regarding the data analysis, statistical tests such as Logistic Regression, Rogan and Gladen equation (to obtain the real prevalence), contingency tables, Chi-square and Wald test were used. A prevalence of 0.97% for tuberculosis, 5.2% for paratuberculosis and 41.8% for Q fever was obtained.

It is important to mention that none of the diseases on this site were associated with a specific demographic factor, since they were distributed uniformly in all age groups, race, reproductive stage, sometimes inseminated and / or milk production.

This is the first study in the country where the prevalence determination for TBB, PTB and Q fever is carried out simultaneously within the entire same herd and is one of the few where relevant data of Q fever are established in Ecuador.

On the other hand, it is suggested that, in future studies, the prevalence of these diseases in surrounding areas be determined to establish congruent comparisons and execute possible measures to eliminate these diseases, which represent a problem for Public Health and for bovine production

ÍNDICE

Capítulo I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1. Objetivo General:	2
1.1.2. Objetivos Específicos:	2
1.2 Pregunta de investigación.....	3
Capítulo II: Marco teórico	3
2.1. Tuberculosis	3
2.1.2. Infección y contagio.....	4
2.1.3. Consecuencias de la enfermedad	4
2.1.4. Diagnóstico de la enfermedad.....	5
2.1.5. La tuberculosis en el mundo.....	3
2.2. Paratuberculosis	7
2.2.2. La paratuberculosis en el mundo	7
2.2.3. Infección y contagio.....	8
2.2.4. Consecuencias de la enfermedad	9
2.2.5. Diagnóstico de la enfermedad.....	9
2.3. Fiebre Q.....	10
2.3.1. La fiebre Q en el mundo	10
2.3.2. Infección y contagio.....	10
2.3.3. Consecuencias de la enfermedad	11
2.3.4. Diagnóstico de la enfermedad.....	11
2.4. Pruebas estadísticas	11
2.4.1. Chi-cuadrado.....	11
2.4.2. Ecuación de Rogan Gladen.....	12
2.4.3. Regresión Logística.....	12
2.4.4. Prueba de Wald.....	13
Capítulo III. Materiales y métodos.....	14
3.1. Ubicación	14
3.2. Población y muestra	14
3.3. Materiales:	14

3.3.1. De campo	14
3.3.2. De laboratorio	15
3.3.3. De Oficina.....	15
3.4. Variables.....	16
3.5. Metodología	16
3.5.1. Levantamiento de datos e información.....	16
3.5.2. Toma de muestras	17
3.5.3. Tuberculinización	18
3.5.4. Análisis de las muestras.....	19
3.5.4. Paratuberculosis	22
3.6. Diseño experimental	24
3.6.1. Descripción del estudio	24
Capítulo IV. Resultados y Discusión	25
4.1. Resultados.....	25
4.1.2. Tuberculosis.....	25
4.1.3. Paratuberculosis.....	25
4.1.4. Fiebre Q	26
4.2. Discusión	27
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones	31
5.1. Conclusiones	31
5.2. Recomendaciones	32
5.3. Referencias.....	34

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

La tuberculosis, paratuberculosis y Fiebre Q son afecciones no estudiadas a detalle y han sido segmentadas en grupos diferentes en el subtrópico del Ecuador, por lo que aún hay trabajo para definir el verdadero impacto de estas enfermedades a nivel de producción y de Salud Pública. Son enfermedades desconocidas por la gran mayoría de los habitantes del país. Por tal motivo, cuando un animal o persona adquieren estos patógenos en su organismo, los signos y síntomas son atribuidos a otras causas u otras patologías (Rojas, 2012), generándose así el principal problema respecto a Epidemiología y Salud Pública.

Existen limitadas fuentes de información de estas enfermedades en zonas subtropicales del país, entre las más relevantes se encuentran: una investigación realizada por estudiantes de la Universidad San Francisco de Quito en donde determinan la presencia de *Coxiella brunetti* (Fiebre Q) en leche de bovinos domésticos del país. En este estudio se utilizó la técnica de PCR para determinar la presencia de esta bacteria en varias provincias del país, dando un resultado positivo ante las mismas. Se obtuvo un total de 37% de muestras positivas de un total de 110 analizadas. Sin embargo, no especifica prevalencia y se enfoca más en la utilidad de la técnica PCR (Rojas, 2012).

Acerca de la tuberculosis bovina, en el país no se encuentra documentada de manera clara y precisa debido a diversas razones como la ausencia de registros de casos positivos, usos limitados de pruebas diagnósticas e inspección veterinaria insuficiente en los mataderos. La tuberculosis bovina es una enfermedad de reporte obligatorio por lo tanto es considerada como trascendental y de gran importancia en el medio (Proaño-Pérez, Benítez-Ortiz, Portaels, Rigouts, & Linden, n.d.). La prevalencia de esta enfermedad puede verse influenciada por factores como el tipo y tamaño del rebaño, dimensiones y distribución de la hacienda, tipo de industria ganadera y el fin zootécnico ya sea para productos lácteos o cárnicos (Proaño-Pérez, 2011).

Por otra parte, el estudio más relevante de paratuberculosis se realizó en 30 fincas de Azuay, donde se analizaron 496 animales y se determinó resultados positivos en el 5,24% de los animales. Así mismo, se efectuó un análisis serológico de 384 vacas en periodo de lactancia ubicadas en el cantón Mejía,

dando como resultado una prevalencia de 7,29%. Finalmente, en un análisis de hatos lecheros al sur del país, se determinó una prevalencia de 6%. No obstante, no existen estudios acerca de la epidemiología de paratuberculosis en hatos ganaderos a nivel del subtrópico (Tixi, 2017).

Así pues, en base a la documentación preexistente del país, se busca complementar la información de estudios relevantes en cuanto a la prevalencia de las tres enfermedades en cuestión. Siendo el objetivo principal, levantar una línea base para poder utilizarla en el desarrollo de un mejor estatus sanitario del predio.

Para el trabajo se efectuaron pruebas de campo como tuberculinización, pruebas cervicales simples y comparativas y extracción de sangre de la vena coccígea. Posteriormente cada una de las muestras se analizaron mediante diferentes pruebas de laboratorio, entre ellas ELISA indirecto, ELISA “sándwich” e Interferón gamma. Para corroborar con los resultados obtenidos, se corrieron pruebas estadísticas como Chi-cuadrado, ecuación de Rogan & Gladden, tablas de contingencia, prueba de Wald y prevalencias reales y aparentes.

A continuación, se explicará detalladamente y más a profundidad los procedimientos y metodologías con las que se obtuvieron los resultados de este estudio.

1.1 Objetivos

1.1.1. Objetivo General:

Describir la prevalencia de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q en una hacienda alta producción lechera del subtrópico en Santo Domingo – Ecuador, mediante la utilización de diferentes pruebas diagnósticas y estadísticas. Esto con el fin de levantar una línea base que pueda ser utilizada a futuro para mejorar el estatus sanitario del hato.

1.1.2. Objetivos Específicos:

- Identificar la prevalencia de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q, mediante la utilización de pruebas diagnósticas en una hacienda de alta producción lechera del subtrópico en Santo Domingo – Ecuador, con el propósito de.

describir el estatus sanitario.

- Analizar los potenciales factores demográficos que se asocien con la presencia de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q, mediante el análisis estadístico inferencial de los resultados de las pruebas diagnósticas en una hacienda de alta producción lechera del subtrópico en Santo Domingo – Ecuador.

1.2 Pregunta de investigación

¿Cuál es la prevalencia de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q en la producción de un predio lechero de gran escala y alta producción en Santo Domingo – Ecuador?

Capítulo II: Marco teórico

2.1. Tuberculosis

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad de carácter crónico, perteneciente al grupo de Bacilos de Koch o complejo “*Mycobacterium tuberculosis complex*”, producida por un bacilo que se relaciona ampliamente con las bacterias que producen tuberculosis aviar y humana. Se conoce que el hospedador definitivo de *M. bovis* es el ganado bovino doméstico, sin embargo, se ha descrito esta patología en otra variedad de especies domésticas y silvestres (Chauhan, George, Lindahl, Grace, & Kakkar, 2019). El nombre “tuberculosis” hace referencia a nódulos, denominados “tubérculos”, que usualmente se desarrollan en los ganglios linfáticos. La tuberculosis es considerada como una zoonosis importante y en algunos países corresponde a enfermedades de declaración obligatoria (Verteramo Chiu, Tauer, Smith, & Grohn, 2019).

2.1.2. La tuberculosis en el mundo

Está descrito que la tuberculosis bovina estuvo alguna vez presente en todo el mundo, no obstante, con los programas de control implementados, se logró eliminar esta enfermedad en muchos países. En la actualidad se encuentran como libres de tuberculosis Australia, Dinamarca, Islandia, Suecia, Finlandia, Noruega, Austria, Luxemburgo, Suiza Letonia, Lituania, Eslovaquia, Estonia,

República Checa, Singapur, Canadá, Jamaica, Israel y Barbados. Se está trabajando en la implementación de programas de erradicación en países europeos, Japón, Estados Unidos, Nueva Zelanda, México y países de América Central y del Sur. Cabe recalcar que, aunque la tuberculosis bovina se eliminó de gran parte de los estados de Estado Unidos; se detectan varios predios infectados y es por eso que algunos de ellos pierden la categoría de “libres de la enfermedad” respecto a tuberculosis bovina (Iowa State University, 2010).

Por otra parte, en Ecuador, no existe un determinado programa nacional de control para tuberculosis bovina. En los limitados estudios realizados se ha encontrado que en todas las provincias ganaderas se encuentra presente la enfermedad por lo cual ningún predio ha sido declarado como “libre de tuberculosis”. Es necesario realizar más estudios a profundidad para determinar valores más exactos y poder plantear sistemas de control (Proaño, 2008).

2.1.3. Infección y contagio

La tuberculosis bovina es de carácter infectocontagiosa y se propaga a través de la interacción con ejemplares domésticos o salvajes que se encuentren infectados. La vía de transmisión más importante es la respiratoria, mediante la inhalación de aerosoles o gotículas (Michelet et al., 2018). Por otro lado, existe la vía de infección digestiva, en donde los bovinos lactantes y el ser humano contraen la bacteria tras la ingesta de leche cruda proveniente de vacas enfermas. El mecanismo se da cuando los individuos ingieren saliva o secreciones del animal infectado. Por otra parte, existen vías de transmisión poco descritas como la cutánea, genital y congénita (Coad et al., 2019).

Los animales infectados con TBB presentan una elevada dificultad para ser identificados únicamente por signología clínica. En etapas iniciales de la infección, los bovinos infectados no muestran signos clínicos evidentes. Posterior a la infección, los animales pueden presentar letargia, pérdida de peso, tos húmeda crónica, neumonía y agrandamiento de los ganglios linfáticos. Las vacas presentan una disminución en la producción de leche (Verteramo Chiu et al., 2019).

2.1.4. Consecuencias de la enfermedad

Esta enfermedad tiene relevantes consecuencias económicas, debido a la deficiente producción de leche que presentan los bovinos, el decomiso de los animales en el matadero, el impedimento del transporte de los animales y su importancia radica en las campañas de prevención, control y erradicación. Se estima que alrededor de un 11 % de los casos de tuberculosis en humanos, son causados por *M. bovis*. Actualmente, en países desarrollados se ha logrado erradicar esta enfermedad, no obstante, los países en vías de desarrollo consideran a esta patología como un factor limitante en el ganado vacuno y a su vez en la fauna salvaje (Chauhan et al., 2019).

2.1.5. Diagnóstico de la enfermedad

2.1.5.1. Prueba de tuberculina

Este método ha sido reconocido como el estándar para diagnosticar tuberculosis en el ganado. Es un test de campo que consiste en la demostración de una respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium bovis*. La respuesta inmune determinada por células, son las reacciones inmunológicas observadas en la gran mayoría de las especies (Basybekov et al., 2018).

Mediante esta prueba se da una reacción intradérmica, utilizando un derivado proteico purificado (PPD), fabricado a partir de una cepa de *M. bovis*. Esta es la más utilizada en todo el mundo para controlar y erradicar la enfermedad (Praud, Boireau, & Dufour, 2016).

La técnica se efectúa por vía intradérmica, inoculando en el animal 0.1 ml de tuberculina; es decir a una concentración de 1mg/ml. Se inocula en el pliegue ano-caudal (PAC), es factible también realizarlo en la tabla del cuello (método llevado a cabo en este estudio), en este último lugar existe mayor sensibilidad.

Este procedimiento se conoce como prueba intradérmica única (PCS). En ocasiones se necesita mayor precisión en campo y se procede a realizar una prueba intradérmica comparativa (PCC) que consiste en la inoculación de PPD bovino en una zona y PPD aviar en una zona cercana, con el objetivo de comparar ambas reacciones y observar un resultado. La efectividad del test no depende solamente de la tuberculina y de su adecuada aplicación, sino también de la respuesta del animal mediante su sistema inmune (Praud et al., 2016).

2.1.5.2. Interferón gamma

El Interferón gamma (IFN- γ) también conocido como interferón inmune tipo II es una citoquina producida por linfocitos T CD4+, CD8+, células T γ/δ , de igual manera por células Natural Killer (NK) en respuesta a un determinado estímulo inmune o de carácter inflamatorio. Esta prueba es confirmatoria de la enfermedad, se lo hace posterior a la prueba de tuberculina. En la actualidad se ha demostrado que las células mieloides, es decir, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos, se encuentran en la capacidad de producir el IFN- γ mediante la estimulación con interleucinas 12 e IL-18 (Miller, Maher, & Young, 2009).

Es importante mencionar que la activación de estas células mieloides por IFN- γ , ayudan al control inicial de la infección en estudio. Una prueba de interferón gamma, consiste en una prueba de sangre con el fin de determinar si un individuo se encuentra infectado con las bacterias de determinada enfermedad. Esta prueba puede medir el grado de reacción del sistema inmune del individuo ante las bacterias, a través de un análisis sanguíneo de laboratorio (Razaghi, Owens, & Heimann, 2016).

El test de IFN- γ es utilizando en la mayoría de países europeos como prueba de diagnóstico complementario para la prueba de tuberculina comparativa intradérmica única (SICTT) realizada en campo, con el fin de incrementar la detección de los animales infectados con TBB en un hato específico (Clegg, Doyle, Ryan, More, & Gormley, 2019).

En cuanto a confiabilidad del test, existen un análisis estadístico reciente de los resultados publicados de una gran cantidad de estudios llevados a cabo en diferentes países, el cual arrojó una estimación del 67% (con un intervalo de confianza del 95% [CrI] 49%, 82%) para sensibilidad, y del 98% (95% CrI 96 %, 99%) para especificidad del test (Clegg et al., 2019).

Para realizar este procedimiento y maximizar el diagnóstico, la prueba de IFN- γ se efectúa en muestras enviadas a laboratorio dentro de un período de tiempo no superior a 8 horas tras la recolección de la muestra de sangre del animal (Clegg et al., 2019).

2.1.5.3. ELISA Sandwich

El test de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es uno de los más utilizados en investigación y diagnóstico con el objetivo de identificar y/o cuantificar analitos de procedencia proteica tales como proteínas, péptidos, hormonas y anticuerpos. De acuerdo a la forma en que se producen las interacciones correspondientes a antígeno-anticuerpo, existen cuatro variaciones, ELISA directo, indirecto, competitivo y sándwich (Peraile Muñoz et al., 2017).

El ELISA Sandwich es una variación que forma parte del test de Interferón gamma. Esta técnica es bastante sensible y útil para la detección de antígenos. Se utiliza placas de micro titulación especiales para ELISA. La diferencia con las otras variaciones de ELISA, es que en este método el antígeno se queda completamente inmovilizado entre dos anticuerpos específicos, uno de captura y el otro de detección, se los conoce también como pares de anticuerpos, que posteriormente se unirán a dos epítomos diferentes de un mismo antígeno (Peraile Muñoz et al., 2017).

2.2. Paratuberculosis

La Paratuberculosis bovina es una infección causada por la bacteria *Mycobacterium avium* subespecie *Paratuberculosis* (MAP), afecta al tracto intestinal de manera crónica y es contagiosa. Ataca a bovinos (principalmente ganado lechero), ovinos, caprinos y otras especies de rumiantes produciendo diarreas severas, lo que conlleva a una etapa de caquexia progresiva y edemas submandibulares (Meyer et al., 2019).

2.2.2. La paratuberculosis en el mundo

La paratuberculosis bovina, al igual que la anterior enfermedad se puede encontrar presente en todo el mundo. Únicamente se ha determinado que solamente Suecia y algunos estados de Australia están libres de esta enfermedad. Por otra parte, en un estudio realizado por Benavides en Colombia, se determinó que la seropositividad estuvo asociada con las variables de edad,

raza, ubicación, número de lactancias, condición corporal y estadio clínico. Se encontró que en 15 fincas había por lo menos un animal positivo y el 8% de los animales en cuestión fueron detectados con anticuerpos anti-MAP. Se estableció así una diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a la condición corporal del bovino (Benavides, 2014).

En Ecuador el estudio principal fue realizado en el Cantón Mejía a 384 animales, en donde se determinó una prevalencia de 7,29% para la enfermedad, es decir 28 animales positivos y se obtuvieron además 5 animales sospechosos. Se conoce que la enfermedad está presente en todo el país pero no hay más estudios de referencia significativos (Oña, 2015).

2.2.3. Infección y contagio

Los animales infectados excretan elevadas cantidades de bacterias mediante las heces, incluyendo animales con infección subclínica de carácter silencioso. El individuo se infecta mediante la ingestión de heces o alimento contaminado de animales previamente infectados. Las bacterias causantes de la enfermedad se encuentran presentes en la leche y en el calostro de vacas infectadas. Existe la transmisión vertical de esta enfermedad. Los animales jóvenes son bastante susceptibles y con gran frecuencia son infectados en el período de lactancia, a través de la ingestión directa de la leche o leche previamente contaminada con heces de animales infectados (Camanes, Joly, Fourichon, Ben Romdhane, & Ezanno, 2018).

Existen conceptos importantes para MAP como la "fase silenciosa" de la infección y los individuos que son "portadores crónicos". Ambos términos hacen referencia al hecho de que muchas vacas infectadas, en las etapas iniciales de la infección no presentan cuadros con diarrea o pérdidas de peso, sin embargo, excretan grandes cantidades de bacterias que contaminan el medio ambiente y producen exposición a otros animales. Estos animales son portadores crónicos. Los animales infectados, usualmente excretan la bacteria de manera intermitente, lo que en ocasiones dificulta el diagnóstico (Konboon, Bani-Yaghoub, Pithua, Rhee, & Aly, 2018).

Los signos clínicos más frecuentes de la paratuberculosis son diarreas severas y pérdidas de peso considerables, por lo tanto, la condición corporal

disminuye notoriamente. La particularidad de esta enfermedad es que es crónica y los animales tienden a empeorar con el tiempo (Pisanu et al., 2018).

2.2.4. Consecuencias de la enfermedad

Es importante mencionar que no existe un tratamiento para la enfermedad, sino que se la debe eliminar por completo para evitar la diseminación y propagación de esta. Cabe recalcar que la bacteria causante de paratuberculosis es resistente a los procesos de eliminación y son capaces de sobrevivir en agua y suelo durante un largo periodo de tiempo, varios meses e incluso años. Por otra parte, la exposición directa a la luz del sol interviene para eliminar la bacteria del medio ambiente (Gao et al., 2018).

En zonas determinadas, los reservorios de animales silvestres pueden desempeñar un papel en la transmisión de la enfermedad, entre estos se encuentran ciervos, venados y liebres (Infantes-Lorenzo et al., 2019).

2.2.5. Diagnóstico de la enfermedad

2.2.5.1. ELISA Indirecto

Para diagnosticar PTB se ha utilizado el ensayo inmuno-enzimático o ELISA, para la detección de esta enfermedad, principalmente en bovinos, caprinos y ovinos, usualmente el antígeno empleado para ejecutar la prueba diagnóstica es obtenido de una cepa conocida como MAP, la cual ha sido determinada como un antígeno sonicado y filtrado. El sonicado hace referencia al hecho de aplicar la energía del sonido, a manera de ultrasonidos con el fin de agitar las partículas de una determinada muestra, ya sea con fines científicos o industriales.

Así mismo esta prueba diagnóstica utiliza células completas de carácter inactivado con formaldehído, antígenos protoplasmáticos, antígenos de superficie y proteínas de secreción temprana; la sensibilidad y especificidad de esta prueba es de 99% y 98% respectivamente. En la actualidad existen varios paquetes comerciales para realizar el diagnóstico de esta enfermedad, pero al ser de importación y tener un costo elevado, no se lleva a cabo el diagnóstico de forma constante y rutinaria en los laboratorios de salud animal en Ecuador

(Martínez, Santillán, Guzmán, Humarab, Córdova, Díaz, Hernández, Blanco, 2012).

2.3.Fiebre Q

La fiebre Q es una enfermedad producida por la bacteria *Coxiella burnetii*, que infecta a mamíferos, aves y reptiles. Es de gran consideración en rumiantes como ovinos, bovinos y caprinos. Esta bacteria puede ocasionar zoonosis, por lo tanto, es de gran importancia a nivel de producción. *C. burnetii* se disemina en orina, heces y leche, sin embargo, la mayor cantidad de bacterias son detectadas al momento de parición, en el líquido amniótico y la placenta (Seo, Kwon, & Kwak, 2019).

2.3.1. La fiebre Q en el mundo

La fiebre Q fue diagnosticada por primera vez en el año 1935, en Australia. Desde entonces se conoce que está presente en todo el mundo, con excepción de Nueva Zelanda. Los bovinos, ovinos y caprinos son los reservorios principales de la bacteria. Es importante mencionar que la enfermedad se ha diagnosticado en varios animales domésticos, tales como perros, gatos, caballos, conejos, cerdos, camellos, roedores, búfalos y algunas aves; estos pueden ser portadores asintomáticos de *C. burnetii* y transmitir la enfermedad a los seres humanos (Rojas, 2012).

Por otra parte, en Ecuador no existen estudios relevantes, a excepción del estudio mencionado previamente llevado a cabo en el 2012. El presente estudio describirá por primera vez una prevalencia en un predio representativo de la provincia de Santo Domingo.

2.3.2. Infección y contagio

En el medio ambiente, las bacterias presentan una forma similar a una espora de reducido tamaño, esta es densa y resistente, soporta el calor y la desecación. Esta bacteria al ser altamente infecciosa puede provocar la enfermedad de manera clínica con solo inhalar un organismo (Mohabbati Mobarez, Bagheri Amiri, & Esmaeili, 2017).

Usualmente, los brotes de fiebre Q aparecen cuando los fluidos corporales de una parición o de un aborto infectan el medio ambiente. La enfermedad también se disemina mediante garrapatas, las cuales transmiten bacterias de animales infectados a susceptibles. Otro punto de vista a tomar en cuenta es que debido a que las bacterias se encuentran en la leche de animales infectados, el consumo de este producto sin pasteurizar constituye una vía de transmisión que en ocasiones produce abortos e incluso muertes prenatales (Gale, Kelly, Mearns, Duggan, & Snary, 2015).

2.3.3. Consecuencias de la enfermedad

Ciertos estudios han demostrado que un gran número de personas que interactúan con ganado han desarrollado anticuerpos. Menos de la mitad de los individuos humanos infectados contrae fiebre Q, pero las infecciones son leves. No obstante, en ciertas circunstancias, las personas pueden presentar fiebre elevada, cefalea, dolor de garganta, dolores musculares, dolor de pecho, estómago, náuseas y vómitos. La fiebre dura entre 1 a 2 semanas y desencadena neumonía y posibles trastornos hepáticos. La forma aguda de la enfermedad, con frecuencia es mortal y se diagnostica en un reducido porcentaje de casos (Mohabbati Mobarez et al., 2017).

2.3.4. Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la fiebre Q puede ser realizado mediante pruebas de inmunoensayo (ELISA) o mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). En este caso se lo realizó mediante el uso de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos dirigidos contra *Coxiella burnetii* en suero o plasma, también se lo podría realizar en leche. Es importante mencionar que, en la prueba de ELISA, se utilizan antígenos de las fases I y II de *Coxiella burnetii*, aislados a partir de la placenta de un aborto bovino. Sin embargo, estos componentes del ELISA como tal, son similares a los descritos previamente para el diagnóstico de PTB.

2.4. Pruebas estadísticas

2.4.1. Chi-cuadrado

Es una prueba estadística que es útil para analizar hipótesis asociadas a distribuciones de frecuencias. Esta prueba diferencia entre frecuencias esperados con frecuencias ya observadas en base a la formulación de una hipótesis nula (Quevedo Ricardi, 2011).

2.4.2. Ecuación de Rogan Gladen

Este método es utilizado para trabajar con Chi – Cuadrado adecuadamente. En esta herramienta se utilizan los datos de prevalencia aparente, sensibilidad y especificidad las pruebas diagnósticas para calcular la prevalencia real; la prevalencia aparente (P') se calcula con la siguiente fórmula:

P' =

$$\frac{\text{Número de animales enfermos o infectados en un determinado periodo de tiempo}}{\text{Número total de individuos de la población en estudio en un tiempo determinado}}$$

Una vez obtenida la prevalencia aparente se procede a calcular la prevalencia real con la siguiente fórmula:

$$P = \frac{P' + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

Cabe recalcar que el intervalo de confianza (IC) para la prevalencia aparente y real corresponde al 95% (Iza, 2014).

2.4.3. Regresión Logística

En este caso al utilizar la Regresión Logística predijo el resultado de una variable categórica en función de las diferentes variables independientes. Este test es de bastante utilidad para trabajar con la probabilidad de que ocurra un evento en función de otros factores. El análisis de regresión logística se utiliza de manera amplia, principalmente en las ciencias médicas. Por tal motivo se realizó regresión logística en las tres enfermedades discutidas en el proyecto (López et al., 2017).

La regresión logística se utilizó con el fin de tratar de correlacionar la probabilidad de una determinada variable cualitativa binaria, asumiendo que se

tomaron los valores de "0" y "1" con una variable escalar específica. La idea fue que esta prueba aproxime la probabilidad de obtener uno de estos dos números, donde "0" hace referencia a que un suceso es nulo o no ocurre y "1" hace referencia a que si ocurre dicho suceso (López et al., 2017).

Es importante mencionar que en todas las tablas se encuentran resultados del p valor mayores a 0.005, lo cual quiere decir que en ninguna de las relaciones se encuentra diferencia significativa como para hacer alusión a un determinado factor demográfico específico existente hacia cualquiera de las enfermedades con sus respectivas variables (López et al., 2017).

2.4.4. Prueba de Wald

Esta prueba se caracteriza por establecer un contraste de hipótesis, cuyo objetivo es lograr encontrar coherencia para afirmar un valor específico de un parámetro de un modelo de probabilidades una vez que se tiene ya un modelo seleccionado y previamente ajustado (Wang & Woods, 2017).

Es una prueba generalista, por lo cual puede ser aplicable en varios ámbitos. Se aplica usualmente posterior a elegir un modelo, es decir, una distribución específica, una regresión simple o logística, entre otras. Después se hace un contraste de hipótesis ya sea sobre uno o algunos parámetros (Wang & Woods, 2017).

Se lo utiliza para determinar si es cero o no un coeficiente específico que multiplica a una variable de carácter independiente en una regresión. Si el p-valor, es menor que 0.05, la hipótesis nula que afirma que ese coeficiente es cero, es totalmente rechazada y se entiende que ese coeficiente no corresponde a cero, por lo tanto, no se puede determinar una relación de trascendencia. Ahora bien, si el p-valor es mayor a 0.05 quiere decir que el valor del coeficiente puede ser cero así pues se establece que esa variable no afecta al momento de determinar la variable dependiente o variable respuesta del modelo de regresión en cuestión (Wang & Woods, 2017).

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1. Ubicación

El proyecto se realizó en una hacienda de Santo Domingo – Ecuador, en una zona subtropical del país. Por motivos de confidencialidad establecidos entre la hacienda y la Universidad de las Américas, no se menciona ubicación geográfica específica, coordenadas geográficas ni latitud.

3.2. Población y muestra

La población perteneciente a la hacienda es de 1130 bovinos y se llevó a cabo el estudio en una muestra de la totalidad de los animales con los que se trabajó en un lapso de 10 días, es decir, un muestreo de 115 animales diarios aproximadamente. Este grupo de muestra corresponde a vacas de todas las edades, en cualquier etapa reproductiva, de cualquier raza, es decir, el hato absoluto.

3.3. Materiales:

3.3.1. De campo

- Bolsa roja para los desechos biológicos
- Guantes de examinación desechables
- Agujas para extraer de sangre por un sistema de vacío (20G).
- Tubos para recolección sanguínea estériles de tapa verde con heparina
- Camisas de agujas de punción intravenosa - vacutainer.
- Yodo a al 10%
- Alcohol antiséptico
- Crayones para marcaje
- Bastón electrónico (base de datos)
- PPD bovis
- PPD avium

3.3.2. De laboratorio

- Probeta
- Pipeta
- Termómetro
- Antígenos PPD bovis
- Antígenos PPD avium
- Solución buffer (Ag nil - sin antígeno)
- Pocillos para anticuerpo monoclonal
- Substrato (enzima)
- Tubos para PCR
- Termociclador
- Espectrofotómetro
- Kits RT-PCR Triplex para fiebre Q PCR Real Time (Casa Comercial: IDVET)
- Kits anti-coxiella burnetii para fiebre Q ELISA Indirecto (Casa Comercial: IDVET)
- Kits Mycobacterium svium complex (MAC) para tuberculosis ELISA Indirecto (Casa Comercial: IDVET)
- Kits PPD Pack para tuberculosis Tuberculina / Skin Test (Casa Comercial: IDVET)
- Kits ID–Screen IFN-gamma para tuberculosis Interferón gamma (Casa Comercial: IDVET).
- Incubadora a 37 °C
- Micropipetas o pipetas monocanales o multi canales (de volúmenes de 5 µl, 10 µl, 100 µl y 200 µl)
- Puntas de pipeta desechables
- Lector de microplacas de 96 pocillos
- Agua destilada
- Lavador de placas

3.3.3. De Oficina

- Registros

- Computadoras
- Bolígrafo
- Libreta de anotaciones

3.4. Variables

Tabla 1 *Variables analizadas en el estudio*

Variables	Tipo de variable	Indicador	Unidad de medida	Instrumentos
Diagnóstico de tuberculosis en el hato ganadero lechero.	Cualitativa dicotómica	Skin Test/ Tuberculina	Positivo o negativo	Identificación mediante el test / Observación directa
Diagnóstico de paratuberculosis en el hato ganadero lechero.	Cualitativa dicotómica	ELISA Indirecto	Positivo o negativo	Identificación mediante el test Observación directa
Diagnóstico de fiebre Q en el hato ganadero lechero.	Cualitativa dicotómica	ELISA Indirecto	Positivo o negativo	Identificación mediante el test Observación directa
Edad de los animales	Cuantitativa continua	Registros	Años / meses / días	Registros
Raza de los animales	Cualitativa nominal	Características observacionales	Razas	Observación directa / registros
Etapa reproductiva	Cualitativa nominal	Registros	Estado del periodo reproductivo	Registros
Veces inseminada	Cuantitativa continua	Registros	Números enteros basados en registros	Registros
Producción de litros totales	Cuantitativa continua	Registros	Cantidad de litros producidos en base a registros	Registros

3.5. Metodología

3.5.1. Levantamiento de datos e información

Se realizó a partir de los registros manejados por el predio, en donde además se verificó que los animales evaluados pertenecen al grupo de estudio. Posteriormente se incorporó la información de los resultados a las diferentes pruebas diagnósticas al mismo registro.

Se utilizó una herramienta fundamental, la cual permitió ahorrar tiempo y determinar con mayor facilidad datos específicos de cada animal. El bastón lector de registro tiene la capacidad de leer información de cada individuo mediante un

chip que se encuentra en el rumen de cada animal, que es introducido en él los primeros días de nacido. Cuenta con una pantalla en la que se observan los datos y un teclado para escribir lo que sea necesario para el registro. Se lee el ID, fecha de nacimiento, raza, calendario de vacunación, etapa reproductiva, entre otros parámetros necesarios que son fundamentales para el manejo por parte de la hacienda.

3.5.2. Toma de muestras

En el ganado bovino, la toma de muestras se realizó utilizando el protocolo “Toma y envío de muestras en animales domésticos” aprobado por AGROCALIDAD. Este método es fundamental en campo, se obtuvo sangre de la cola de los animales. El primer paso consistió en definir la vena de donde se extraería la sangre, en este caso fue de la vena coccígea. Para esto se necesitó restricción de los animales mediante mangas/bretes de contención específicas para este trabajo, así pues, existe menor riesgo de accidentes o contaminación tanto para los operarios como para los animales (ANEXO 1).

Posteriormente, se rotularon cada uno de los tubos para saber a qué animal corresponde la muestra. En el caso de tuberculosis, se utilizaron tubos con heparina (tapa verde), debido a que luego de tomar las muestras, estas se transportaron hacia el laboratorio por un periodo aproximado de 4 horas (ANEXO 2).

El muestreo para TBB se llevó a cabo en 3 días, lunes, martes y miércoles a razón de 380 animales/día aproximadamente. Por otra parte, el muestreo para PTB y fiebre Q se llevó a cabo durante 10 días como se mencionó anteriormente. Los animales fueron ubicados en las mangas de contención, se procedió a levantar la cola de cada individuo delicadamente hasta ubicarla en una posición cómoda para la visualización de las estructuras anatómicas. Se retiraron residuos de heces fecales y se limpió el área con papel y agua. Después por palpación se localizó la vena en la porción medial de la cola, en el espacio intervertebral. Se realizó asepsia con solución de yodo al 10%, alrededor del sitio de punción.

Finalmente, para la extracción de sangre, se introdujo una aguja calibre 20 (tapa amarilla), entre el espacio intervertebral a una profundidad aproximada

de 7-10 milímetros, dependiendo del animal, perpendicular a la cola hasta que la sangre comience a brotar a chorro (ANEXO 3). En algunos casos en los que la muestra se obtuvo salió por goteo, se procedió a repetir para evitar que la muestra se coagule, lo cual puede ocurrir pese a que el tubo contenga heparina. En cada extracción se obtuvo un mínimo de 5 ml de sangre y se procedió a hacer ligeros movimientos del tubo con el fin de homogenizar la muestra.

Cabe recalcar que estas 1130 muestras fueron para evaluar presencia o ausencia de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q. La muestra de sangre extraída fue destinada a la prueba correspondiente según la enfermedad a ser diagnosticada.

3.5.3. Tuberculinización

Para este proceso se siguió el mismo protocolo de contención de animales en mangas, descrito anteriormente. En este caso, la tabla del cuello del lado izquierdo de cada bovino quedó expuesto hacia el operario. Una vez ubicados los animales, se procedió a depilar un área de 5 cm de diámetro aproximadamente a 12 cm de distancia con relación al ligamento nuchal. Posterior a esto, se midió el grosor de la piel de cada animal con la herramienta pie de rey, anotando su medida respectiva, luego se inyectó 0.1 ml de tuberculina bovina mediante el uso de la herramienta DERMOJET previamente cargada con la sustancia, constatando que se genere una pápula en la zona de la inyección anteriormente depilada (ANEXO 6).

Se tuberculinizó 404 animales/día en lunes, martes y miércoles, debido a que la lectura se realizó 72 horas después de la inoculación, es decir, la lectura de los animales tuberculinizados el lunes se la realizó jueves, la del martes se la realizó viernes y la del miércoles se la realizó el sábado.

Para la lectura se ubicó nuevamente a los animales en las mangas de contención con su lado izquierdo expuesto hacia el operario y se procedió a medir el grosor de la piel tras la previa inoculación de tuberculina 72 horas antes. El resultado obtenido en la primera medición del grosor de la piel fue restado del resultado obtenido tras la medición realizada luego de la inoculación de tuberculina, dando como resultado definitivo la diferencia entre ambas medidas (ANEXO 4 y 5).

Todos aquellos animales que obtuvieron una diferencia de medida entre 0-1.9 mm fueron diagnosticados como negativos, aquellos que se encontraron en un rango entre 2–3.9 mm fueron diagnosticados como sospechosos y aquellos que igualaron o superaron la medida de 4.0 mm resultaron positivos a la tuberculosis.

Tras la lectura respectiva, se procedió a separar los animales positivos de los negativos y sospechosos. A todos los sospechosos se procedió a extraer una muestra de sangre para enviarla al laboratorio y confirmar el resultado positivo mediante IFN- γ , siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizó una herramienta especial, Dermojet, es un dispositivo que permite realizar inyecciones intradérmicas sin aguja debido a que maneja un sistema de disparo basado en presión instantánea. Se compone de un cuerpo metálico con un pistón céntrico de diámetro pequeño, así mismo posee muelle y palanca. Cuenta con un cabezal de inyección con una válvula para retener el líquido y un orificio en la parte inferior. Tiene un cilindro transparente de 4 cm3 cuya utilidad es para depositar el líquido a inyectar (en este caso PPD). Finalmente, cuenta con un casquillo de ajuste para fijarlo al cilindro sobre el cuerpo del aparato. Al momento de inyectar es factible colocar el dispositivo en contacto con la piel o a unos milímetros de distancia (“DERMOJET MEDICAL HR Jeringa Intradérmica,” 2019) (ANEXO 6).

3.5.4. Análisis de las muestras

Las muestras fueron trasladadas a laboratorio para su análisis en transporte, tomando en cuenta la temperatura que requiere cada una de las muestras, con el objetivo de evitar alteraciones en las muestras como desnaturalización de las proteínas o destrucción de los agentes que actúan en las pruebas de laboratorio (Ordóñez, 2017).

Las muestras de sangre se analizaron utilizando las instrucciones de la casa comercial de la cual se hablará posteriormente. Se efectuaron las pruebas de laboratorio previamente mencionadas y se obtuvieron los resultados.

3.5.4.1. Tuberculosis (IFN- γ)

Estos procedimientos fueron realizados bajo las instrucciones y normativas de la casa comercial IDvet - Innovative Diagnostics. Para determinar la presencia o ausencia de esta enfermedad se trabajó con muestras de los animales previamente tuberculinizados con resultado sospechoso al momento de la lectura. Se obtuvo 92 animales sospechosos de 1130.

Generalidades: La prueba diagnóstica de interferón gamma consta así mismo de ELISA Sandwich, la cual está diseñada para la detección de interferón gamma nativo en plasma bovino, caprino, ovino o sobrenadante de cielo. Se basa en la utilización de un control estándar liofilizado y de dos anticuerpos monoclonales que permiten la detección del interferón gamma de rumiante.

Los resultados son expresados acorde al control positivo liofilizado y estandarizado que se encuentra incluido en el kit como referencia. Esta expresión relativa de la cantidad medida de interferón gamma otorga la garantía de resultados estandarizados entre los ensayos realizados y los lotes del kit.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-INF gamma son utilizados para sensibilizar los pocillos. De los pocillos se añade los controles y las muestras a ser analizadas. En caso de que exista la presencia del interferón gamma se da la formación de un complejo AcM antígeno. Posterior al lavado, se da la adición del conjugado anti-interferón gamma HR PC, el cual se fija al interferón gamma dando lugar a la formación del complejo Ac M antígeno conjugado HRP.

El resultado colorimétrico depende de la cantidad de interferón gamma específico presente en las muestras analizadas. En caso de que el interferón gamma esté presente en la muestra el resultado será de color azul, el cual se torna en amarillo posterior a la adición de solución de parada. No se da ninguna coloración en caso de que el interferón gamma no esté presente en las muestras.

Preparación de muestra: Se preparó una placa de 96 pocillos que contenía muestras y controles y posterior a ello se transfirió a la microplaca Elisa con una pipeta multicanal, esto se realiza para que no ocurran diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras analizadas.

Preparación de la solución de lavado: La solución de lavado concentrada debe estar equilibrada (20 X a temperatura ambiente $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), se agitó para diluir los cristales. La preparación de la solución se realizó mediante la dilución de 1:20 solución de lavado (20X) en agua destilada.

Preparación de los reactivos: previo a la utilización de los reactivos, estos fueron colocados a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) y se homogenizaron por inversión.

El control positivo se reconstituyó utilizando el solvente de reconstitución del kit. Se esperó cinco minutos aproximadamente y se mezcló con cuidado hasta obtener una disolución completa.

Activación celular específica: la incubación de cada muestra se da de forma paralela mediante la utilización de la muestra en contacto con el antígeno específico (PPD) y utilizando la muestra puesta en contacto con un antígeno de control.

Protocolo: en ciertas regiones, como parte del diagnóstico de tuberculosis, frecuentemente los animales reaccionan a PPD bovino dando lugar a la producción de altos niveles de DO.

Procedimiento: Se distribuyó 25 μl del diluyente uno y 25 μl de control negativo a los pocillos A1 y B1. Como segundo paso se distribuyó 25 μl del diluyente uno y 25 μl del control positivo a los pocillos C1 y D1. Finalmente, 90 μl del diluyente uno y 10 μl de cada muestra analizar (muestra activada y muestra control) se distribuyeron al resto de los pocillos.

- Se agitó la placa dos minutos a 21°C
- Se incubó durante 1 hora a 37°C .
- Los pocillos fueron vaciados. Se realizó el lavado de los pocillos cinco veces con aproximadamente 300 μl de la solución de lavado 1X.
- La preparación del conjugado 1X se realizó mediante la dilución del conjugado 10X a 1:10 con el diluyente 1.
- Se añadió 100 μl del conjugado 1X a cada pocillo.
- Se incubó durante una hora a 37°C .
- Los pocillos fueron vaciados. Cada pocillo fue lavado cinco veces con aproximadamente 300 μl de solución de lavado.
- Se añadió 100 μl de la solución de revelación a cada posición.
- Se incubó durante 15 minutos a 21°C en un ambiente oscuro.
- Se añadió 100 μl de la solución de parada a cada pocillo para detener la reacción.

- Se leyó e interpretó la muestra

3.5.4. Paratuberculosis

Estos procedimientos fueron realizados bajo las instrucciones y normativas de la casa comercial IDvet - Innovative Diagnostics. Se efectuó la prueba de manera similar a la mencionada en tuberculosis, con la diferencia de que los pocillos estaban sensibilizados con el extracto purificado de MAP. Las reacciones cruzadas pueden ser evitadas mediante la pre-incubación de las muestras en un tampón de neutralización que contiene *Mycobacterium phlei* (diluyente 6) y después son transferidas a las placas sensibilizadas con el antígeno.

Cuando los anticuerpos (anti-MAP) están presentes se forma un complejo antígeno-anticuerpo con los epítomos de MAP.

Se distribuye en los pocillos al conjugado anti rumiante IgG marcado con la peroxidasa de rábano picante (HRP). Dando resultado al complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP mediante la fijación de HRP a los anticuerpos anti-MAP.

Los conjugados excesivos son eliminados mediante lavados, para la cual es necesario añadir solución de revelación TMB. La coloración resultante se da acorde a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra analizada. Cuando hay anticuerpos presentes se da lugar a una coloración azul que se convierte en amarilla posterior a la adición de solución de parada. En ausencia de anticuerpos en la muestra, no aparece ninguna coloración.

La solución de lavado concentrada (20 X) debe ser equilibrada a temperatura ambiente, posterior a ello es necesario agitar de forma correcta para lograr diluir los cristales.

La solución de lavado (1X) se obtiene mediante la dilución de solución de lavado concentrada (20X) con agua destilada.

La cantidad de lavados influye directamente sobre los resultados, por lo que los pocillos deben estar completamente vacíos entre cada lavado.

3.5.4.3. Fiebre Q

Estos procedimientos fueron realizados bajo las instrucciones y normativas de la casa comercial IDvet - Innovative Diagnostics. En este caso se utilizaron microplacas, las cuales están sensibilizadas con antígenos de las fases I y II de *Coxiella Burnetti*. Se añaden los controles y muestras a ser analizadas en los pocillos. Se forma un complejo antígeno-anticuerpo en caso de que los anticuerpos anti *Coxiella Burnetti* de fases I y II estén presentes.

Después del lavado, se añade el conjugado anti multi especies marcado con la peroxidasa de rábano picante HRP a los pocillos. HRP se fija a los anticuerpos formando un complejo antígeno-anticuerpo-conjugado-HRP.

El exceso de conjugado se elimina mediante la realización de un lavado, la solución de revelación (TMB) es añadida.

La cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra analizada influyen directamente en la coloración resultante. En caso de que exista presencia de anticuerpos aparece una coloración azul que se transforma en amarilla posterior a la adición de solución de parada. En ausencia de anticuerpos no aparece coloración.

Preparación de la muestra: Se preparó una placa de 96 pocillos que contenía muestras y controles y posterior a ello se transfirió a la microplaca Elisa con una pipeta multicanal, esto se realiza para que no ocurran diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras analizadas.

Preparación solución de lavado: La solución de lavado concentrada debe estar equilibrada (20 X a temperatura ambiente $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), se agitó de forma correcta para diluir los cristales. La preparación de la solución se realizó mediante la dilución de 1:20 solución de lavado (20X) en agua destilada.

La cantidad de lavados influye directamente sobre los resultados, por lo que los pocillos deben estar completamente vacíos entre cada lavado.

Preparación de los reactivos: previo a la utilización de los reactivos, estos fueron colocados a temperatura ambiente ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se homogenizaron por inversión.

El control positivo se reconstituyó utilizando el solvente de reconstitución del kit. Se esperó cinco minutos aproximadamente y se mezcló con cuidado hasta obtener una disolución completa.

Muestra de suero o plasma:

- Las muestras son ensayadas a la dilución final 1:50 de la siguiente manera: se pre diluye en una placa mediante la adición de 5 µl de control negativo a los pocillos A1 y B1, 5 µl de control positivo a los pocillos C1 y D1, 5 µl de cada muestra a analizar en los pocillos restantes, 25 µl de diluyente 2 a cada pocillo. En la placa del ELISA se debe añadir 100 µl de control negativo prediluido en los pocillos A1 y B1, 100 µl de control positivo pre diluido en los pocillos C1 y D1, además de 100 µl de las muestras pre diluidas como preparadas previamente.
- La placa deberá ser cubierta e incubada durante 45 minutos a 21°C
- Los pocillos deben ser vaciados y lavados tres veces con al menos 300 µl de solución de lavado. Evitar el secado de los pocillos entre lavados.

Se procederá a analizar los resultados y transcribirlos a manera de datos estadísticos mediante Chi-Cuadrado y la ecuación de Rogan Gladen con el fin de obtener una prevalencia real a través de una prevalencia aparente.

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Descripción del estudio

El presente estudio fue de carácter prospectivo observacional analítico y se realizó en 1130 vacas lecheras en una hacienda ubicada en Santo Domingo – Ecuador, una zona subtropical del país. Consistió en obtener una muestra sanguínea de cada uno de los individuos, con el objetivo de analizarlas en un laboratorio mediante (X) pruebas diagnósticas para observar si en su organismo se encontraban presentes enfermedades como tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q. Se obtuvo resultados e interpretaciones mediante el análisis de pruebas estadísticas como la Regresión Logística, la ecuación de Rogan y Gladen, las tablas de contingencia y el Chi – cuadrado. Posteriormente se analizó la presencia de patógenos mediante la prevalencia obtenida y demostrada después de la realización de pruebas tanto diagnósticas como estadísticas.

Capítulo IV. Resultados y Discusión

4.1. Resultados

4.1.2. Tuberculosis

Respecto a esta enfermedad, se obtuvieron 11 animales positivos de un total de 1130 arrojando así una prevalencia de 0.97%. Siendo estos positivos clasificados de la siguiente manera:

Raza: 9 de raza Jersey (81,8%) y 2 Sahiwal (18,2%).

Edad: 5 de ellos se encontraban en la edad de 5 años (45,45%), 4 en la edad de 6 años (36,7%), 1 en la edad de 7 años (9%) y uno en la edad de los 13 años (9%).

Etapas reproductivas: 4 estaban recién inseminadas (36,7%), 3 preñadas (27,3%), 3 secas (27,3%) y 1 fresca (9%).

Veces inseminada: 1 nunca ha sido inseminada (9%), 6 fueron 1 sola vez inseminadas (54,5%), 1 fue 2 veces inseminada (9%) y 3 fueron 4 veces inseminadas (27,3%).

Y entre todas marcaron un promedio de producción de leche total de 2169 por vaca (ANEXO 7).

4.1.3. Paratuberculosis

Respecto a esta enfermedad, se obtuvieron 59 animales positivos de un total de 1130, obteniendo una prevalencia de 5,2%. Siendo estos positivos clasificados de la siguiente manera:

Raza: 33 Jersey (55,9%), 26 Sahiwal (44,1%) y ningún animal Gyr.

Edad: 1 estaba en los 3 años (1,7%), 6 en los 4 años (10,2%), 13 en los 5 años (22%), 8 en los 6 años (13,6%), 7 en los 7 años (11,9%), 8 en los 8 años (13,6%), 5 en los 9 años (8,5%), 1 en los 10 años (1,7%), 8 en los 11 años (13,6%), 1 en los 12 años (1,7%) y otro en los 13 años (1,7%).

Etapas reproductivas: 17 estaban recién inseminadas (28,9%), 15 preñadas (25,5%), 13 secas (22%) y 6 frescas (10,2%).

Veces inseminada: 10 nunca han sido inseminadas (16,9%), 23 fueron 1 sola vez inseminadas (38,9%), 14 fue 2 veces inseminada (23,8%), 4 fueron 3 veces

inseminadas (6,8%), 2 fueron 4 veces inseminadas (3,4%), 4 fueron 5 veces inseminadas (6,8%), 1 fue 6 veces inseminada (1,7%) y otra 7 veces inseminada (1,7%).

Y entre todas marcaron un promedio de producción de leche total de 2303 por vaca.

4.1.4. Fiebre Q

Respecto a esta enfermedad, se obtuvieron 473 animales positivos de un total de 1130, obteniendo una prevalencia de 41,8%. Siendo estos positivos clasificados de la siguiente manera:

Raza: 309 Jersey (65,3%), 162 Sahiwal (34,2%) y 2 Gyr (0,5%).

Edad: de 1 a 4 años correspondieron 70 animales (14,8%), de 5 a 9 años correspondieron 328 animales (69,3%) y de 10 a 15, 75 animales (15,9%).

Etapas reproductiva: 160 estaban recién inseminadas (33,8%), 120 preñadas (25,4%), 91 secas (19,2%), 63 frescas (13,3%), 17 no inseminadas (3,6%) y 22 secas (4,7%).

Veces inseminada: 87 nunca han sido inseminadas (18,4%), 163 fueron 1 sola vez inseminadas (34,5%), 117 fue 2 veces inseminada (24,7%), 52 fueron 3 veces inseminadas (10,9%), 27 fueron 4 veces inseminadas (5,7%), 7 fueron 5 veces inseminadas (1,5%), 9 fueron 6 veces inseminada (1,90%), 4 fueron 7 veces inseminada (0,85%), 1 fue 8 veces inseminada (0,2%) y 5 fueron 9 veces inseminadas (1,35%).

Y entre todas marcaron un promedio de producción de leche total de 2237 por vaca.

Cabe recalcar que posterior al análisis estadístico, se obtuvieron resultados similares entre las diferentes variables demográficas y las tres enfermedades en cuestión. Por lo tanto, los resultados de las tablas no muestran diferencias significativas en ninguna de las pruebas estadísticas y se encuentran adjuntos en la parte final del documento a manera de anexos (ANEXO 8).

4.2. Discusión

En base a los resultados obtenidos de la estadística descriptiva y analítica se planteó que existe la siguiente prevalencia para tuberculosis: 0,97% en un total de 1130 animales (11 positivos). Este valor se puede comparar al obtenido por Aguilar Gálvez Fernando, quien menciona que, en las zonas bajas de la provincia del Oro, existe una prevalencia del 0% en un total de 269 animales muestreados. Sin embargo, esta prevalencia se obtuvo realizando únicamente la prueba de campo de inoculación de tuberculina en el pliegue ano-caudal de cada bovino.

Otros reportes en Ecuador se basan en un estudio realizado en los cantones Cayambe, El Ángel, Espejo y Otavalo, donde se obtuvo una prevalencia de 3,91% (Andino, M. y Ashqui, J. 2001). De igual manera en el cantón Mejía, se arrojó una prevalencia de 7,95% en aproximadamente 72 bovinos ubicados grandes hatos, 3,40% en un número de 25 a 70 bovinos de hatos medianos y 0,3%; en menos de 25 animales de hatos pequeños. Proaño en 2009 corrobora esta información donde evidencia una prevalencia de 7,13% en hatos grandes y una tasa de incidencia anual de 1,7% en las mismas zonas (Proaño, F. et al., 2009).

Recorriendo hasta la provincia de Manabí, en el cantón Carmen, se realizaron investigaciones en 160 bovinos donde se obtuvo una prevalencia de 12,86% con tuberculinización ano-caudal (Zambrano, M, 2013).

Finalmente, estudios realizados en Cotopaxi, muestran una prevalencia de 4,07% en 613 animales analizados, 0,38% en Carchi de 266 animales y 2,03% en Imbabura de 444 bovinos. En contraste a estos reportes, los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran por debajo de estos rangos (Basantes, I. y Maldonado, J., 2013).

En contraste a estos estudios, los resultados obtenidos en la presente investigación se encuentran por debajo de la mayoría de estos rangos, con excepción del realizado por Aguilar Gálvez Fernando. No obstante, es importante recalcar que de todos los estudios realizados en el país, el presente es el único en donde se considera una muestra amplia de bovinos y donde se corroboran las pruebas de campo con pruebas de laboratorio Gold Standard para evitar sesgos en el hallazgo de animales positivos.

Así mismo, los animales positivos a TBB se encuentran ampliamente distribuidos en todos los segmentos de cada variable demográfica, entonces, no se pueden asociar a un determinado factor. Por tal motivo se establece que no hay una relación estadísticamente significativa entre las variables demográficas y la presencia de la enfermedad.

Ahora bien, para paratuberculosis se obtuvo una prevalencia de 5,9% en un total de 1130 animales (59 positivos). Las prevalencias exactas de PTB en la gran parte de países latinoamericanos no ha sido claramente establecida (Corbett, De Jong, Orsel, De Buck, & Barkema, 2019).

Es por esto por lo que, el hecho de no conocer cuáles de los animales se encuentran infectados dentro de un determinado predio, provocar el conocido “efecto iceberg”, el cual hace referencia a que por cada bovino infectado en la etapa clínica de PTB, puede haber alrededor de 20 bovinos que se encuentren en etapa subclínica, diseminando una gran cantidad del agente dentro del hato (Infantes-Lorenzo et al., 2019). Así pues, se establece que los bovinos con signos clínicos representarían una pequeña cantidad de animales enfermos o infectados dentro de un mismo predio.

Respecto a estudios de PTB, en 2017 Lenin Guamán analizó 5047 bovinos entre 12 y 24 meses de edad pertenecientes a 714 hatos en las 4 regiones del Ecuador. Se obtuvo una prevalencia nacional de 1,72%. Ahora, la prevalencia desglosada fue de 2,05% en la región Costa (2391 animales), 1,64% en la Sierra (1703 animales), 1% en el Oriente (801 animales) y 1,32% en la región Insular (152 animales) (Guamán, 2017).

En comparación con el presente estudio, Guamán obtuvo que no existe una relación significativa con la edad de los bovinos para la enfermedad. Sin embargo, encontró que, de 87 animales positivos, 60 fueron hembras, pero esto no fue considerado como un factor predisponente en cuanto a la epidemiología de la infección.

Por otra parte, Cañas y Peñaloza analizaron 400 muestras de bovinos en las provincias de Azuay y Cañar correspondientes a 13 hatos. Se utilizó el método de ELISA indirecto y en Cañar se obtuvo una prevalencia de 6,72% (149 animales) y en Azuay una de 3,98% (251 animales).

En el Cantón Mejía, se analizaron 384 sueros sanguíneos seleccionados aleatoriamente y se obtuvo una prevalencia de 7,29% (Oña & Cajilema, 2012).

Así mismo, en la provincia de Azuay, en las parroquias Cumbe y Victoria del Portete, Sánchez inoculó PPD Aviar intradérmico en 432 animales y se obtuvo una prevalencia 6.02% (Cárdenas y Peñaloza, 2017).

Se puede establecer que tanto en estos estudios como en el presente se utiliza ELISA indirecto además de pruebas de campo para tener mayor precisión al momento del diagnóstico de cada animal. Sin embargo, en los otros estudios la muestra de animales es significativamente menor. Al igual que para TBB, los animales positivos se encuentran distribuidos en todas las categorías de las variables demográficas, evitando así, la asociación de la enfermedad a un determinado factor en específico.

Dada la ausencia de estudios relevantes en la región Costa del Ecuador a cerca de PTB, no se pueden establecer comparaciones relevantes con este trabajo.

Finalmente, para fiebre Q se obtuvo una prevalencia de 41,8% en un total de 1130 animales (473 positivos). La enfermedad está presente en casi la mitad de los animales y se encuentra distribuida en todas las categorías, afecta a cualquier raza, en cualquier edad, en diferente etapa reproductiva e independientemente de las veces que ha sido inseminada la vaca y de la cantidad de litros que hayan producido.

Cabe recalcar que estos resultados son exclusivos del predio en estudio, pues en otras haciendas, con otras condiciones ambientales, demográficas y de manejo, se podrían obtener diferentes resultados y pueden ser asociados a otros factores.

Ordoñez menciona en su estudio que, de las 2668 muestras de bovinos, obtuvo un 36,46% de animales positivos a fiebre Q. Hace mención a individuos de 386 rebaños, sin embargo, no especifica localización de estos. Lo importante aquí es que el porcentaje de prevalencia es sumamente elevado en los pocos estudios realizados en el Ecuador (Ordoñez, 2017). Esto hace referencia al limitado conocimiento que se tiene de esta enfermedad en el país. No existen fuentes de información para establecer comparaciones estrictas y determinantes. Por otro lado, en el 2012 Rojas realizó un estudio cuyo objetivo principal fue determinar la presencia de *Coxiella burnetti* tomando muestras de leche de bovinos en nueve provincias Ecuador, entre ellas, Carchi, Imbabura, Pichincha,

Cotopaxi, Chimborazo, Loja, Guayas, Pastaza y Galápagos. Para ello empleó la tecnología del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), en tiempo real mediante el método TaqMan para la detección de la bacteria. La autora recolectó 102 muestras en total y determinó que la utilización del PCR es un método de alta sensibilidad y especificidad para detección de la bacteria (Rojas, 2012). Sin embargo, no establece un porcentaje de la prevalencia de esta enfermedad.

En contraste con la presente investigación es importante mencionar que no existe en el país algún estudio con el que se puedan establecer comparaciones, pues los pocos existentes no se enfocan en la obtención de prevalencias o no trabajaron con una muestra de animales significativa.

Para concluir, las pruebas realizadas en campo y en laboratorio tienen congruencia, pues los resultados son similares para ambas en la mayoría de los casos y, en los resultados de campo dudosos, las pruebas de laboratorio corroboraron las sospechas.

Respecto al procedimiento, la prueba de campo (cervical simple), tuvo un gran porcentaje de animales sospechosos, por lo cual al momento de realizar una prueba cervical comparativa se obtuvo una mejor clasificación de animales infectados con TBB o con PTB.

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

En esta hacienda de alta producción lechera ubicada en el subtrópico ecuatoriano, se ha identificado para tuberculosis una prevalencia de 0.97% correspondiente a 11 animales de un total de 1130. Todos los positivos se encuentran distribuidos en diferentes categorías de las variables demográficas, es decir, diferente edad, raza, etapa reproductiva, producción de leche o cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca. No se atribuye la enfermedad a un determinado factor.

La utilización de interferón gamma en laboratorio corroboró efectivamente los resultados obtenidos en campo tanto de los animales positivos como de los sospechosos. Es por esto por lo que dicha prueba es considerada como Gold Standard. TBB es la enfermedad con menor prevalencia de las tres en cuestión.

En cuanto a paratuberculosis se ha identificado una prevalencia de 5.9% correspondiente a 59 animales de un total de 1130. Todos se encuentran distribuidos en diferentes categorías de las variables demográficas. No se atribuye la enfermedad a un determinado factor.

La ejecución de la prueba de campo, ELISA indirecto ha permitido evitar el sesgo en la obtención de resultados en cuanto al diagnóstico de cada animal. Haciéndolo un estudio confiable.

Finalmente, para fiebre Q se ha identificado una prevalencia de 41.8% correspondiente a 473 animales de un total de 1130. Todos se encuentran distribuidos en diferentes categorías de las variables demográficas. No se atribuye la enfermedad a un determinado factor. En otras palabras, al igual que TBB y PTB cualquier animal es susceptible a contraer la enfermedad, independientemente de sus características.

Hay que destacar que, al ser una enfermedad poco estudiada en el país, no se establecen criterios de control o medidas preventivas para esta enfermedad.

Este escrito corresponde al primer estudio realizado en un predio de Santo Domingo-Ecuador que contemple prevalencia de fiebre Q y es el primero en todo

el país en centrarse en estudios epidemiológicos transversales de tuberculosis, paratuberculosis y fiebre Q dentro de un mismo hato.

Acerca de manejo y sanidad, cabe recalcar que el buen control y manejo de los animales con TBB y PTB ha permitido que cese la diseminación de los agentes causales de la bacteria, evitando encontrar más animales enfermos y posiblemente reducir el riesgo para el personal trabajador sin consecuencias de contagio. No obstante, fiebre Q es un importante aspecto para tomar en cuenta dentro del ámbito de Salud Pública, pues al ser tan amplia su prevalencia, los animales y el personal de la hacienda corren peligro de contagio.

La estadística aplicada en este estudio arroja valores relativamente pequeños para el predio, exceptuando los valores de fiebre Q, cuya prevalencia está en aproximadamente la mitad de los animales. Epidemiológicamente hablando, esta hacienda se encuentra en una posición superior a las que se mencionan en otros estudios realizados en el país.

Se levantó una línea base y se realizó un análisis y descripción del estatus sanitario del predio respecto a estas tres enfermedades. Con esto en pie, se pueden realizar más estudios para corroborar esta información y determinar más efectos sobre estas enfermedades en esta zona del subtrópico.

5.2. Recomendaciones

Para el predio en estudio, tomando en cuenta la elevada prevalencia de fiebre Q y su connotación zoonótica, se recomienda realizar un análisis, con el objetivo de determinar las características en el predio que predisponen a los animales a infectarse con la bacteria. Asimismo, determinar las fuentes de la propagación o por qué medio está ingresando la enfermedad para evitar su diseminación.

Así mismo, se recomienda realizar exámenes de sangre a todo el personal de la hacienda que ha tenido contacto con los animales, independientemente del cargo que ejecuten. Será pieza fundamental para el trabajo de Salud Pública, pues existen altas posibilidades de que se encuentren con alguna de las enfermedades en cuestión y seas vectores de contagio tanto para sus familias y personas cercanas como para el resto de los animales, pues algunas de estas enfermedades son también antropozoonóticas.

Se deberá mantener el control estricto de TBB y PTB, tomando las medidas correctas y enviando a los animales enfermos a una zona aislada o directamente al matadero. Mediante el cumplimiento de estos procedimientos, se podría reducir el riesgo de diseminación de estas enfermedades en el hato.

Referencias

- Basybekov, S. Z., Bazarbayev, M. B., Yespembetov, B. A., Mussaeva, A., Kanatbayev, S. G., Romashev, K. M., ... Syrym, N. S. (2018). Diagnostics of tuberculosis and differentiation of nonspecific tuberculin reactions in animals. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(2), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.07.004>
- Bates, A., O'Brien, R., Liggett, S., & Griffin, F. (2019). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection on a New Zealand pastoral dairy farm. *BMC Veterinary Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2014-6>
- Camanes, G., Joly, A., Fourichon, C., Ben Romdhane, R., & Ezanno, P. (2018). Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach. *Veterinary Research*, *49*(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0557-3>
- Cesar, A., & Camacho, L. (n.d.). *Este trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal.*
- Chauhan, A. S., George, M. S., Lindahl, J., Grace, D., & Kakkar, M. (2019). Community, system and policy level drivers of bovine tuberculosis in smallholder periurban dairy farms in India: a qualitative enquiry. *BMC Public Health*, *19*(1), 301. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6634-3>
- Clegg, T. A., Doyle, M., Ryan, E., More, S. J., & Gormley, E. (2019). Characteristics of *Mycobacterium bovis* infected herds tested with the interferon-gamma assay. *Preventive Veterinary Medicine*, *168*, 52–59. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.04.004>
- Coad, M., Doyle, M., Steinbach, S., Gormley, E., Vordermeier, M., & Jones, G. (2019). Simultaneous measurement of antigen-induced CXCL10 and IFN- γ enhances test sensitivity for bovine TB detection in cattle. *Veterinary Microbiology*, *230*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2019.01.007>
- Corbett, C. S., De Jong, M. C. M., Orsel, K., De Buck, J., & Barkema, H. W. (2019). Quantifying transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among group-housed dairy calves. *Veterinary Research*, *50*(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0678-3>
- Cruzamientos para el trópico | CONtexto ganadero | Noticias principales sobre ganadería y agricultura en Colombia. (n.d.). Retrieved September 5, 2019, from <https://www.contextoganadero.com/blog/cruzamientos-para-el-tropico>
- DERMOJET MEDICAL HR Jeringa Intradérmica. (n.d.). Retrieved September 4, 2019, from <https://www.podoservice.es/919-dermojet-medical-hr-jeringa->

intradermica.html

- Fajardo-Gutiérrez, A., & Fajardo-Gutiérrez, A. (2017). Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto. *Revista Alergia México*, *64*(1), 109. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i1.252>
- Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., Duggan, J., & Snary, E. L. (2015). Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(5), 1083–1095. <https://doi.org/10.1111/jam.12778>
- Gao, Y., Jiang, J., Yang, S., Cao, J., Han, B., Wang, Y., ... Sun, D. (2018). Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics*, *19*. <https://doi.org/10.1186/S12864-018-5385-3>
- Infantes-Lorenzo, J. A., Moreno, I., Roy, A., Risalde, M. A., Balseiro, A., de Juan, L., ... Domínguez, M. (2019). Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1814-z>
- Konboon, M., Bani-Yaghoub, M., Pithua, P. O., Rhee, N., & Aly, S. S. (2018). A nested compartmental model to assess the efficacy of paratuberculosis control measures on U.S. dairy farms. *PloS One*, *13*(10), e0203190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203190>
- López, R. S., López, R. S., Calampa, N. J. R., Castillo, E. B., Chchiple, M. E. M., & Oliva, M. (2017). Microzonificación agroecológica de sistemas agrosilvopastoriles empleando un modelo de procesamiento basado en SIG en parcelas en la provincia de Bongará, Amazonas (Perú). *Revista de Investigación En Agroproducción Sustentable*, *1*(2), 40–50. <https://doi.org/10.25127/aps.20172.361>
- Meyer, A., McAloon, C. G., Tratalos, J. A., More, S. J., Citer, L. R., Graham, D. A., & Sergeant, E. S. G. (2019). Modeling of alternative testing strategies to demonstrate freedom from *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection in test-negative dairy herds in the Republic of Ireland. *Journal of Dairy Science*, *102*(3), 2427–2442. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-14883>
- Michelet, L., de Cruz, K., Karoui, C., Tambosco, J., Moyon, J.-L., Hénault, S., & Boschioli, M. L. (2018). Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. *PloS One*, *13*(11), e0207614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207614>
- Miller, C. H. T., Maher, S. G., & Young, H. A. (2009). Clinical Use of Interferon- γ . *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1182*(1), 69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05069.x>
- Mohabbati Mobarez, A., Bagheri Amiri, F., & Esmaeili, S. (2017). Seroprevalence of Q fever among human and animal in Iran; A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(4), e0005521. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005521>
- Peraile Muñoz, I., Lorenzo Lozano, P., Gil García, M., González López, L., Cabria

- Ramos, J. C., Jiménez Pérez, M. V., ... Jiménez Pérez, M. V. (2017). Protocolo para la identificación rápida y sensible de ricina en muestras ambientales ante una alerta biológica. *Sanidad Militar*, 73(3), 153–157. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712017000300003>
- Pisanu, S., Cubeddu, T., Cacciotto, C., Pilicchi, Y., Pagnozzi, D., Uzzau, S., ... Addis, M. F. (2018). Characterization of paucibacillary ileal lesions in sheep with subclinical active infection by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary Research*, 49(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0612-0>
- Praud, A., Boireau, C., & Dufour, B. (2016). Sensitivity of γ -interferon test used in series after tuberculin test to detect bovine tuberculosis. *Veterinary Record*, 179(7), 174.2-174. <https://doi.org/10.1136/vr.103803>
- Proaño-Pérez, F., Benítez-Ortiz, W., Portaels, F., Rigouts, L., & Linden, A. (n.d.). Temas de actualidad / Current topics Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. In *Rev Panam Salud Publica* (Vol. 30). Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/9451/v30n3a13.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Quevedo Ricardi, F. (2011). The chi-square. *Medwave*, 11(12), e5266–e5266. <https://doi.org/10.5867/medwave.2011.12.5266>
- Razaghi, A., Owens, L., & Heimann, K. (2016). Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 240, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>
- Sá-Leão, R., & Tomasz, A. (2009). *Streptococcus Pneumoniae*. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 304–317). <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00207-8>
- Seo, M.-G., Kwon, O.-D., & Kwak, D. (2019). Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in Cattle on Ulleung Island, Korea: A Population-based Study with Four Years of Follow Up. *The Korean Journal of Parasitology*, 57(1), 69–73. <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.1.69>
- UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. (2017).
- Verteramo Chiu, L. J., Tauer, L. W., Smith, R. L., & Grohn, Y. T. (2019). Assessment of the bovine tuberculosis elimination protocol in the United States. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2384–2400. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14990>
- Wang, M., & Woods, C. M. (2017). Anchor Selection Using the Wald Test Anchor-All-Test-All Procedure. *Applied Psychological Measurement*, 41(1), 17–29. <https://doi.org/10.1177/0146621616668014>

OTRAS REFERENCIAS

Andrade, D. (2016). *SITUACIÓN ACTUAL DE LA BRUCELOSIS Y TUBERCULOSIS BOVINA EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS*. Recuperado el 23 de diciembre del 2019 de <http://dspace.esepoch.edu.ec/bitstream/123456789/5350/1/17T1383.pdf>

Benavides, B. (2014). *Estudio epidemiológico de paratuberculosis bovina en hatos lecheros del sur de Nariño, Colombia*. Recuperado el 11 de febrero del 2020 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n31/n31a06.pdf>

Cárdenas, A. & Peñaloza, V. (2017). *Prevalencia de anticuerpos para Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en hatos lecheros de la sierra sur del Ecuador (Azuay - Cañar)*. Recuperado el 23 de febrero del 2020 de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26284/1/TESIS.pdf.pdf>

Guamán, R. (2017). *DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS ENTRE 12 Y 24 MESES DE EDAD EN ECUADOR*. Recuperado el 21 de diciembre del 2019 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10152/1/T-UC-0014-015-2017.pdf>

Iowa State University. (2010) *Tuberculosis bovina*. Recuperado el 11 de febrero del 2020 de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovine_tuberculosis-es.pdf

Oña, D. (2015). *Diagnóstico de paratuberculosis bovina en vacas lecheras del Cantón Mejía utilizando un ELISA indirecto*. Recuperado el 11 de febrero del 2020 de http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/23851/1/Actas_Producci%20Animal_36.pdf

Ordóñez, L. (2017). *Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes reproductivos del ganado bovino (Brucella spp., Coxiella burnetii, Leptospira interrogans serovar Hardjo y Neospora caninum) en explotaciones*

lecheras y de doble propósito de Ecuador. Recuperado el 21 de diciembre del 2019 de <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/15109>

Rojas, M. (2012). *Detección de Coxiella burnetii en leche de bovinos del Ecuador*. Recuperado el 23 de diciembre del 2019 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1513/1/102407.pdf>

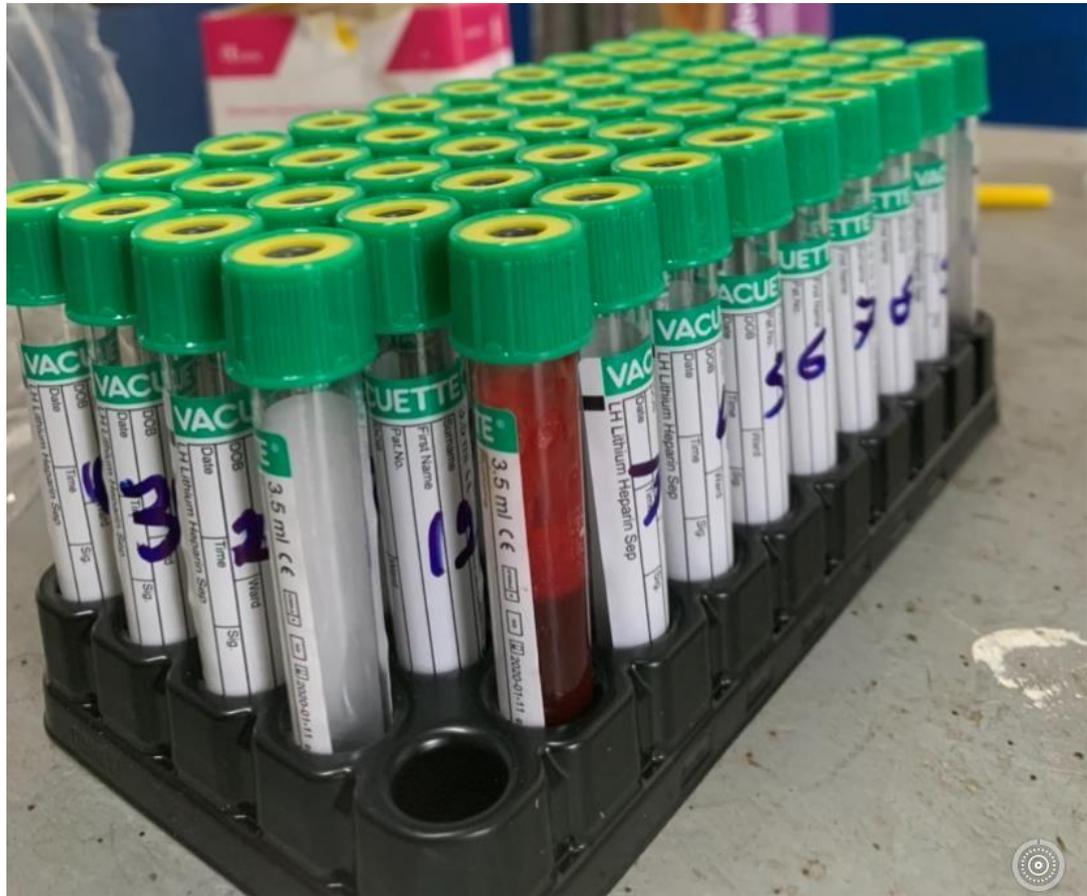
Tixi, R. L. (2017). *Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en bovinos entre 12 y 24 meses de edad en Ecuador*. Tesis de grado, UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Quito – Ecuador.

ANEXOS

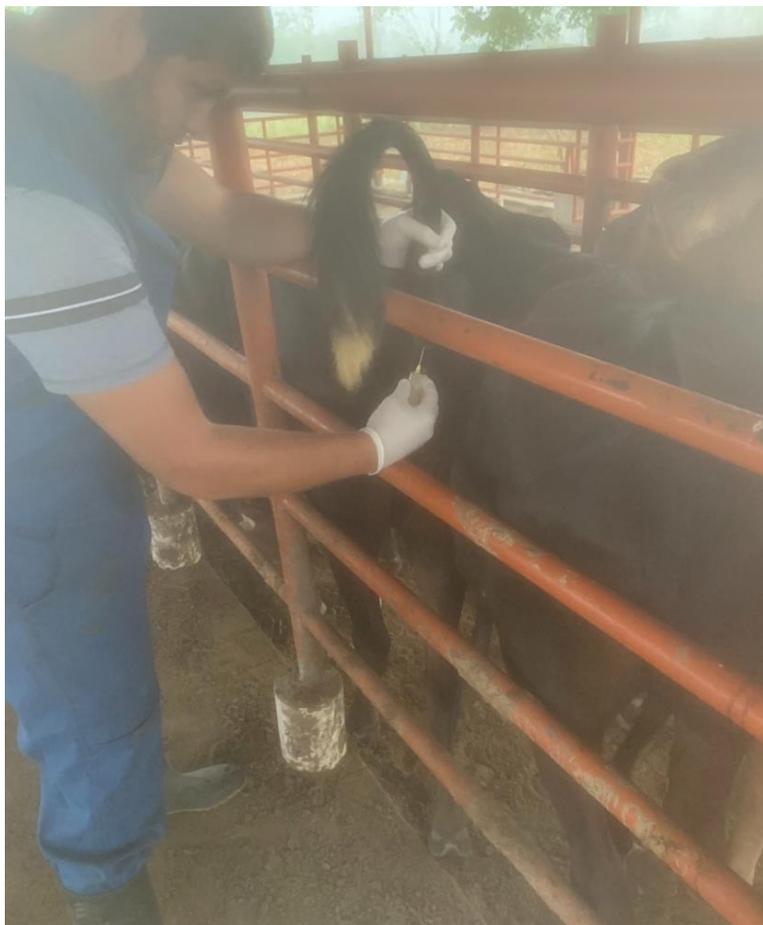
ANEXO 1



ANEXO 2



ANEXO 3



ANEXO 4



ANEXO 5



ANEXO 6



ANEXO 7

1	Nro ID	RAZA	EDAD	ETAPA REPRO	PDL TOTALES	VINS	TB
2	33181	JERSEY	13	SECA	4800	4	1
3	24249	SAHIWAL	7	PREÑADA	3240	1	1
4	31723	JERSEY	6	PREÑADA	1470	2	1
5	32615	JERSEY	6	SECA	3180	1	1
6	28880	JERSEY	6	FRESCA	1290	0	1
7	25004	JERSEY	6	SECA	1280	1	1
8	25133	SAHIWAL	5	PREÑADA	1270	1	1
9	12885	JERSEY	5	INSEMIN	2510	4	1
10	16930	JERSEY	5	INSEMIN	2410	4	1
11	12444	JERSEY	5	INSEMIN	1350	1	1
12	38813	JERSEY	5	INSEMIN	1060	1	1

ANEXO 8

Regresión Logística TBB

Posterior al procedimiento realizado en el laboratorio, se procedió al análisis estadístico. En este caso al utilizar la Regresión Logística se predijo el resultado de una variable categórica en función de las diferentes variables independientes, es decir, se analizó la relación existente entre edad, raza, número de veces inseminada una vaca, cantidad de litros de leche totales producidos y la etapa reproductiva de los animales. Por tal motivo se realizó regresión logística en las tres enfermedades discutidas en el proyecto.

Tabla 1 Relación entre tuberculosis y la edad de los animales (el intercepto corresponde a TBB).

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-3.803	0.895	-4.251	18.073	1	< .001
EDAD	-0.124	0.134	-0.925	0.856	1	0.355

Note. TB level '1' coded as class 1.

La tabla representa una comparación entre la edad de los animales respecto a la tuberculosis, los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre las dos variables, pues el resultado es mayor a 0.05. Dado esto se establece que no existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 2 Relación entre tuberculosis y la raza (el intercepto corresponde a la raza Gyr).

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-17.566	1192.833	-0.015	2.169e -4	1	0.988
RAZA (JERSEY)	13.180	1192.833	0.011	1.221e -4	1	0.991
RAZA (SAHIWAL)	12.306	1192.833	0.010	1.064e -4	1	0.992

Note. TB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre las tres razas presentes en el hato de estudio y tuberculosis, tanto los valores de la estadística de Wald como el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre las razas, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 3 Relación entre tuberculosis y la producción de litros totales (lactancias hasta la fecha).

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-4.337	0.501	-8.650	74.814	1	< .001
PDL TOTALES	-0.000	0.000	-0.661	0.437	1	0.509

Note. TB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre la cantidad de litros totales que produjeron los animales hasta la fecha de análisis y tuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 4 Relación entre tuberculosis y la etapa reproductiva de los animales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión)

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-4.949	1.004	-4.931	24.318	1	< .001
ETAPA REPRO (INSEMIN)	0.384	1.122	0.343	0.117	1	0.732
ETAPA REPRO (MACHO)	-14.617	7604.236	-0.002	3.695e -6	1	0.998
ETAPA REPRO (NOINSEM)	-14.617	1463.436	-0.010	9.977e -5	1	0.992
ETAPA REPRO (PRE.ADA)	0.324	1.159	0.279	0.078	1	0.780
ETAPA REPRO (SECA)	0.843	1.160	0.727	0.528	1	0.467
ETAPA REPRO (VACIA)	-14.617	1520.847	-0.010	9.238e -5	1	0.992

Note. TB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre las diferentes etapas reproductivas por las que cursaron hasta la fecha de análisis los individuos del predio y tuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia

significa entre los parámetros asociados, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 5 Relación entre tuberculosis y la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients				Wald Test		
	Estimate	Standard Error	z	Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-4.640	0.441	-10.519	110.656	1	< .001
VINS	0.010	0.176	0.057	0.003	1	0.955

Note. TB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca y tuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 6 Relación entre tuberculosis y paratuberculosis (el intercepto corresponde a TB).

Coefficients				Wald Test		
	Estimate	Standard Error	z	Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-4.568	0.303	-15.073	227.188	1	< .001
PTB (1)	-14.998	1400.053	-0.011	1.148e -4	1	0.991

Note. TB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre paratuberculosis y tuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre

ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 7 Relación entre tuberculosis y fiebre Q (el intercepto corresponde a TB).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-4.531	0.380	-11.924	142.184	1	< .001
FQ (1)	-0.233	0.630	-0.370	0.137	1	0.711

Note. TB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre fiebre Q y tuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

REGRESION LOGISTICA PTB

Tabla 8 Relación entre paratuberculosis y la edad de los animales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión)

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-3.131	0.409	-7.654	58.577	1	< .001
EDAD	0.033	0.054	0.607	0.369	1	0.544

Note. PTB level '1' coded as class 1.

La tabla representa una comparación entre la edad de los animales respecto a la paratuberculosis, los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que

no hay diferencia significativa entre las dos variables, pues el resultado es mayor a 0.05. Dado esto se establece que no existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 9 Relación entre paratuberculosis y la raza (el intercepto corresponde a la raza Gyr).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-16.566	723.490	-0.023	5.243e-4	1	0.982
RAZA (JERSEY)	13.513	723.490	0.019	3.488e-4	1	0.985
RAZA (SAHIWAL)	13.935	723.490	0.019	3.710e-4	1	0.985

Note. PTB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre las tres razas presentes en el hato de estudio y paratuberculosis, tanto los valores de la estadística de Wald como el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre las razas, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 10 Relación entre paratuberculosis y la producción de litros totales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-2.883	0.225	-12.819	164.331	1	< .001
PDL TOTALES	-0.000	0.000	-0.086	0.007	1	0.931

Note. PTB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre la cantidad de litros totales que produjeron los animales hasta la fecha de análisis y paratuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre

ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 11 Relación entre paratuberculosis y la etapa reproductiva de los animales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-3.121	0.417	-7.481	55.971	1	< .001
ETAPA REPRO (INSEMIN)	0.038	0.485	0.078	0.006	1	0.938
ETAPA REPRO (MACHO)	-11.445	624.194	-0.018	3.362e -4	1	0.985
ETAPA REPRO (NOINSEM)	0.288	0.726	0.396	0.157	1	0.692
ETAPA REPRO (PRE.ADA)	0.145	0.494	0.294	0.087	1	0.769
ETAPA REPRO (SECA)	0.538	0.507	1.062	1.129	1	0.288
ETAPA REPRO (VACIA)	0.924	0.629	1.467	2.153	1	0.142

Note. PTB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre las diferentes etapas reproductivas por las que cursaron hasta la fecha de análisis los individuos del predio y paratuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre los parámetros asociados, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 12 Relación entre paratuberculosis y la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-2.881	0.195	-14.804	219.158	1	< .001
VINS	-0.010	0.080	-0.124	0.015	1	0.901

Note. PTB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca y paratuberculosis. Los valores de la estadística de Wald

y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 13 Relación entre paratuberculosis y tuberculosis (el intercepto corresponde a PTB).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-2.888	0.134	-21.594	466.303	1	< .001
TB (1)	-13.678	723.490	-0.019	3.574e-4	1	0.985

Note. PTB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre tuberculosis y paratuberculosis. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 14 Relación entre paratuberculosis y fiebre Q (el intercepto corresponde a PTB).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-2.878	0.174	-16.565	274.396	1	< .001
FQ (1)	-0.051	0.272	-0.189	0.036	1	0.850

Note. PTB level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación paratuberculosis y fiebre Q. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

REGRESION LOGISTICA FQ

Tabla 15 Relación entre fiebre Q y la edad de los animales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-0.347	0.183	-1.898	3.602	1	0.058
EDAD	0.003	0.025	0.106	0.011	1	0.915

Note. FQ level '1' coded as class 1.

La tabla representa una comparación entre la edad de los animales respecto a la fiebre Q, los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre las dos variables, pues el resultado es mayor a 0.05. Dado esto se establece que no existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 16 Relación entre fiebre Q y la raza (el intercepto corresponde a la raza Gyr).

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-1.504	0.782	-1.924	3.702	1	0.054
RAZA (JERSEY)	1.190	0.785	1.515	2.296	1	0.130
RAZA (SAHIWAL)	1.176	0.788	1.491	2.223	1	0.136

Note. FQ level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre las tres razas presentes en el hato de estudio y fiebre Q, tanto los valores de la estadística de Wald como el p-valor

indican que no hay diferencia significativa entre las razas, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 17 Relación entre fiebre Q y la producción de litros totales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-0.325	0.101	-3.210	10.307	1	0.001
PDL TOTALES	-0.000	0.000	-0.038	0.001	1	0.969

Note. FQ level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre la cantidad de litros totales que produjeron los animales hasta la fecha de análisis y fiebre Q. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 18 Relación entre fiebre Q y la etapa reproductiva de los animales (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-0.226	0.169	-1.340	1.795	1	0.180
ETAPA REPRO (INSEMIN)	-0.128	0.198	-0.646	0.417	1	0.518
ETAPA REPRO (MACHO)	-13.340	378.593	-0.035	0.001	1	0.972
ETAPA REPRO (NOINSEM)	-0.551	0.338	-1.630	2.658	1	0.103
ETAPA REPRO (PRE.ADA)	-0.228	0.205	-1.110	1.233	1	0.267
ETAPA REPRO (SECA)	0.194	0.224	0.866	0.749	1	0.387
ETAPA REPRO (VACIA)	-0.015	0.331	-0.045	0.002	1	0.964

Note. FQ level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre las diferentes etapas reproductivas por las que cursaron hasta la fecha de análisis los individuos del predio y fiebre Q. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia

significa entre los parámetros asociados, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 19 Relación entre fiebre Q y la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca (el intercepto corresponde a la enfermedad en cuestión).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-0.321	0.088	-3.656	13.366	1	< .001
VINS	-0.004	0.036	-0.120	0.014	1	0.904

Note. FQ level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca y fiebre Q. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 20 Relación entre fiebre Q y tuberculosis (el intercepto corresponde a fiebre Q).

Coefficients						
	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-0.326	0.061	-5.387	29.019	1	< .001
TB (1)	-0.233	0.630	-0.370	0.137	1	0.711

Note. FQ level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación entre tuberculosis y fiebre Q. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre

ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tabla 21 Relación entre fiebre Q y paratuberculosis (el intercepto corresponde a fiebre Q).

Coefficients

	Estimate	Standard Error	z	Wald Test		
				Wald Statistic	df	p
(Intercept)	-0.326	0.062	-5.263	27.699	1	< .001
PTB (1)	-0.051	0.272	-0.189	0.036	1	0.850

Note. FQ level '1' coded as class 1.

Se establece una comparación paratuberculosis y fiebre Q. Los valores de la estadística de Wald y el p-valor indican que no hay diferencia significativa entre ambas variables, pues el resultado es mayor a 0.05. No existe una fuerte correlación entre ambos.

Tablas de contingencia y Chi-cuadrado

Tuberculosis

En estadística al momento de tabular datos se pueden utilizar las tablas de contingencia, que se emplean con el fin de registrar y hacer un análisis de la relación entre dos o más variables categóricas. Para complementar los resultados de las tablas de contingencia es necesario utilizar a la par una prueba exacta de Fisher o Chi-cuadrado (prueba utilizada en el trabajo) con el fin de determinar si los conteos observados en las tablas difieren significativamente o no de cada uno de los conteos esperados bajo la hipótesis de que no exista asociación. A continuación, se exponen las tablas de contingencia con su respectivo Chi-cuadrado para cada una de las relaciones y variables de las tres enfermedades.

Tabla 22 La relación entre TB y la edad de los animales no presentan diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	21.2	14	0.097
N	1130		

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y la edad de los animales estudiados. El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p- valor mayor 0.05

Tabla 23 Relación entre TB y la raza de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

TB	RAZA			Total
	GYR	JERSEY	SAHIWAL	
0	11	723	385	1119
1	0	9	2	11
Total	11	732	387	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y las tres razas presentes en el predio.

Tabla 24 Relación entre TB y la raza de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	1.44	2	0.486
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 25 Relación entre TB y la etapa reproductiva de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

TB	ETAPA REPRO							Total
	FRESCA	INSEMIN	MACHO	NOINSEM	PREÑADA	SECA	VACIA	
0	141	384	2	54	306	182	50	1119
1	1	4	0	0	3	3	0	11
Total	142	388	2	54	309	185	50	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y la etapa reproductiva de los individuos en estudio.

Tabla 26 Relación entre TB y la etapa reproductiva de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	1.97	6	0.923
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 27 Relación entre TB y las veces que ha sido inseminada una vaca, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

TB	VINS												Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
0	216	374	275	119	62	26	20	10	6	8	1	1	1	1119
1	1	6	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	11
Total	217	380	276	119	65	26	20	10	6	8	1	1	1	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y las veces que ha sido inseminada una vaca.

Tabla 28 Relación entre TB y las veces que ha sido inseminada una vaca, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	13.9	12	0.305
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 29: Relación entre TB y PTB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

TB	PTB		Total
	0	1	
0	1060	59	1119
1	11	0	11
Total	1071	59	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y paratuberculosis

Tabla 30: Relación entre TB y PTB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	0.612	1	0.434

χ^2 Tests

	Value	df	p
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 31 Relación entre TB y fiebre Q, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

	FQ		
TB	0	1	Total
0	650	469	1119
1	7	4	11
Total	657	473	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y paratuberculosis.

Tabla 32 Relación entre TB y fiebre Q, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	P
χ^2	0.138	1	0.710
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Paratuberculosis

Tabla 33 Relación entre PTB y la edad de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

PTB	EDAD															Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	6	1	51	110	158	188	147	149	85	73	69	15	12	4	3	1071
1	0	0	1	6	13	8	7	8	5	1	8	1	1	0	0	59
Total	6	1	52	116	171	196	154	157	90	74	77	16	13	4	3	1130

La tabla representa una comparación entre paratuberculosis y la edad de los animales estudiados.

Tabla 34 Relación entre PTB y la edad de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	P
χ^2	11.1	14	0.675
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 35 Relación entre PTB y la raza de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

PTB	RAZA			Total
	GYR	JERSEY	SAHIWAL	
0	11	699	361	1071
1	0	33	26	59
Total	11	732	387	1130

La tabla representa una comparación entre paratuberculosis y las tres razas presentes en el predio.

Tabla 36 Relación entre PTB y la raza de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	3.11	2	0.211
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 37 Relación entre PTB y la etapa reproductiva de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

PTB	ETAPA REPRO							Total
	FRESCA	INSEMIN	MACHO	NOINSEM	PREÑADA	SECA	VACIA	
0	136	371	2	51	294	172	45	1071
1	6	17	0	3	15	13	5	59
Total	142	388	2	54	309	185	50	1130

La tabla representa una comparación entre paratuberculosis y la etapa reproductiva de los animales.

Tabla 38 Relación entre PTB y la etapa reproductiva de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	4.57	6	0.600
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 39 Relación entre PTB y las veces que ha sido inseminada una vaca, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

PTB	VINS												Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
0	207	357	262	115	63	22	19	9	6	8	1	1	1	1071
1	10	23	14	4	2	4	1	1	0	0	0	0	0	59
Total	217	380	276	119	65	26	20	10	6	8	1	1	1	1130

La tabla representa una comparación entre paratuberculosis y las veces que ha sido inseminada una vaca.

Tabla 40 Relación entre PTB y las veces que ha sido inseminada una vaca, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	8.97	12	0.705
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 41 Relación entre PTB y TB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa

PTB	TB		Total
	0	1	
0	1060	11	1071
1	59	0	59
Total	1119	11	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y paratuberculosis.

Tabla 42 Relación entre PTB y TB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	0.612	1	0.434
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 43 Relación entre PTB y fiebre Q, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

PTB	FQ		Total
	0	1	
0	622	449	1071
1	35	24	59
Total	657	473	1130

La tabla representa una comparación entre tuberculosis y fiebre Q.

Tabla 44 Relación entre PTB y fiebre Q, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	P
χ^2	0.0356	1	0.850
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Fiebre Q

Tabla 45 Relación entre fiebre Q y la edad de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

FQ	IDAD													1 4	1 5	Tot al
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
0	5	1	3	6	9	1	9	8	5	4	4	8	1	2	1	65
			6	3	9	1	1	3	6	4	6		1			7
1	1	0	1	5	7	8	6	7	3	3	3		8	2	2	47
			6	3	2	5	3	4	4	0	1					3
To			5	1	1	1	1	1		9	7	7	1	1		11
tal	6	1	2	1	7	9	5	5	0	4	7	6	3	4	3	30

La tabla representa una comparación entre fiebre Q y la edad de los animales.

Tabla 46 Relación entre fiebre Q y la edad de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	13.4	14	0.492
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 47 Relación entre fiebre Q y la raza de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

FQ	RAZA			Total
	GYR	JERSEY	SAHIWAL	
0	9	423	225	657
1	2	309	162	473
Total	11	732	387	1130

La tabla representa una comparación entre fiebre Q y la raza de los animales.

Tabla 48 Relación entre fiebre Q y la raza de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	2.57	2	0.276
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 49 Relación entre fiebre Q y la etapa reproductiva de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

FQ	ETAPA REPRO							Total
	FRESCA	INSEMIN	MACHO	NOINSEM	PREÑADA	SECA	VACIA	
0	79	228	2	37	189	94	28	657
1	63	160	0	17	120	91	22	473
Total	142	388	2	54	309	185	50	1130

La tabla representa una comparación entre fiebre Q y la etapa reproductiva de los individuos del predio.

Tabla 50 Relación entre fiebre Q y la etapa reproductiva de los animales, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	9.60	6	0.143
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 51 Relación entre fiebre Q y las veces que ha sido inseminada una vaca, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

FQ	VINS												Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
0	130	217	159	67	38	19	11	6	5	3	1	1	0	657
1	87	163	117	52	27	7	9	4	1	5	0	0	1	473
Total	217	380	276	119	65	26	20	10	6	8	1	1	1	1130

La tabla representa una comparación entre fiebre Q y la cantidad de veces que ha sido inseminada una vaca.

Tabla 52 Relación entre fiebre Q y las veces que ha sido inseminada una vaca, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	8.92	12	0.710
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 53 Relación entre fiebre Q y TB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

FQ	TB		Total
	0	1	
0	650	7	657
1	469	4	473
Total	1119	11	1130

La tabla representa una comparación entre fiebre Q y tuberculosis.

Tabla 54 Relación entre fiebre Q y TB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa.

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	0.138	1	0.710
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Tabla 55 Relación entre fiebre Q y PTB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa

FQ	PTB		Total
	0	1	
0	622	35	657
1	449	24	473
Total	1071	59	1130

La tabla representa una comparación entre fiebre Q y paratuberculosis.

Tabla 56 Relación entre fiebre Q y PTB, el Chi-cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa

χ^2 Tests

	Value	df	p
χ^2	0.0356	1	0.850
N	1130		

El resultado del Chi-cuadrado demuestra que no existe diferencia significativa entre ambas variables al ser comparadas, arrojando un p-valor mayor 0.05.

Posteriormente a correr las pruebas estadísticas en cada una de las relaciones con sus respectivas variables, se obtuvo el mismo resultado en absolutamente todos los análisis, por tal motivo no se realizan comentarios en cada una de las tablas.

Los resultados mostrados por el Chi-cuadrado son mayores a un p valor de 0.005, por lo cual se establece que no existe una relación significativa en ninguna

de las comparaciones y variables de las tres enfermedades estudiadas en este trabajo.

Ecuación de Rogan y Gladen

Tuberculosis

Mediante esta herramienta se calcularon los datos de prevalencia aparente y prevalencia real, en donde P' corresponde a la prevalencia aparente y P a la prevalencia real. Cabe recalcar que el intervalo de confianza (IC) para la prevalencia aparente y real corresponde al 95%:

$$P' = \frac{11}{1130} = 0,0097$$

$$P = \frac{P' + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

$$P = \frac{0,97 + 98 - 1}{98 + 99 - 1}$$

$$P = 0,49 \%$$

13.3.2. Paratuberculosis

$$P' = \frac{59}{1130} = 0,052$$

$$P = \frac{P' + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

$$P = \frac{0,052 + 99 - 1}{98 + 99 - 1}$$

$$P = 0,5 \%$$

13.3.3. Fiebre Q

$$P' = \frac{473}{1130} = 0,418$$

$$P = \frac{P' + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

$$P = \frac{0,418 + 99 - 1}{98 + 99 - 1}$$

$$P = 50,21 \%$$

Intervalos de confianza

Tuberculosis

Los intervalos de confianza corresponden a una gran parte de la estadística que se relaciona con un rango que se utiliza con fines de estimación. Estos manejan la propiedad de un determinado nivel confianza de que el parámetro de población correspondiente, en este caso la proporción de la población, se encuentre contenido de él.

Para conocer la proporción de la muestra se realizó el cálculo en función del tamaño de esta, es decir, número total de la muestra (N) = 1130 y el número de casos positivos de la enfermedad (X) = 11

$$\hat{p} = \frac{X}{N} = \frac{11}{1130} = 0.01$$

El valor crítico corresponde a los resultados asociados a la distribución normal. Los valores críticos dados son: $Z_c = Z_{1 - \alpha/2}$.

El objetivo de este intervalo de confianza es que la distribución muestral de las proporciones debería seguir una distribución normal aproximada. El valor crítico

en este caso para $\alpha = 0.05$ es $z_c = z_{1 - \alpha/2} = 1.96$. El intervalo de confianza correspondiente se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 CI(\text{Proportion}) &= \left(\hat{p} - z_c \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}}, \hat{p} + z_c \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}} \right) \\
 &= \left(0.01 - 1.96 \times \sqrt{\frac{0.01(1 - 0.01)}{1130}}, 0.01 + 1.96 \times \sqrt{\frac{0.01(1 - 0.01)}{1130}} \right) \\
 &= (0.004, 0.015)
 \end{aligned}$$

Por lo tanto, en base los datos proporcionados, el intervalo de confianza del 95% para la proporción de la población corresponde a $0.004 < p < 0.015$, lo cual indica que se tiene un 95% de seguridad de que la verdadera proporción de la población positiva está contenida en el intervalo (0.004, 0.015).

Paratuberculosis

Para conocer la proporción de la muestra se realizó el cálculo en función del tamaño de esta, es decir, número total de la muestra (N) = 1130 y el número de casos positivos de la enfermedad (X) = 59

$$\hat{p} = \frac{X}{N} = \frac{59}{1130} = 0.052$$

El valor crítico en este caso para $\alpha = 0.05$ es $z_c = z_{1 - \alpha/2} = 1.96$. El intervalo de confianza correspondiente se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 CI(\text{Proportion}) &= \left(\hat{p} - z_c \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}}, \hat{p} + z_c \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}} \right) \\
 &= \left(0.052 - 1.96 \times \sqrt{\frac{0.052(1 - 0.052)}{1130}}, 0.052 + 1.96 \times \sqrt{\frac{0.052(1 - 0.052)}{1130}} \right) \\
 &= (0.039, 0.065)
 \end{aligned}$$

El intervalo de confianza del 95% para la proporción de la población corresponde a $0.039 < p < 0.065$, lo cual indica que se tiene un 95% de seguridad de que la

verdadera proporción de la población positiva a está contenida en el intervalo (0.039,0.065)

Fiebre Q

Para conocer la proporción de la muestra se realizó el cálculo en función del tamaño de esta, es decir, número total de la muestra (N) = 1130 y el número de casos positivos de la enfermedad (X) = 473

$$\hat{p} = \frac{X}{N} = \frac{473}{1130} = 0.419$$

El valor crítico en este caso para $\alpha = 0.05$ es $z_c = z_{1 - \alpha/2} = 1.96$. El intervalo de confianza correspondiente se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} CI(\text{Proportion}) &= \left(\hat{p} - z_c \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}}, \hat{p} + z_c \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}} \right) \\ &= \left(0.419 - 1.96 \times \sqrt{\frac{0.419(1 - 0.419)}{1130}}, 0.419 + 1.96 \times \sqrt{\frac{0.419(1 - 0.419)}{1130}} \right) \\ &= (0.39, 0.447) \end{aligned}$$

El intervalo de confianza del 95% para la proporción de la población corresponde a $0.39 < p < 0.447$, lo cual indica que se tiene un 95% de seguridad de que la verdadera proporción de la población positiva está contenida en el intervalo (0.39,0.447).

