



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la Obtención del Título de:

MÉDICO VETERINARIO

MODALIDAD TRABAJO COMUNITARIO

TEMA:

Implementación de equipos para la realización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en el laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias

AUTORES:

ZAMORA ARTEAGA JESSICA LICETH

SORIANO ROCA GALO DANIEL

TUTOR:

Dr. VÍCTOR MONTES ZAMBRANO PhD

Santa Ana-Manabí- Ecuador

2022

DEDICATORIA 1

A Dios por darme la vida y haberme permitido llegar hasta este punto de mi vida. Haberme guiado por el camino del bien, por los triunfos y los momentos difíciles por los cuales eh podido aprender a valorarme cada día más. A mis padres que gracias a su comprensión y paciencia me alentaron para seguir y cumplir con mi propósito, porque siempre son mi motivo para seguir adelante, en especial mi madre que siempre ha estado para escucharme en los buenos y en los malos momentos, mamá esto te lo dedico, porque cada uno de mis logros siempre son pensando en ti. A mi papá que siempre lo he visto como un ejemplo a seguir por ser una persona muy trabajadora y que me ha apoyado siempre demostrándome que todos con esfuerzo se puede lograr. Al tutor de tesis que me ha incentivado todo este tiempo con sus consejos, paciencia, tiempo para escuchar cada una de mis dudas colaborándome y orientándome para que el trabajo realizado llegase a tener el éxito deseado. A mi familia en general, gracias a todos que directamente me impulsaron y motivaron para seguir adelante porque siempre he contado con ellos en todo momento, gracias por la confianza que siempre nos hemos tenido.

DANIEL SORIANO ROCA

DEDICATORIA 2

Este trabajo de tesis lo dedico a Dios por darme la fuerza y fortaleza necesaria para no rendirme en ningún momento por más complicado que pudiera ser.

A mis padres y hermanos por su apoyo infinito, en especial a mi querida madre por ser el pilar fundamental en mi vida por ser mi guía, mi cómplice y mi amiga incondicional en todos los pasos que doy tanto en mi vida personal como profesional.

A mis Docentes que una y otra manera supieron guiarme en todo momento de los cuales me llevo un grato recuerdo.

A mi tutor de tesis por darme la oportunidad de poder trabajar con él y sobre todo por su paciencia, comprensión y dedicación aprendí mucho de sus conocimientos impartidos.

Sin dejar de lado a las personas que ya no forman parte de mi vida, pero estuvieron hay siempre brindándome su apoyo y dándome ánimos para no decaer en ningún momento, a mis amigos de la carrera que fueron pocos y de los cuales me llevo de ellos lindos recuerdo y una amistad que espero perdure por siempre.

JESSICA ZAMORA ARTEAGA

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por sobre todas las cosas, por darnos vida, tranquilidad, salud, dedicación, constancia por permitirnos cumplir nuestros sueños y por concluir con esta etapa en nuestra vida.

Queremos agradecer infinitamente a nuestros padres y hermanos por ser el motor de nuestras vidas, por su paciencia, amor, y por ser las personas que nos motivan día a día.

A la Universidad Técnica de Manabí por habernos concedido una beca de titulación para finalizar nuestro trabajo y poder cumplir en parte los requerimientos del área molecular de Leptospira.

A nuestro tutor Dr. Víctor Montes Zambrano, un agradecimiento sincero y profundo, por ser el responsable para que este trabajo se realice, gracias a sus constantes consejos, tiempo, dedicación y apoyo incondicional desde el inicio hasta la finalización de la tesis.

Al proyecto de investigación titulado “Leptospiras patógenas presentes en animales domésticos y silvestres de tres cantones de la provincia de Manabí: características genómicas, dinámica de eliminación y su distribución en el ambiente” liderado por el Dr. Víctor Montes Zambrano, que nos colaboró con recursos económicos para la adquisición de un equipo adicional y los costos de ejecución de las PCR reportadas en este trabajo.

Y finalmente agradecemos a todos aquellos docentes y amigos por brindarnos siempre su amistad, apoyo, confianza y sobre todo sus conocimientos que hoy aplicaremos en nuestra vida profesional.

CERTIFICACIÓN

Dr. Víctor Montes Zambrano, Certifica que el trabajo de titulación en la Modalidad Trabajo Comunitario titulada: “Implementación de equipos para la realización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en el laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias”, es trabajo original de los Señores: Zamora Arteaga Jessica Liceth y Soriano Roca Galo Daniel, el que ha sido realizado bajo mi supervisión.

Víctor Montes Zambrano PhD
TUTOR DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

“ Implementación de equipos para la realización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en el laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias”

Sometida a consideración del tribunal de defensa designado por el H. Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

MEDICO VETERINARIO

APROBADO POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA

Dr. Edis Macías Rodríguez PhD
DECANO-PRESIDENTE

Dr. Víctor Montes Zambrano PhD
TUTOR DE TITULACIÓN

Dr. Juan José Zambrano Villacís
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Marina Zambrano Aguayo PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Patricia Zambrano Gavilanes PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN SOBRE LOS DERECHOS DEL AUTOR

Galo Daniel Soriano Roca y Jessica Liceth Zamora Arteaga, declaramos que la investigación titulada "Implementación de equipos para la realización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en el laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias" es un trabajo original de nuestra autoría.

Los autores concedemos a la Universidad Técnica de Manabí, permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de los autores.

Galo Soriano Roca

Jessica Zamora Arteaga

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	II
1. DENOMINACIÓN DE PROYECTO	1
1.1. Macro localización.....	1
1.2. Micro localización	1
1.3. Límites	1
2. FUNDAMENTACIÓN	2
2.1. Diagnóstico a la comunidad.....	2
2.2. Identificación de problema	2
2.3. Priorización del problema	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. OBJETIVOS	5
4.1. Objetivo General.....	5
4.2. Objetivos Específicos.	5
5. MARCO DE REFERENCIA	6
5.1. Leptospirosis.....	6
5.2. Pruebas para el diagnóstico de leptospira	6
5.3. Comparación de pruebas diagnósticas para leptospira	7
5.4. Generalidades de la técnica de PCR	8
5.5. Importancia y principios de la PCR.....	9
5.6. Muestras clínicas para diagnóstico por PCR	10
5.7. Reacción de cadena polimerasa (PCR) para la detección de leptospira	11
5.8. Cámara de electroforesis y fuente de poder.....	11
5.9. Preparación del Gel de agarosa.....	12
6. BENEFICIARIOS	13
6.1. Beneficiarios Directos.....	13

6.2.	Beneficiarios Indirectos.....	13
7.	METODOLOGÍA.....	14
7.1.	MATRIZ DE INVOLUCRADOS.....	15
7.2.	ÁRBOL DEL PROBLEMA.....	17
7.3.	ÁRBOL DE OBJETIVOS.....	18
7.4.	MATRIZ DE MARCO LÓGICO.....	19
8.	RECURSOS UTILIZADOS.....	21
9.	PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA.....	22
9.1.	Implementación de equipos.....	22
9.2.	Análisis de muestras de ADN.....	22
10.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	24
10.1.	CONCLUSIONES.....	24
10.2.	RECOMENDACIONES.....	24
11.	SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD.....	25
11.1.	Sustentabilidad.....	25
11.2.	Sostenibilidad.....	25
12.	PRESUPUESTO.....	26
13.	CRONOGRAMA.....	27
14.	BIBLIOGRAFÍA.....	28
15.	ANEXOS.....	32
15.1.	Encuestas a comunidad.....	32
15.2.	Encuesta a profesores.....	32
15.3.	Encuesta a Estudiantes.....	33
15.4.	Encuesta a Profesionales.....	35

RESUMEN

El presente trabajo de titulación en la modalidad de Desarrollo comunitario consistió en la implementación de equipos para el laboratorio de leptospira que está ubicado en el cantón Santa Ana, parroquia Lodana en el laboratorio de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí, el proyecto tuvo como propósito proveer de equipos de laboratorio para realizar estudios moleculares a través de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional con una mayor sensibilidad para diagnosticar patógenos de importancia clínica. La leptospirosis es considerada una zoonosis a nivel mundial que se transmite a los humanos por contacto de animales infectados, por lo que se hace necesario su identificación y diagnóstico mediante técnicas con mayor sensibilidad y especificidad, que es cumplido por medio de la técnica de la PCR. Debido a la carencia de dichos equipos en el área de leptospira se puso en práctica la realización del proyecto, además de eso sirvió para que otros estudiantes de pre y posgrado inicien proyectos de investigación en esta área. Se realizó la compra de un termociclador para 96 muestras y una cámara de electroforesis con fuente externa posibilitando avanzar en técnicas moleculares en esta área de leptospira. Además, se pudo realizar una práctica con el equipo a partir de 20 muestras de ADN procedentes de bovinos del departamento de producción animal, obteniendo resultados negativos en las muestras analizadas, lo que permitió conocer su funcionamiento.

Palabras Claves: Leptospira, Termociclador, Cámara de Electroforesis, Zoonosis.

SUMMARY

The present work in the Community Development modality consisted of the implementation of equipment for the leptospira laboratory that is located in the Santa Ana cantón, Lodana parish in the Veterinary Sciences laboratory of the Technical University of Manabí, the project had as purpose to provide laboratory equipment to perform molecular studies through conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) with greater sensitivity to diagnose pathogens of clinical importance. Leptospirosis is considered a worldwide zoonosis that is transmitted to humans by contact with infected animals, so it is necessary to identify and diagnose it using techniques with greater sensitivity and specificity, which is accomplished by means of the PCR technique. Due to the lack of such equipment in the area of leptospira, the realization of the project was put into practice; in addition to that it served for other undergraduate and graduate students to initiate research projects in this area. A thermocycler for 96 samples and an electrophoresis chamber with an external source were purchased, making it possible to advance in molecular techniques in this area of leptospira. In addition, it was possible to carry out a practice with the equipment from 20 DNA samples from bovines of the animal production department, obtaining negative results in the analyzed samples, which allowed knowing its operation.

Keywords: Leptospira, Thermocycler, Electrophoresis Chamber, Zoonosis.

1. DENOMINACIÓN DE PROYECTO

Implementación de equipos para la realización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en el laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

1.1.Macro localización

El presente trabajo se realizó en Ecuador, provincia de Manabí, cantón Santa Ana, en la parroquia urbana Lodana, en las instalaciones de los laboratorios de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí.

1.2.Micro localización

El laboratorio de Ciencias veterinarias se encuentra en las instalaciones de los laboratorios de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Manabí, el cual encuentra ubicado en la parroquia Lodana vía principal del Cantón Santa Ana, ubicado geográficamente a 1°09'54.98''S y 80°23'29,73''O y una elevación de 71 msnm, dentro de este laboratorio se encuentra el laboratorio de leptospira el cual va a ser el beneficiado de este proyecto (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Santa Ana, 2017).

1.3.Límites

El cantón Santa Ana limitada:

Al norte con los cantones Portoviejo y Pichincha

Al sur con los cantones Olmedo y 24 de Mayo

Al este con el cantón Pichincha y la provincia del Guayas

Al oeste con los cantones Portoviejo, 24 de Mayo y Jipijapa (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Santa Ana, 2017).

2. FUNDAMENTACIÓN

La Implementación con equipamiento para el diagnóstico molecular al laboratorio de Leptospira permitirá abrir campos en el diagnóstico directo de patologías que afectan a los animales de producción, permitiendo ir creciendo en el diagnóstico animal usando técnicas que en muchas partes del mundo son rutinarias y que en el país han estado limitadas a ciertas instituciones con mayor infraestructura, mayor presupuesto y talento humano capacitado.

Por otra parte, la implementación de equipamientos para la realización de esta técnica diagnóstica servirá para la ejecución de investigaciones básicas, así como avanzadas en el campo del diagnóstico veterinario y caracterización molecular.

2.1.Diagnóstico a la comunidad

La provincia de Manabí carece de laboratorios especializados que permitan desarrollar técnicas moleculares para el diagnóstico directo de la leptospira. Actualmente este patógeno es el responsable que en la provincia de Manabí se reporten los mayores casos de leptospirosis en humanos en el País, lo que genera una transmisión constante entre animales domésticos y silvestres, apareciendo el hombre como el resultado final de una exposición accidental. La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UTM es una unidad académica de prestigio en el campo de la investigación, identificando dentro de sus objetivos principales la mejora constante de la calidad de vida del hombre y los animales a través de acciones que permitan la prevención, diagnóstico y resolución de problemas de salud y que por su implicación en la salud pública y al ser la leptospirosis una enfermedad zoonótica se ve en la obligación de intervenir en identificar los procesos de transmisión de los animales y poder establecer medidas de prevención para evitar la propagación de la enfermedad al ser humano.

2.2.Identificación de problema

La Facultad de Ciencias Veterinarias en su Centro Experimental I consta con un laboratorio de Ciencias Agropecuarias, que en el campo veterinario se encuentra fortaleciéndose y equipándose importantes áreas, sin embargo el desarrollo de técnicas moleculares como el PCR son imposibles de ejecutar en la actualidad, por la falta de equipos que permitan implementar esta técnica diagnóstica, limitando el desarrollo del

estudio de enfermedades infecciosas como la leptospirosis que afecta la producción de los animales y la salud del ser humano. El poder implementar equipos básicos para diagnóstico molecular permitirá identificar un estatus más real de los animales frente a la infección por leptospira, así como también abrir la posibilidad de montar técnicas de caracterización molecular que permitan conocer las características de las cepas circulantes y dar respuestas a los problemas que actualmente ubican a la provincia dentro de las más afectadas por esta enfermedad.

2.3.Priorización del problema

El incremento constante de la enfermedad en humanos, obliga a la comunidad científica a redoblar esfuerzos para poder identificar los animales potencialmente infectados con la bacteria y poder tratarlos o establecer protocolos de manejo que tiendan a disminuir el riesgo de infección al ambiente y al ser humano. Por otra parte, la necesidad de conocer las cepas circulantes en la provincia de Manabí solo es posible con la implementación de herramientas diagnósticas directas como el PCR que, en los actuales momentos, es una técnica que no ha sido implementada en los laboratorios agropecuarios de la Universidad Técnica de Manabí por falta de equipos y/o personal capacitado en el área. Por otra parte, la afectación de esta enfermedad a los animales de compañía y de producción ocasionan grandes pérdidas al sector productivo manabita y ecuatoriano, lo que permitirá gracias a esta implementación de equipos, poder identificar el problema de salud y establecer estrategias de control que busquen minimizar los efectos adversos de esta enfermedad.

3. JUSTIFICACIÓN

La PCR es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad, debido a su eficacia para la detección de diversas patologías que afectan a los animales domésticos y al ser humano. Entre una de las enfermedades de importancia que afecta a la producción de los animales se encuentra la leptospirosis, la cual se encuentra presente en esta región no solo afectando a los animales sino a los seres humanos que habitan en ella. La provincia de Manabí ha sido considerada una de las localidades más endémicas de leptospirosis humana, por lo que es de suma importancia implementar equipos que permitan diagnosticar de forma rápida y confiable este tipo de patología, en animales y en humanos, debido a que en la actualidad es considerada una enfermedad desatendida y sub-diagnosticada en muchas partes del mundo incluido el Ecuador, esta enfermedad es de tipo zoonótica por afectar al hombre al entrar en contacto con animales infectados y ambiente contaminado.

En la Facultad de Ciencias Veterinarias sería de gran utilidad dotar al laboratorio de leptospira de equipos como un termociclador para PCR de tipo convencional, que beneficiará tanto a los docentes como a los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria, permitiendo ampliar conocimientos sobre técnicas diagnósticas que no son realizadas dentro de los predios de la facultad debido a la falta de equipos y personal técnico disponible. La implementación de estos equipos se realizó mediante la obtención de una beca por parte de la Universidad Técnica de Manabí, cuyos recursos se emplearon en la compra de un termociclador y una cámara de electroforesis con fuente de poder.

4. OBJETIVOS

4.1.Objetivo General.

Implementar equipos para la realización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de tipo convencional al laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias

4.2.Objetivos Específicos.

- Dotar de un termociclador y una cámara de electroforesis al laboratorio de leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias
- Aplicar la técnica de PCR convencional para el diagnóstico de leptospira patógena, a través de la evaluación de un banco de muestras de ADN proveniente de orina de los bovinos existentes en el predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias

5. MARCO DE REFERENCIA

5.1. Leptospirosis

Sosa (2015) indica que la leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial de tipo infecciosa causada por varios agentes patógenos del género *leptospira*, afectando en gran medida a casi todas las especies de mamíferos tanto domésticos como salvajes. Según expresa Nieves (2018) la leptospirosis tiene mayor incidencia de propagación en países tropicales y subtropicales provocada por las condiciones de humedad y temperatura que favorecen la sobrevivencia de la bacteria en el medio ambiente. Moreno & Agudelo (2010) señalan que la infección de la leptospira ocurre por contacto directo con orina o tejido de un animal infectado, o por contacto con agua o suelo previamente contaminado con orina. Haake & Levett (2015) establecen que, la leptospirosis suele ser asintomática tanto en animales y humanos, pero en algunos casos puede desarrollarse y presentar características clínicas graves, manifiestan además que el ciclo de vida de la infección comprende la eliminación en la orina, la persistencia en el medio ambiente, la adquisición de un nuevo huésped y la diseminación hematógena a los riñones a través del glomérulo o los capilares peritubulares.

Por otra parte, Costa et al. (2006) manifiesta que esta enfermedad varía desde infecciones subclínicas hasta síndromes graves de infección multiorgánica con alta mortalidad, caracterizado por cuadros clínicos que se caracterizan por un período de incubación corto de 7 a 14 días, seguido de dos fases clínicas distintas. La leptospiremia que consiste en la circulación de la leptospira en sangre, ocurre durante la primera fase de la enfermedad y generalmente termina al final de la primera semana de la leptospirosis aguda. La segunda fase, o fase inmune, se caracteriza por la presencia de anticuerpos en el suero y la eliminación de espiroquetas en la orina de individuos infectados también llamada leptospiuria.

5.2. Pruebas para el diagnóstico de leptospira

Existen varias pruebas de laboratorio que se utilizan para el diagnóstico de leptospirosis dentro de las que destacan: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) y por la Técnica de Microaglutinación (MAT, por sus siglas en inglés) que pertenece a las técnicas indirectas que brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar

anticuerpos antileptospirales (que pueden ser de la clase IgM e IgG), las que constituyen las técnicas de elección. El mayor problema que presentan son los niveles de anticuerpos, aunque se mantengan durante años, alcanzan niveles tan bajos en animales y personas infectados crónicamente que no siempre se detectan, además en los casos de infección por serovares adaptados un porcentaje de los animales pueden no presentar respuestas con anticuerpos (Ávila, 2019). Sandoval et al. (2018) mencionan que la técnica del MAT, es considerada el estándar de oro del serodiagnóstico por su insuperable especificidad diagnóstica en comparación con las otras pruebas disponibles actualmente. En la actualidad existe una técnica directa que se realiza para la observación de leptospira en los fluidos orgánicos. Se trata de un método de diagnóstico de leptospirosis basados en las técnicas moleculares modernas, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) puesto que ha resultado ser muy útil en la detección de diversos patógenos, presentando varias ventajas sobre las técnicas de detección serológicas como mayor sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados (Riediger et al., 2017).

5.3.Comparación de pruebas diagnósticas para leptospira

Branger et al. (2005) manifiestan que las pruebas conocidas como la aglutinación microscópica prueba (MAT) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección de inmunoglobulina M se utilizan comúnmente. Aunque muy específico, el MAT es muy tedioso y requiere mucho tiempo. Villumsen (2010) indica que, en la fase aguda de la enfermedad, las leptospiras están presentes en grandes cantidades en varios fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina), de allí que se puede obtener buenos resultados en los ensayos de PCR antes de iniciar la terapia antimicrobiana. Los protocolos de PCR podrían facilitar la detección temprana de leptospira patógena en pacientes con síntomas clínicos sugestivos de la enfermedad, así como en la identificación de animales portadores en muestras de orina. Esto sería una ventaja frente a la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT), que es el Gold estándar en el diagnóstico de esta enfermedad dado que MAT no es efectiva antes del séptimo día de la enfermedad (Céspedes, 2005).

Loureiro et al. (2013) mencionan que la técnica PCR, presenta una alta sensibilidad y especificidad, siendo rápida y simple cuando se cuenta con los equipos e infraestructura necesaria para su ejecución. Por otra parte, en un estudio realizado por

Fonseca et al. (2006) la prueba de inmunoglobulina M ligada a enzimas resultó ser la más sensible (88,3%), seguida de la MAT (66,7%) y la PCR (65%), considerando tanto cebadores como muestras biológicas (sangre y orina). Encontrándose que la PCR es la prueba más específica (100%), seguida de MAT (98,4%), SAT (96,9%) e IgM ELISA (89,1%).

En el estudio se observó que las sensibilidades de las pruebas serológicas variaron según el período de la enfermedad, el cual se hicieron pruebas a los 3-8 y 9-14 días. En el primer período, ninguno de los métodos detectó la enfermedad en más del 80% de las muestras. El ELISA de IgM resultó ser el más sensible (79,3%), seguido del MAT (69,0%) y PCR (62,0%). Para todas las pruebas, la sensibilidad fue mayor en el segundo período. El valor más bajo se observó para la PCR (72,7%) y la sensibilidad MAT fue intermedia (95,4%). Los valores más altos encontrados fueron para IgM ELISA dando un 100 % para ambas técnicas diagnósticas (Fonseca et al., 2006).

Por otro lado, Mullan (2016) indica que las pruebas serológicas tienen baja sensibilidad en fase aguda temprana. Son principalmente pruebas de detección de IgM que son no detectables hasta 5-7 días después de la aparición de los síntomas. En la actualidad el estudio realizado a 91 casos sospechosos el 44 % fueron detectados por pruebas serológicas en la fase temprana de la enfermedad, mientras que la PCR detectó el 27 % de 55 casos sospechosos que no se habían detectado. En estos estudios la sensibilidad de IgM ELISA varía del 43% al 100% y la especificidad varía del 76% al 98%. La sensibilidad y especificidad de PCR, en el estudio de Fonseca et al. (2006) fue 62% y 100% pero en el estudio realizado por Shekatkar et al. (2010) fue del 11% y 95% respectivamente.

5.4.Generalidades de la técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa constituye una reacción enzimática que permite obtener un gran número de copias de una secuencia determinada a partir de un segmento específico de ADN. Todas las variaciones de la técnica (punto final y en tiempo real) comparten el mismo fundamento, sin embargo, la principal diferencia se basa en el tiempo o fase en la cual se recolectan los datos. Así, en la PCR punto final la detección de los fragmentos amplificados se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa y tinción al final del proceso de amplificación (Wilson & Walker, 2005).

Cómo hacen saber Fernández & Ulloa (2017) el PCR de punto final también conocido como PCR convencional permite visualizar mediante una electrólisis, la acumulación de ampliaciones generados al final de un número determinado de ciclos generalmente mediante electrolitos. Guerrero (2013) en su estudio realizado indica que es una técnica que se caracteriza por utilizar un par de cebadores para amplificar una pequeña parte del genoma del agente infeccioso.

Para realizar la reacción de PCR convencional, se requiere un par de iniciadores que delimitan la secuencia de ADN a amplificar. La secuencia delimitada se amplifica millones de veces a partir de la copia del original. Los iniciadores utilizados para esta PCR se analizan con herramientas bioinformáticas, estas herramientas bioinformáticas nos arrojan pares de iniciadores con sus ciertas características, se escogen los que cumplan con las características óptimas (Hernández & Valdez, 2017).

El PCR convencional incluye ciclos repetidos de amplificación de la secuencia de ácido nucleico seleccionada. Cada ciclo consta de tres etapas. En la primera etapa, el ADN de cadena doble se desnatura por calor, se rompen los puentes de hidrógeno y se separan ambas cadenas obteniéndose ADN de cadena sencilla. En la segunda etapa ocurre el alineamiento entre dos cebadores u oligonucleótidos iniciadores; estos son fragmentos complementarios que se unen a cada una de las dos cadenas del ADN que se va a amplificar. La tercera etapa se corresponde con la extensión, donde una ADN polimerasa sintetiza una cadena de ADN complementaria a cada una de las cadenas moldeadas, adicionando nucleótidos al extremo de cada uno de los cebadores hibridados. Las nuevas cadenas sintetizadas sirven como molde en el siguiente ciclo (Perera & Acevedo, 2018). Bolívar et al. (2013) manifiestan que la PCR ha sido de suma relevancia para el estudio y detección de agentes etiológicos, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas y sobre todo muy utilizada para la modificación de ADN.

5.5.Importancia y principios de la PCR

Anteriormente las pruebas de PCR eran técnicas tardías, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura siendo necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas de cada ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína,

se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos (García & Rivas, 2011).

Actualmente el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier (termoeléctrico), que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico (García & Rivas, 2011).

Sánchez (2013) menciona que las moléculas de ADN molde deberán encontrarse en forma de cadena simple el cual se consigue calentando la temperatura de 90°C produciendo la ruptura de los enlaces de puente de hidrógeno y la separación de ambas cadenas, encontrando tres etapas de suma relevancia.

Desnaturalización: Es la separación de los dos filamentos del ADN y se consigue calentando el ADN hasta 95°C durante 1-5 min, según la calidad y el peso molecular del ADN. Para asegurar la completa separación de la doble cadena de ADN, esta temperatura debe mantenerse en unos minutos (Manzaba, 2019).

Hibridación: Una vez desnaturalizado el ADN se disminuye la temperatura entre los 40°C para que se produzca la hibridación de los cebadores a la secuencia flanqueantes del fragmento que se desea amplificar la temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72 °C. (Sánchez, 2013).

Extensión: Menciona Manzaba (2019) que esta etapa es también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción del ADN polimerasa.

5.6.Muestras clínicas para diagnóstico por PCR

Faber et al. (2000) indican que para la detección de *Leptospira* spp. en animales generalmente se utilizan: muestras de sangre con anticoagulante, plasma, suero, orina, semen, productos del aborto y órganos tales como riñón e hígado, además manifiestan

que la elección del tipo de muestra dependerá de la especie animal, del objetivo del estudio (diagnóstico precoz o búsqueda de especies portadoras) y del momento de la toma de muestra (Organización Mundial de la Sanidad Animal [OIE], 2004). Por otro lado, Wilson (1997) menciona que la sangre con anticoagulante, el suero y el plasma constituyen las muestras de elección en la primera fase de la enfermedad cuando la *Leptospira* spp. presenta alta concentración en sangre. En el caso de la sangre con anticoagulante la presencia de inhibidores puede afectar la eficiencia de la técnica de PCR.

5.7.Reacción de cadena polimerasa (PCR) para la detección de leptospira

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para detectar el ADN de *Leptospira* en muestras clínicas. Iniciadores (secuencias cortas de ADN que son específicas para leptospirosis), en combinación con una polimerasa del ADN estable al calor, en presencia de nucleótidos y sometidos a ciclos de temperatura, amplifican una sección del ADN de leptospira. La PCR puede emplearse con sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejido (ante o post-mortem) (OMS, 2003).

OMS (2003), menciona en su estudio que la disponibilidad de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta de diagnóstico el cual ha mejorado la velocidad y precisión de detección de leptospira. Por otro lado, Fernández & Ulloa (2017) resaltan que la PCR es una técnica rápida y versátil, convirtiéndose hasta la fecha en una técnica comúnmente utilizada en diversos laboratorios. Así mismo Pérez (2011), menciona que las reacciones en cadena de la polimerasa, tiene la principal función de generar muchas copias de un fragmento de ADN para poder distinguirlo del resto de ADN total extraído.

5.8.Cámara de electroforesis y fuente de poder

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas, de acuerdo a su tamaño y reactividad, puede ser utilizada en la separación del ADN. El ADN posee carga negativa debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura, característica que permite que, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado, las moléculas migren en dirección al ánodo (carga positiva). Para la electroforesis de ADN generalmente se emplea gel de agarosa como material de soporte. La agarosa es un

polímero natural, polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros (Pérez & Gómez, 2020).

Una fuente de poder para electroforesis es la fuente que administra corriente constante y directa al sistema de electroforesis, así como también nos indica y permite controlar tanto el voltaje de suministro como el consumo de corriente, es decir, este dispositivo provee la energía necesaria para que este sistema funcione adecuadamente y se pueda llevar a cabo esta importante técnica de laboratorio. Tiene la característica de poseer cuatro salidas permitiendo correr cuatro geles en paralelo al momento de conectar las cámaras de electroforesis (Pérez & Gómez, 2020).

5.9. Preparación del Gel de agarosa

- Mezclar el polvo de agarosa con el tampón en un matraz de 250 ml.
- Disolver el polvo de agarosa, poniendo la solución a hervir. Calentar la solución en el microondas durante 1 minuto a alta temperatura. Retirar con cuidado el matraz del microondas y mezclar la solución agitando con cuidado el matraz. Continuar calentando la solución por periodos de 15 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución debe tener un color claro como el agua).
- Dejar enfriar la agarosa hasta 60°C agitando con cuidado el matraz para permitir una disipación homogénea del calor.
- Situar el molde (peine) en la ranura central.
- Verter la solución de agarosa enfriada en el soporte. El gel debería solidificarse al cabo de veinte minutos máximo. El gel se reafirma y se vuelve menos transparente al solidificarse.
- Retirar el peine. Al quitar el peine, tener cuidado de no estropear los pocillos.
- Meter el gel (soporte) en la cuba de electroforesis. Cubrir el gel con el tampón de electroforesis. El gel debe estar completamente sumergido.
- Depositar las muestras en los pocillos en el orden especificado.
- Cerrar la tapa de seguridad. Verificar que el gel esté situado en la dirección correcta.
- Conectar los enchufes con la fuente de corriente y realizar la electroforesis
- Una vez que haya completado la electroforesis, retire el gel y el soporte de la cuba de electroforesis y visualice el gel de agarosa (Yábar, 2003).

6. BENEFICIARIOS

Los beneficiarios de este trabajo serán:

6.1. Beneficiarios Directos.

La Universidad Técnica de Manabí, quien es la propietaria de las instalaciones física en donde se ejecutará el proyecto.

Los estudiantes de pregrado y posgrados de la Facultad de Ciencias Veterinarias quienes tendrán una línea de investigación más por desarrollar en sus tesis de titulación mediante la aplicación de técnicas moleculares como el PCR.

Los docentes investigadores de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Los ganaderos quienes optimizarán su productividad al tratar a los animales infectados, y poder identificar su verdadero estatus sanitario.

6.2. Beneficiarios Indirectos.

La Comunidad científica en general y la población animal de la provincia y del país.

7. METODOLOGÍA

El proyecto se ejecutó en los laboratorios contruidos en los predios de la Facultad de Ciencias Veterinarias, ubicado en la Parroquia Lodana del cantón Santa Ana, con el fin de tener un área destinada para la investigación de esta patología y proveyéndoles con equipos para realizar una técnica directa de detección de leptospira. La implementación de estos equipos permitió a los investigadores que laboran en esta línea de investigación, poder obtener resultados óptimos sobre la búsqueda de la presencia de ADN de leptospira patógena en las muestras procesadas.

El manejo de los equipos estuvo a cargo de los estudiantes: Zamora Arteaga Jessica Liceth, Soriano Roca Galo Daniel, bajo la supervisión del docente a cargo del área de leptospira Dr. Víctor Montes Zambrano.

La metodología aplicada en este trabajo se realizó, mediante la utilización del marco lógico el cual consta de los siguientes elementos:

- Matriz de involucrados
- Árbol de problemas
- Árbol de objetivo
- Matriz de Marco Lógico

Se contó con el apoyo de Autoridades, Docentes, empleados y estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria al participar llenando una encuesta de opinión con el fin de identificar el grado de conocimiento de la técnica molecular, así como identificar las ventajas de conocer y tener a disponibilidad de equipos de PCR para la investigación.

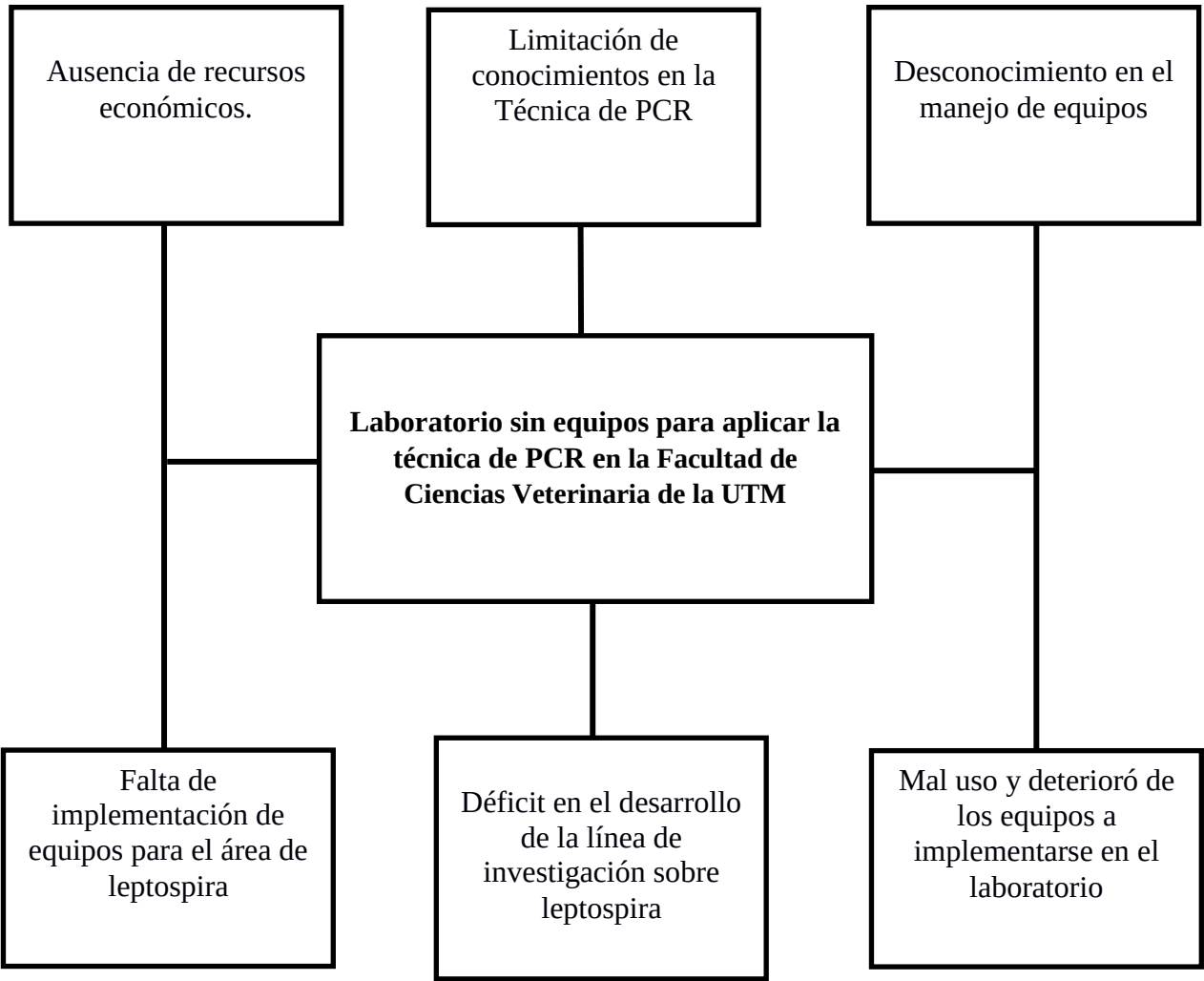
Se realizó la puesta en marcha del termociclador con el procesamiento de muestras de ADN procedentes del departamento de producción animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias que forman parte del proyecto de investigación “Leptospiras patógenas presentes en animales domésticos y silvestres de tres cantones de la provincia de Manabí: características genómicas, dinámica de eliminación y su distribución en el ambiente” liderado por el Dr. Víctor Montes Zambrano. La realización del PCR (primer y Perfil térmico) se lo realizó siguiendo el protocolo establecido por Branger et al. (2005).

7.1. MATRIZ DE INVOLUCRADOS

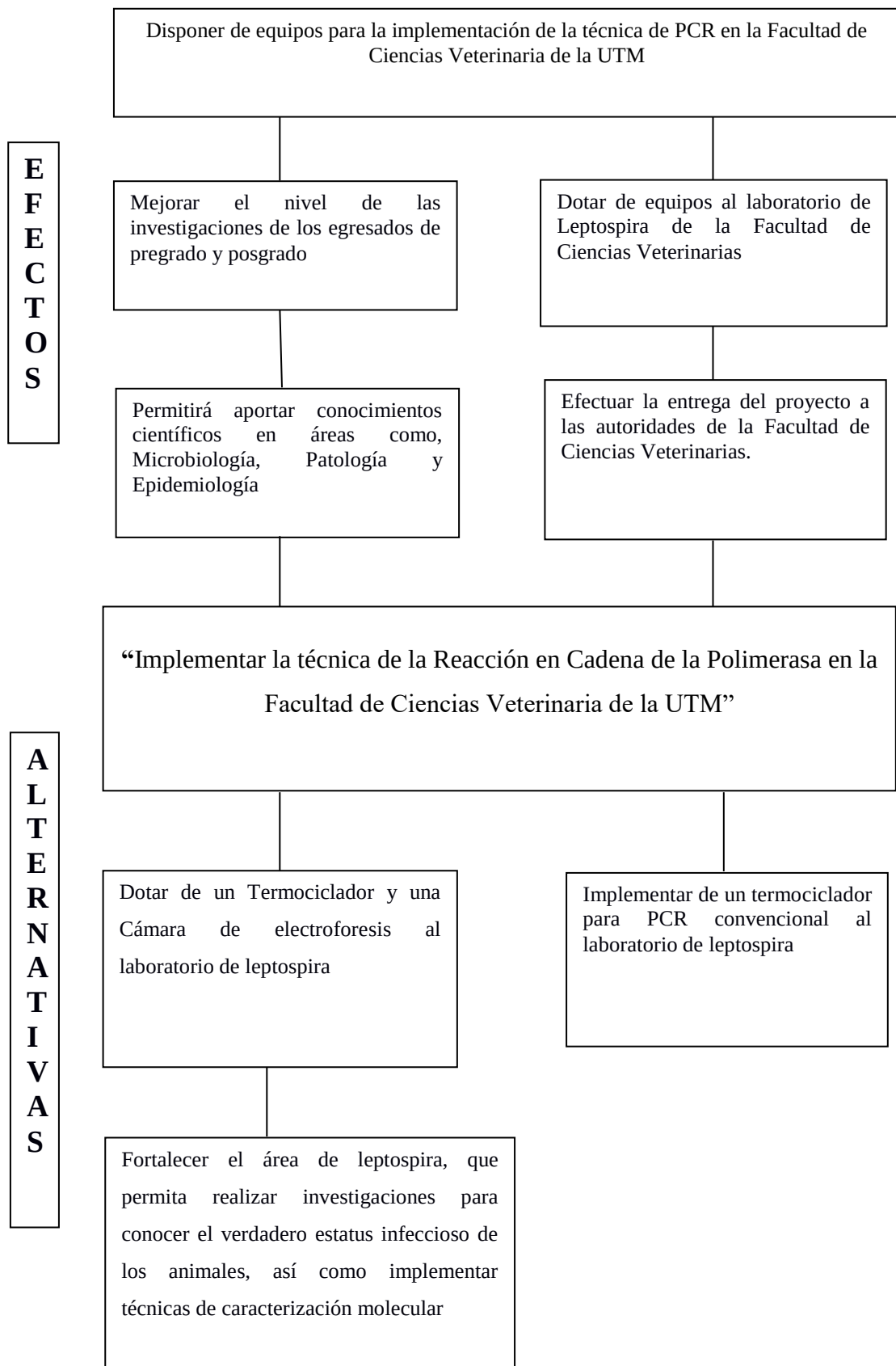
GRUPOS	INTERESES	PROBLEMAS PREVISTOS	RECURSOS Y MANDATOS	INTERESES DEL PROYECTO	CONFLICTOS POTENCIALES
Autoridades De la FCV. De la UTM	Proporcionar instalaciones adecuadas y equipos necesarios para investigación científica	No obtener los equipos necesarios para desarrollar nuevas líneas de investigación	Mayores oportunidades de trabajos a estudiantes de pregrado, posgrado y el personal técnico del laboratorio	Aumentar el interés en el estudio de la leptospirosis en animales domésticos y silvestres de la provincia.	Falta de equipos necesarios para el diagnóstico directo de la Leptospira
Docentes de la FCV.	Facilitar los recursos necesarios que promuevan e incentiven a los estudiantes de pregrado y posgrado	Falta de equipos como: Termociclador y equipos de electroforesis	Ampliar el abanico de posibilidades sobre el estudio de otras patologías presentes en animales de producción	Facilitar los equipos para implementar la técnica y prestar disponibilidad para investigación de estudiantes de pre y posgrado	Poco desarrollo de la Técnica Reacción en cadena de la Polimerasa
Comunidad	Aporte en el campo de la Medicina Veterinaria para las investigaciones	Falta de herramientas de diagnóstico sobre Leptospira al servicio de la comunidad	Implementar una alternativa diagnóstica de vanguardia que colabore con médicos	Incrementar los conocimientos y la experiencia desarrollados durante la aplicación de esta técnica	Falta de recursos que conlleven a un déficit en el campo de las investigaciones

			veterinarios investigadores involucrados en Leptospira		
Empleados del área de investigación de la FCV	Mejorar el desempeño en el manejo del laboratorio	Falta de nuevas técnicas diagnósticas de tipo molecular	Asesoramiento sobre el manejo correcto de los equipos.	Proporcionar las capacitaciones adecuadas para fortalecer e implementar la técnica de PCR	Falta de herramientas de diagnóstico por medio molecular de la Leptospira

7.2. ÁRBOL DEL PROBLEMA



7.3. ÁRBOL DE OBJETIVOS



7.4. MATRIZ DE MARCO LÓGICO

OBJETIVO	INDICADORES	VERIFICADORES	SUPUESTOS
Fin Dotar de equipos para la implementación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el laboratorio de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UTM	El beneficio de becas estudiantiles para la ejecución de proyectos en el área de leptospira de los laboratorios Agropecuarios ubicados en Lodana cantón Santa Ana.	*Informes de los tesisistas del proyecto de acuerdo con el cronograma establecido. *Certificaciones del docente tutor del proyecto. *Oficios emitidos por las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias.	*Ausencia de presupuesto para la ejecución del proyecto de acuerdo al cronograma establecido. *Informe de dificultad de avance del proyecto por parte del tutor. *Solicitud de cambio de proyecto por parte de las autoridades por falta de presupuesto.
Propósitos Implementar con equipos al laboratorio de leptospira, que brinde las garantías de detección de esta bacteria para prevenir riesgos futuros	Generar áreas adecuadas para los investigadores y estudiantes de pregrado y posgrado.	*Equipamiento del área destinada para adecuar el laboratorio de leptospira. *Fotos, informes, supervisores.	*Falta de conocimiento sobre manejo adecuado de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa . *Deficiente utilización de los recursos

Componentes		*Observación directa.	
• Termociclador para PCR convencional • Cámara de electroforesis	Se recomienda comprar equipos de calidad y alta durabilidad con garantía.	*Facturas. *Fotografías	Falta de recursos
Actividades	Costo		
1.-Compra de termociclador para PCR convencional + cámara de electroforesis + Transiluminador	\$8.000	Facturas	Ninguno
2.- Entrega de equipos a las autoridades y docente responsable	\$ 0	Observación directa	Ninguno
3. Puesta en funcionamiento del termociclador	\$ 0	Facturas	Ninguno

8. RECURSOS UTILIZADOS

Humanos	Materiales	Financieros
Zamora Arteaga Jessica Liceth	Termociclador convencional de 96 pocillos	Beca por parte de la Universidad Técnica de Manabí
Soriano Roca Galo Daniel	Cámara de electroforesis y Transiluminador	

Los recursos obtenidos para la compra de los equipos correspondieron en su gran mayoría (8.000 USD) a una beca de titulación entregada por la Universidad Técnica de Manabí y un valor adicional (355,42 USD) fue cubierto por el proyecto de investigación titulado “leptospiras patógenas presentes en animales domésticos y silvestres de tres cantones de la provincia de Manabí: características genómicas, dinámica de eliminación y su distribución en el ambiente” liderado por el Dr. Víctor Montes Zambrano, que nos colaboró con un recurso adicional para completar la adquisición del transiluminador .

9. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA

9.1. Implementación de equipos

Con el presente trabajo de titulación contribuirá al mejoramiento de los procesos que se llevaran a cabo en el área de leptospira UTM, como es, la de realizar la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que es una de las formas más rápidas y precisas de diagnosticar enfermedades infecciosas como leptospirosis detectando el ADN de la bacteria detectado a través de una muestra clínica o provenientes de cultivos.

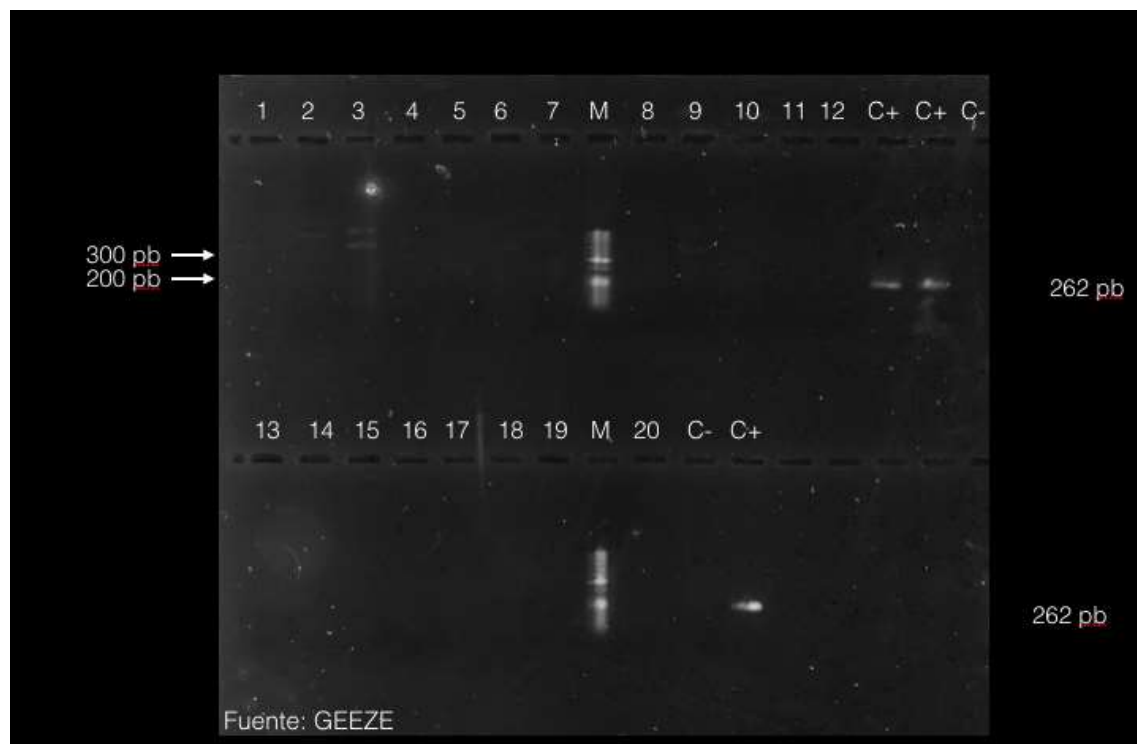
Teniendo en funcionamiento los equipos, permitió dar mayor eficiencia a esta área. El termociclador cumple la función de realizar los ciclos, de subir y bajar la temperatura necesarios para la reacción de cadena polimerasa de amplificación de ADN, la cámara de electroforesis nos ayuda a analizar los fragmentos de ADN utilizando las cargas eléctricas de esas moléculas para separarlas por su longitud.

Por otro lado, este proyecto de titulación ayudará en futuras investigaciones tanto a estudiantes como a docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica Manabí mejorando el diagnóstico de leptospira mediante la técnica de PCR como prueba diagnóstica y en parte de técnicas como la Tipificación de Multilocus de Secuencia (MLST).

9.2 Análisis de muestras de ADN

De un total de 20 muestras de ADN de orina de bovinos obtenidas del departamento de producción Animal de la Facultad el 100% no se encontró ADN de leptospira patógena en el diagnóstico el cual es observado el marcador de peso molecular (M) y las muestras control positivo y negativo el cual se visualiza en la imagen 1.

Imagen 1.-Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% sobre el Gen hap 1 que identifica leptospirosis patógenas, marcador de peso molecular 50 pb



10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1. CONCLUSIONES

- La reacción de cadena de la polimerasa es considerada una técnica fundamental al momento de detectar *Leptospira* en animales domésticos ya que tiene una alta sensibilidad y especificidad en comparación a otras pruebas. La implementación de equipos de PCR en el laboratorio de leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UTM fue de gran importancia, permitiendo llegar a un diagnóstico más preciso y eficaz de esta patología, sirviendo de ayuda a los proyectos de investigación institucional que lleva adelante esta dependencia.
- El proveer al laboratorio de leptospira de un termociclador y una cámara de electroforesis permitió evaluar el ADN proveniente de la orina de los bovinos existentes en el predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias y poder conocer su estatus infeccioso.
- La utilización de estos equipos es un recurso importante tanto para los estudiantes como docentes ya que permitirá encaminar nuevos proyectos de investigación dentro de la universidad en el campo científico, aumentando la posibilidad de publicación científica en este campo de la ciencia.

10.2. RECOMENDACIONES

- Realizar capacitaciones a médicos veterinarios y a los estudiantes de la carrera, para ampliar los conocimientos sobre la técnica de PCR en la detección de leptospira, ya que se trata de una enfermedad zoonótica de índole provincial, nacional y mundial.
- Seguir dotando de equipos especializados en el área de leptospira para mejorar la técnica de diagnóstico de este patógeno en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí.
- Fomentar nuevos trabajos de investigación con esta técnica diagnóstica que contribuyan a conocer la realidad de esta patología en los animales.

11. SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD

11.1. Sustentabilidad

El trabajo de titulación en la modalidad trabajo comunitario es sustentable porque permite fortalecer el área de Leptospira permitiendo realizar la PCR, que por ser una técnica de diagnóstico directo, brinda la capacidad de aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico en muestras clínicas provenientes los animales domésticos; adema permite que los estudiantes al momento de realizar sus investigaciones en esta área, tengan un aprendizaje práctico en el uso de los equipos. Por otra parte, el poder contar con equipos para diagnóstico molecular permitirá efectuar nuevas líneas de investigación, aumentando la producción científica que se verá reflejado en un mayor grado de publicación científica por parte de la carrera y a nivel institucional.

11.2. Sostenibilidad

La sostenibilidad del proyecto se cuantifica según el aumento progresivo de los trabajos de titulación de pregrado y la necesidad de temas de investigación solicitado por los estudiantes para trabajar en esta área de investigación.

El incremento de convenios con otros grupos de investigadores de instituciones gubernamentales y privadas que fortalezcan el estudio y las fuentes de financiamiento para esta línea de investigación en la provincia y en el país dando respuestas a los casos en humanos provenientes del contacto con animales domésticos y silvestres.

Por lo tanto, el proyecto es sustentable y sostenible en lo social y económico y a su vez viable, siendo de gran contribución a la comunidad de investigadores que laboran en el área de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

12. PRESUPUESTO

Denominación	Cantidad	Valor unitario	Total
Termociclador	1	\$ 4558,17	\$ 4558,17
Cámara de Electroforesis + Fuente de Poder	1	\$ 1.350,05	\$ 1.350,05
Transiluminador	1	\$ 2447,20	\$ 2447,20
		TOTAL	\$ 8.335,42

13. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	2021							2022		
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Elaboración del proyecto	X	X								
Aprobación del proyecto		X								
Compra de equipos			X	X	X	X				
Entrega de equipos y análisis de muestras							X	X		
Presentación informe final y sustentación									X	X

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Ávila, S. (2019). Evaluación de un kit de Elisa indirecto para el diagnóstico de Leptospirosis Bovina. [Tesis de grado, Universidad de la República de Uruguay].
<https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2571/FV33923.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Bolívar, A., Rojas, A., & García, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 26-28.
3. Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André-Fontaine, G. (2005). Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa específico para *Leptospira* patógena basado en el gen *hap1* que codifica la proteína 1 asociada a la hemólisis. *Cartas de microbiología FEMS*, 243 (2), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.007>
4. Céspedes, M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 22 (4): 290- 307.
5. Costa, M., Ravara, A., & Cota, M. (2006). Evaluación de métodos MAT, IgM ELISA y PCR para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Revista de métodos microbiológicos*, 65(2), 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.015>
6. Faber, N., Crawford, M., LeFebvre, R., Buyukmihci, N., Madigan, J., & Willits, N. (2000) Detección de *Leptospira* spp. en el humor acuoso de caballos con recurrente adquirido naturalmente uveítis. *J Clin Microbiol*, 38 (7), 2731-2733.
7. Fernández, J., & Ulloa, S. (2017). Recomendaciones para laboratorios que realizan Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Obtenido del Instituto de Salud Pública. Gobierno de Chile:
<https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20lab.%20que%20realizan%20la%20técnica%20de%20PCR%20áreas%20y%20flujos%20v1.pdf>
8. Fonseca, C., Vera. L., Caló, E., Espinosa, C., Arroyo, M., Da Silva, M., & Shikanai, M. (2006). Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health*, 11(11), 1699–1707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01727.x>

9. García, A., & Rivas, V. (2011). Determinación de *Leptospira interrogans* en animales domésticos de diferentes municipios de Nicaragua en el período comprendido 2009-2010 [Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua].
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/868/1/219047.pdf>
10. Guerrero, M. (2013). Desarrollo de una RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México].
<http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/64370/MCARN%20MARI A%20DIANA%20GUERRERO%20GARCIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. Haake, D., & Levett, P. (2015). Leptospirosis en humanos. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442676/>
12. Hernández Flores, C., & Valdez Mijares, R. (2017). Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea. Temas de Ciencia y Tecnología, 22 (64), 6-8.
13. Loureiro, A., Martins, G., Thomé, S., & Lilenbaum, W. (2013). Diagnóstico de laboratorio de leptospirosis animal. Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria, 20(3), 119-126.
14. Manzaba, C. (2019). Identificación genética de cepas de Leishmania circulantes en la Zona 7 [Tesis de grado, Universidad Nacional de Loja].
<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21719/1/TESIS%20CRISTINA%20MANZABA.pdf>
15. Moreno, N., & Agudelo, P. (2010). Aplicación de la PCR convencional simple y múltiple para la identificación de leptospira. Rev Peru Med Exp Salud Publica 27 (4), 548-550.
16. Nieves, C. (2018). Estudio genómico y moleculares de bacterias del género Leptospira: análisis de la variabilidad genética y contribución en diagnóstico y tipificación. [Tesis de Maestría, Instituto Pasteur de Montevideo].
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23242/1/uy24-19060.pdf>
17. Organización Mundial de la Sanidad Animal [OIE]. (2004). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Obtenido de <https://www.oie.int/doc/ged/D6508.PDF>

18. Perera, C., & Acevedo, A. (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*, 40 (3), 1-3.
19. Pérez, A., & Gómez, L. (2020). Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa. Obtenido de: <https://dspace.tdea.edu.co/bitstream/handle/tdea/1468/Electroforesis%20de%20%C3%A1cido%20desoxirribonucleico%20%28ADN%29%20en%20gel%20de%20agarosa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
20. Pérez de Castro, A. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Obtenido de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
21. Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Santa Ana (2017). Diagnóstico Cantonal. Recuperado de: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/santaana-fasediagnosticopreliminar_15-11-2014.pdf
22. Riediger, I., Stoddard, R., Ribeiro, G., Nakatani, S., Moreira, S., Skraba, I., Biondo, A., Reis, M., Hoffmaster, A., Vinetz, J., Ko, A.I., & Wunder, E.A. (2017). Diagnóstico rápido y práctico de la leptospirosis epidémica urbana utilizando un ensayo de PCR en tiempo real basado en *Leptospira lipL32* patógeno. *Enfermedades tropicales desatendidas*, 11 (9), 1-14. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005940>
23. Sandoval, E., Avilés, M., Montesinos, R., Montalvo, M., & Tejeda, A. (2018). Estudio comparativo del diagnóstico de leptospirosis mediante PCR y MAT en el noroeste de México. *Acta Universitaria*, 28 (4), 50-55.
24. Sánchez, A. (2013). La polymerase Chain reaction (PCR). Obtenido de: https://ddd.uab.cat/pub/poncom/mrama/mrama_a2013r8.pdf
25. Shekatkar, S., Harish, B., & Parija, S. (2010). Diagnóstico de leptospirosis por reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Internacional de Farmacia y Bio ciencias*, 1 (3), 17-34. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.444.1367&rep=rep1&type=pdf>
26. Sosa, A. (2015). Estudio Piloto: Detección de *Leptospira* en el cantón Portoviejo (Manabí) [Tesis de Grado, Universidad San Francisco de Quito]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4887/1/120361.pdf>

27. Mullan, S. (2016). Reacción en cadena de la polimerasa: una herramienta importante para el diagnóstico temprano de casos de leptospirosis. *Revista de investigación clínica y diagnóstica*, 10 (12), 8-10.
<https://doi.org/10.7860/jcdr/2016/22462.9010>
28. Villumsen, S., Pedersen, R., Krogfelt, K., & Jensen, J. (2010) Ampliación del uso diagnóstico de la PCR en la leptospirosis. Método mejorado para la extracción de ADN de cultivos de sangre, 5 (8), 12095.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012095>
29. Wilson, I. (1997). Inhibición y facilitación del ácido nucleico Amplificación. *Appl Environ Microbiol*, 63 (10), 3.741-3.750.
30. Wilson K, Walker J. (2005). *Principios y Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. (6th. Ed). Prensa Universitaria.
31. Yábar, C. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Obtenido de:
https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/38.pdf

15. ANEXOS

15.1. Encuestas a comunidad

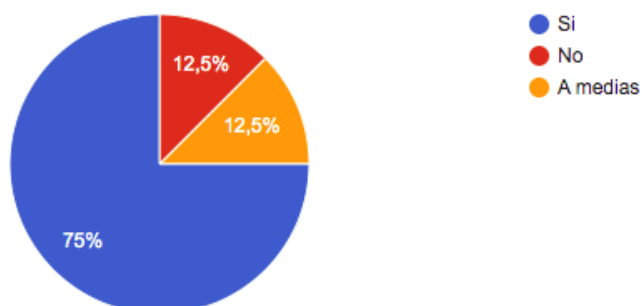
A partir de las entrevistas realizadas a 8 docentes, 14 médicos veterinarios y 15 estudiantes de octavo nivel de carrera de la Facultad de Ciencias Veterinarias se obtuvieron los siguientes resultados:

15.2. Encuesta a profesores

Pregunta 1

Conoce ud sobre la técnica diagnóstica de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa PCR?

8 respuestas

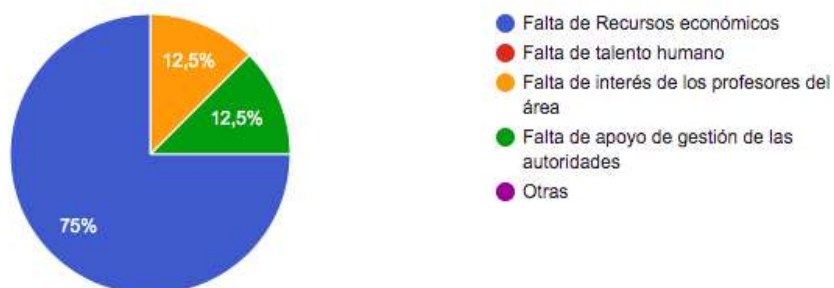


Se puede observar que el 75% de los profesores encuestados conocen sobre la técnica de PCR y el 12,5% la conoce a medias y otro 12,5% no conoce los principios de la técnica de PCR

Pregunta 2

¿Que dificultades cree ud que presenta la Facultad de Ciencias Veterinarias para no poder contar con un área de Biología molecular?

8 respuestas



El 75% de los profesores indican que la falta de recursos económicos como la principal razón por la cual no se cuenta con esta importante área en la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Pregunta 3

¿Cómo cree usted que ayudaría la implementación de un área de Biología Molecular en la investigación de Facultad de Ciencias Veterinarias?

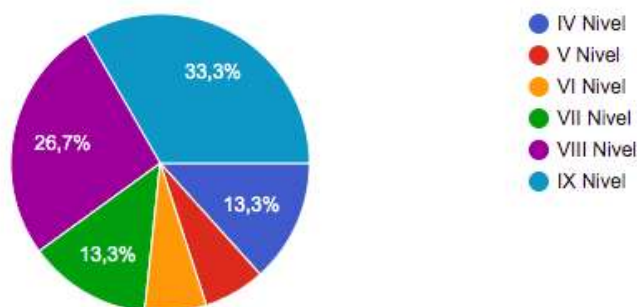
En cuanto a esta pregunta el 75 % de los profesores manifestaron una respuesta afirmativa de que esta área ayudará a fortalecer la parte de investigación, vinculación y elevar el nivel de publicación en la facultad; mientras el 25% afirma que es un escenario importante para el fortalecimiento de las prácticas estudiantiles en la formación investigativa que se lleva dentro de la carrera.

15.3. Encuesta a Estudiantes

Pregunta 1

Cual es el nivel de formación que cursa actualmente en la carrera de Medicina veterinaria

15 respuestas

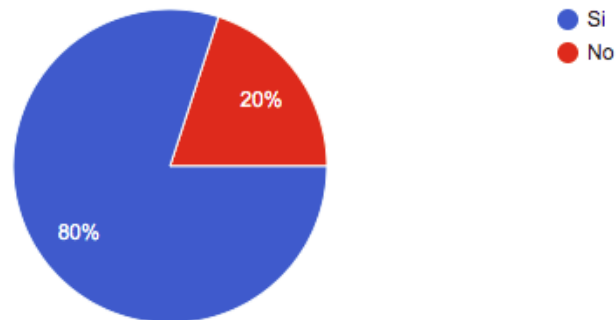


El 33% de los estudiantes que respondieron la encuesta pertenecen al IX nivel de carrera, el 26,7% VIII nivel; mientras que de VII, VI, participaron con el 13,3% respectivamente y de VI y V nivel fueron el 6,6%.

Pregunta 2

¿Conoce usted acerca de la técnica de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa PCR?

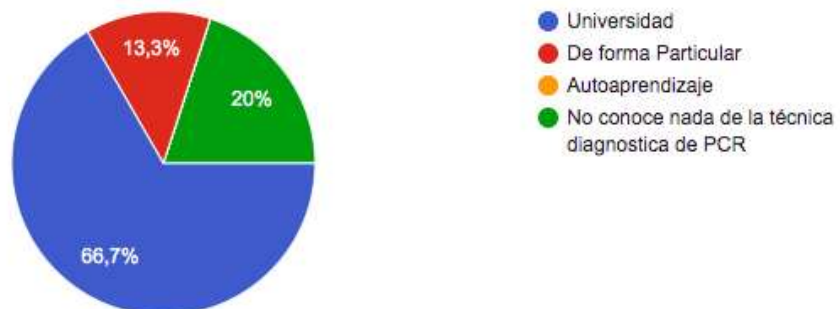
15 respuestas



Pregunta 3

Estos conocimientos básicos de la técnica de PCR donde fueron adquiridos

15 respuestas



El 66,7% de las respuestas manifestaron que los conocimientos sobre la técnica de PCR fueron adquiridos en la Universidad; mientras que el 20% manifiesta no conocer nada sobre la técnica diagnóstica y otro 13,3 % manifiesta conocer de la técnica, pero haber adquirido los conocimientos de forma particular.

Pregunta 4

¿Cuál es la utilidad que usted ve que la universidad enseñe a los estudiantes sobre estas técnicas diagnósticas moleculares?

El 53,4% de las respuestas manifiestas que es de gran utilidad en el diagnóstico de diferentes enfermedades; el 33,3% indica que al conocer de esta prueba diagnóstico permitirá abrir las puertas a los nuevos profesionales en un mayor campo laboral al manejar técnicas diagnóstica de punta como el PCR.; y el 13,3% indica que la utilidad de esta técnica se debe a la rapidez de conocer los resultados e identificar rápidamente los animales infectados al tener una prueba positiva.

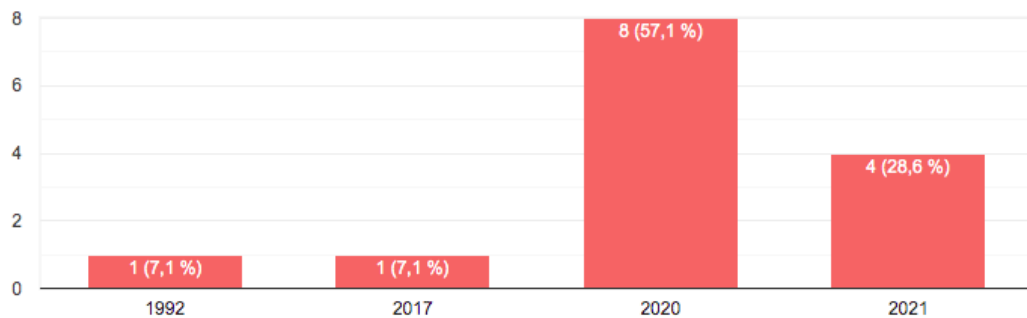
15.4. Encuesta a Profesionales

Pregunta 1

En que año egreso de la carrera de Veterinaria FCV. 2020



14 respuestas



Pregunta 2

¿Conoce usted acerca de la técnica de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa PCR?

13 de 13 respuestas correctas

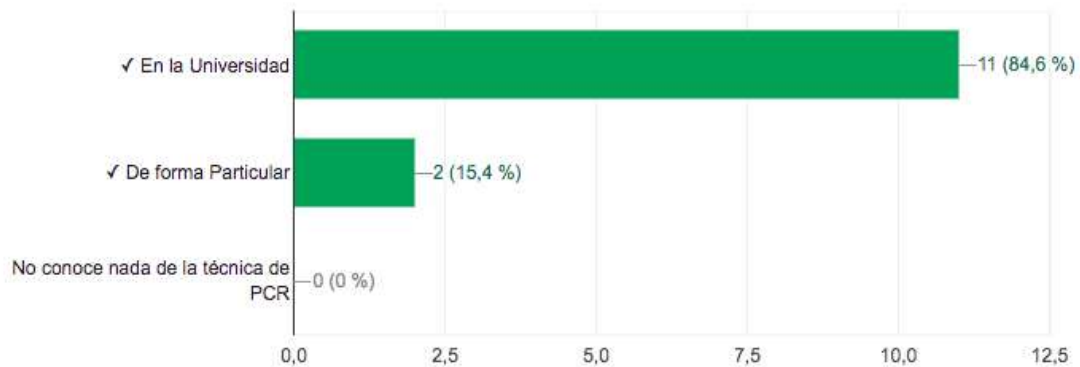


El 100% de los encuestados manifiesta conocer sobre la técnica molecular.

Pregunta 3

¿Los conocimientos sobre la técnica de PCR donde fueron adquiridos ?

13 de 13 respuestas correctas



El 84,6% de los graduados encuestados respondieron haber aprendido de la técnica de PCR dentro de la Universidad; mientras un 15,4% manifiesta que sus conocimientos adquiridos fueron de manera particular.

Pregunta 4

¿Cree usted que es necesario que los estudiantes de la carrera de veterinaria reciban una formación básica sobre la técnica diagnóstica de PCR en su formación?, explique usted los motivos

el 66,7% de las respuestas de los graduados indican que es importante la impartición de estos conocimientos en los estudiantes por cuanto permite llegar a un diagnóstico efectivo de enfermedades que estén diagnosticando, el 13,3% indica que es importante la enseñanza de esta técnica porque permite tener un mayor desempeño en la vida profesional de los egresados de la carrera; el 13,3% indica que es importante porque permite desarrollarse como profesional en el campo investigativo y el 6,6% de las respuestas de los graduados indica que es de importancia estos conocimientos para conocer la información genómica de los organismos en estudio.

Anexo 2.- Trabajo de laboratorio y entrega de equipos



Trabajo en la cabina de seguridad biológica para evitar riesgo de contagios



Colocación de las muestras en el thermoblock como uno de los pasos para la extracción de ADN.



En este paso se está agregando 500 ul etano 100% (Frio)



Manejo del termociclador con muestras de bovinos FCV



Termociclador con gradiente, bloque 96 x 0.2 ml
 MODELO: MiniAmp Plus Thermal Cycler.
 MARCA: Applied Biosystems (A37029)
 SERIE: 2280321080109



Cámara de Electroforesis
 Horizontal.
 INCLUYE: 2 PEINES DOBLE
 LADO DE 10 & 14
 MARCA: THERMO SCIENTIFIC
 SERIE: 300395226.

Transiluminador Luz Azul, Safe
 Imager transiluminator.
 Superficie de visualización: 190 x
 190 mm (7,5" x 7,5 ").
 Modelo Safe Imager 2.0.
 Marca: Invitrogen
 Serie: 1311210151

Fuente de poder programable,
 fusible: uno de 2^a/250v y uno de
 repuesto
 MODEÑO: POWER EASA 90w.
 MARCA: THERMO SCIENTIFIC.
 SERIE: 090038980



Entrega de Equipos a la Facultad de Ciencias
Veterinarias