UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABI

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE TRABAJO DE TITULACION

Previo a la Obtención del Título de:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

MODALIDAD:

TRABAJO COMUNITARIO

TEMA:

ASESORAMIENTO TECNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA ELISA EN LOS LABORATORIOS AGROPECUARIOS, CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA, CANTÓN SANTA ANA, MANABÍ

AUTORES:

FRANCISCO JAVIER BARCIA GILCES

EVELYN DAYANARA RUBIO LINO

TUTOR:

DR. SIXTO LEONARDO REYNA GALLEGOS, PhD.

Lodana, Santa Ana-Manabí, Ecuador

2022

INDICE

TEMA: 4
DEDICATORIA #1 5
DEDICATORIA #2 6
AGRADECIMIENTO 7
AGRADECIMIENTO 8
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR 9
APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL 10
DECLARACIÓN SOBRE LOS DERECHOS DE AUTOR 11
RESUMEN 12
ABSTRACT 13
1. INTRODUCCIÓN 14
2. DENOMINACION DEL PROYECTO 15
3. LOCALIZACIÓN FÍSICA DEL PROYECTO 17
4. FUNDAMENTACIÓN 18
4.1. DIAGNÓSTICO DE LA COMUNIDAD 18
4.2. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA 21
4.3. PRIORIZACION DEL PROBLEMA 21
5. JUSTIFICACIÓN 22
6. OBJETIVO 23
5.1 Objetivo General 23
5.2 Objetivos específicos 23
7. MARCO DE REFERENCIA 24
8. BENEFICIARIOS 28
8.1. BENEFICIARIOS DIRECTOS 28
8.2. BENEFICIARIOS INDIRECTOS 28
9. METODOLOGIA 29
9.1. MATRIZ DE INVOLUCRADOS 30
9.2. ARBOL DEL PROBLEMA 31
9.3. ARBOL DE OBJETIVOS 32
9.4. MARCO LOGICO 33
10. RECURSOS UTILIZADOS 35
10.1. RECURSOS HUMANOS 35
10.2. RECURSOS MATERIALES 35

10.3. RECURSOS FINANCIEROS 35
11. EJECUCION DEL PROYECTO 36
12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 37
11.1 Conclusiones 37
11.2 Recomendaciones 37
13. SOSTENIBILIDAD Y SUSTENTABILIDAD 38
12.1 Sostenibilidad 38
12.2 Sustentabilidad 38
14. RESULTADOS OBTENIDOS 39
15. CRONOGRAMA VALORADO 40
16. BIBLIOGRAFIA 41
17. ANEXOS 44

TEMA:

ASESORAMIENTO TECNICO EN LA ADQUISICIÓN DE EQUIPOS Y MATERIAL COMPLEMENTARIO PARA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA EN LOS LABORATORIOS AGROPECUARIOS, CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA, CANTÓN SANTA ANA, MANABÍ.

DEDICATORIA #1

La obra de esta tesis es dedicada a:

Dios pilar fundamental en mi vida espiritual, por darme la hermosa oportunidad de vivir este otro grandioso sueño por el cual tanto he luchado y me he esforzado para lograrlo y conseguirlo. A mis padres Ing. Francisco Barcia e Ing. Margarita Gilces, mis pilares fundamentales terrenales y participes de todos mis logros y éxitos, quienes con sacrifico, sabiduría y amor han permitido completar este sueño que empezó hace 5 años, demostrándome de quien persiste a cumplir sus sueños lo puede lograr todo.

A mi querido hermano Juan Francisco Barcia por ser su ejemplo a seguir a quien le he inculcado el esfuerzo y la perseverancia ante todo lo que tenga por delante. A mi amado hijo Francisco Barcia Jr. Por quien debo seguir adelante a pesar las adversidades del mundo. A mi familia en general por su apoyo incondicional y palabras de aliento en este largo proceso que pronto se culmina.

Finalmente, pero no menos importante a mis amigos cercanos de vida y de universidad, en especial a la Ing. Romina Reyes, quienes han podido observar todos mi progresos y avances desde el inicio en mi carrera universitaria y por su apoyo moral e incondicional en la culminación de esta etapa universitaria.

A todos los presentes aquí. Gracias

-Francisco Barcia-

DEDICATORIA #2

Esta tesis se la dedico a:

Principalmente a Dios, por darme la fuerza que necesito para culminar con esta grandiosa etapa. A mis padres Antonio y Alexandra quienes, con su amor, paciencia y sacrificio, me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcarme las ganas de seguir adelante a pesar de las adversidades que se nos presenten y hacer de mí una mujer valiente.

A mis hermanas Gaury y Anthonella por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso. A mi hijo que es el motor principal para no rendirme nunca. A toda mi familia porque con sus palabras de aliento, consejos hicieron de mí una mejor persona y de alguna u otra manera me acompañan en todos mis sueños y metas que me he planteado.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a los abuelos paternos de mi hijo por todo su apoyo, cariño y consejos brindados durante este arduo proceso y colaborar con el desarrollo de este trabajo. Al papá de mi hijo por brindarme su apoyo en situaciones difíciles para mi durante la etapa profesional, por haberme motivado a esforzarme cada día más. A mi querido amigo, compañero Richard por haberme enseñado y ayudado a mejorar en lo profesional, por extender su mano en momentos difíciles, abrirme sus puertas y compartir sus conocimientos conmigo. A todas las personas que me acompañaron y han permitido que este trabajo sea realizado con éxito.

-Evelyn Rubio-

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por lo tan bueno que ha sido en mi vida, por guiarme en el sendero de la vida y ser un hombre de bien que hoy culmina una de las etapas más grandiosas de mi vida y permitirme celebrar este triunfo con él y con todos mis seres queridos aquí en este mundo terrenal.

Agradezco a cada uno de los estimados docentes que componen la excelente Facultad de Ciencias Veterinarias que conocí a lo largo de mi trayectoria universitaria, las cuales me han formado en toda esta etapa universitaria. Con mención honorifica a mi estimado tutor el Dr. Sixto Leonardo Reyna Gallegos, PhD. Por su constante guía en el desarrollo, progreso y sustentación de esta tesis, por su paciencia y entrega y su excelencia académica como docente y a mi estimado Dr. Juan Cristóbal Pauta Labanda quien mientras cursaba la carrera me enseñó que no solo debemos quedarnos con la información de los libros o de los docentes, sino ir más al fondo e investigar siempre más y que una buena predisposición a aprender y estudiar es la base para un excelente profesional a futuro.

Finalmente, a mi compañera de tesis y madre de mi amado hijo Evelyn Rubio por su esfuerzo, perseverancia, persistencia, predisposición, esmero y entrega en este trabajo de titulación que hoy estamos culminando con éxito.

-Francisco Barcia-

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por llenarme de Bendiciones, por guiarme en el camino llamado vida, por ser quien me levanta de cada tropiezo o caída que he tenido.

Gracias a mis padres Antonio y Alexandra por ser los principales promotores de mis sueños y metas, por confiar y creer en mí, por los consejos, valores y principios que me han inculcado

Agradezco a los docentes de la Escuela de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí; por haberme impartido conocimientos a lo largo de mi profesión. Al tutor el Dr. Sixto Reyna Gallegos por estar pendiente siempre del avance y progreso de este trabajo, por su paciencia y rectitud como docente. A mi compañero de tesis por su persistencia y entrega en el trabajo.

-Evelyn Rubio-

CERTIFICACIÓN

Yo, Dr. Sixto Leonardo Reyna Gallegos, PhD. Como Tutor del presente Trabajo de Titulación certifico:

Que el informe Final del Trabajo de Titulación: **"ASESROAMIENTO TECNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA ELISA EN LOS LABORATORIOS AGROPECUARIOS, CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA, CANTÓN SANTA ANA, MANABÍ.",** en la Modalidad de Trabajo Comunitario, realizada por los estudiantes: Barcia Gilces Francisco Javier y Rubio Lino Evelyn Dayanara, se desarrollo y culmino bajo mi supervisión, considerando que el presente trabajo esta listo para ser presentado al H. Consejo Directivo.

Sin mas que añadir, se despide atentamente.

Dr. Sixto Leonardo Reyna Gallegos, PhD.

TUTOR DE TRABAJO DE TITULACION

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

"ASESORAMIENTO TECNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA ELISA EN LOS LABORATORIOS AGROPECUARIOS, CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA, CANTÓN SANTA ANA, MANABÍ."

TRABAJO DE TITULACION

Sometida a consideración del Tribunal de Defensa legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención de Titulo de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR EL TRIBUNAL

…….

Dr. Edis Macias Rodríguez, PhD.
DECANO FCV

……

Dr. Sixto Reyna Gallegos, PhD.
TUTOR TRABAJO DE TITULACION

…….....

Dra. Laura Veliz de la Cruz, Mg. Sc
PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

…….

Biol. Maritza Barrera, PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

…….

MVZ. Radami Zambrano, Mg. Sc
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Las ideas conclusiones y recomendaciones, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo investigativo, son propiedad exclusiva del autor, queda prohibida la reproducción total o parcial de este trabajo.

Autores:

Barcia Gilces Francisco Javier

Cedula de Identidad:

131151156-0

Firma:

Rubio Lino Evelyn Dayanara

Cedula de identidad:

131146349-9

Firma:

RESUMEN

Las técnicas inmunoenzimáticas Enzyme Linked Inmunosorbent Assay (ELISA) han contribuido en el diagnóstico de diferentes enfermedades, por tal razón se consideró en el siguiente proyecto como objetivo potenciar a los Laboratorios de la Carrera de Medicina Veterinaria mediante la adquisición de equipos y material complementario para implementación de una prueba de ELISA. Como metodología se trabajó con marco lógico y matriz de involucrados. Como resultados se contó con los equipos y el material complementario necesarios para realizar en un futuro ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se verificó el correcto funcionamiento de los equipos, mediante una práctica utilizando cada uno de los equipos y materiales comprobando que esté en buen estado y se elaboró el manual instructivo para lograr el mantenimiento, el cuidado y la operatividad de los equipos implementados para el correcto funcionamiento del equipo ELISA.

Palabras claves: asesoramiento técnico, técnica inmunoenzimática, ELISA, laboratorio.

ABSTRACT

The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) immunoenzymatic techniques have collaborated in the diagnosis of different diseases, for this reason the following project considered the objective of empowering the Laboratories of the Veterinary Medicine Career through the acquisition of equipment and complementary material for implementation of an ELISA test. As a methodology, we worked with a logical framework and a matrix of stakeholders. As a result, the necessary equipment and complementary material were available to carry out enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in the future. The correct operation of the equipment was verified, through a practice using each of the equipment and materials, verifying that it is in good condition and the instruction manual was prepared to achieve the maintenance, care and operability of the equipment implemented for the correct operation. of the ELISA team.

Keywords: technical advice, immunoenzymatic technique, ELISA, laboratory.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades presentadas en los animales que provocan problemas en la salud y economía a nivel mundial implican la necesidad de utilizar técnicas precisas para el diagnóstico, de tal manera que se puedan erradicar las diferentes enfermedades, entre ellas: Arteritis Encefalitis Caprina, Maedi Visna, Circovirus Porcino, Bronquitis Infecciosa Aviar, Brucelosis Bovina, Fiebre Aftosa Bovina, Laringotraqueítis Aviar (Thompson, 2010).

Las técnicas inmunoenzimáticas Enzyme Linked Inmunosorbent Assay (ELISA), presentan las mejores características por su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía, en la mayoría de sus aplicaciones son compatibles a diferentes técnicas serológicas y en la aplicación de los diferentes campos de Parasitología, Bacteriología, Virología, Inmunopatología, Toxicología, entre otras, con lo que se puede exponer la gran importancia de las técnicas inmunoenzimáticas y sus posibilidades de aplicación en Patología humana, animal y vegetal (Ochoa, 2012).

El presente trabajo investigativo tiene como objetivo potenciar a los Laboratorios de la Carrera de Medicina Veterinaria mediante la adquisición de equipos y material complementario para implementación de una prueba de ELISA; para lo cual fue necesario la adquisición de equipos, corroborando su correcto funcionamiento; dejando constancia de un manual instructivo para su correcto uso.

El laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria es un establecimiento que se destaca por realizar prácticas con la guía del personal capacitado en el uso y el mantenimiento de los equipos y mediante la implementación de estos equipos se pretende avanzar en el desarrollo de proyectos de investigación que involucren este tipo de análisis y en la formación de los estudiantes.

2. DENOMINACION DEL PROYECTO

El siguiente proyecto tuvo como fin adquirir equipos complementarios, que proporcionara la operabilidad del equipo ELISA ya existente dentro de los Laboratorios Agropecuarios, Carrera de Medicina Veterinaria, pero debido a la falta de equipos anexos no se podía lograr un funcionamiento completo del equipo, limitando investigaciones científicas por parte de docentes y estudiantes.

Es debido a esta necesidad de mejorar nuevas destrezas en el ámbito estudiantil y profesional una de las principales razones por las que es necesario ejecutar este proyecto, además de incrementar el potencial de desarrollar estudios científicos y publicaciones por parte de los docentes, lo cual favorecerá las actividades académicas de la Carrera.

Los equipos adquiridos en este proyecto son los mencionados a continuación:

- **Agitador orbital de microplacas**

En la práctica de enzima de insulina la función del agitador orbital de microplacas es de mezclar y agitar la solución de la placa, se procedió a colocar en el agitador por 30 segundos y cubrir con papel wrap, se incubó por 120 min a temperatura ambiente y se procedió a decantar y posterior a esto se adicionó a 35 Ul de solución de lavado 3 veces, se adicionó 100 Ul de sustrato en los pocillos y se incubó por 15 minutos, luego se adicionó 50 Ul de solución de parada y agitar por 15-20 segundos en el agitador.

En consecuencia, no cabe duda de la importancia de un buen funcionamiento de estos equipos. (Eyci, 2021).

- **Pipetas multicanales**

Las pipetas automáticas de multicanal de volumen variable son el instrumento de precisión ideal para la medición de líquidos en laboratorios, en el uso del reactivo de enzima de insulina se procedió a diluir la solución de lavado en 1000 ml de agua

destilada y a su vez mezclar el Sustrato A con el B. Se seleccionó los pocillos para la calibración y se pipeteó 50 Ul de cada calibrador (ICB, 2022)

- **Depósitos de reactivos para ELISA**

Los depósitos de reactivos en la prueba realizada fueron desechables y de material resistente, su función fue la de facilitar el pipeteo para la administración de reactivos en las microplacas.

De esta manera la operatividad del equipo ELISA beneficiará directamente a los alumnos, docentes y la comunidad científica de la Carrera de Medicina Veterinaria, ubicada en la parroquia Lodana del cantón Santa Ana. El tiempo para la implementación de este proyecto estuvo previsto en el periodo Enero – Febrero del 2022.

Por tal razón, la denominación del presente Proyecto se define como: **ASESORAMIENTO TECNICO EN LA ADQUISICIÓN DE EQUIPOS Y MATERIAL COMPLEMENTARIO PARA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA EN LOS LABORATORIOS AGROPECUARIOS, CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA, CANTÓN SANTA ANA, MANABÍ**

3. LOCALIZACIÓN FÍSICA DEL PROYECTO

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios Agropecuarios pertenecientes a la Carrera de Medicina Veterinaria ubicada en la parroquia Lodana, cantón Santa Ana, Provincia de Manabí, Ecuador.

CARACTERÍSTICAS CLIMATOLÓGICAS.

Pluviosidad media anual: 682,50 mm.

Heliofanía media anual: 1.354 horas luz.

Temperatura promedio anual: 25.39ºC.

Evaporación media anual:1.625,40 mm.

(Weather Spark 2021).

4. FUNDAMENTACIÓN

La implementación del agitador orbital de microplacas, pipetas multicanales, kit de insulina ELISA y los depósitos de reactivo ELISA en el laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria fortalecerá la formación de estudiantes e incrementará la capacidad de desarrollar proyectos de investigación y trabajos de titulación modalidad investigación, actualmente se observa una carencia de equipos complementarios que ayuden al equipo ELISA, lo que limita la ejecución de proyectos de investigación que requieran de estos equipos.

4.1.DIAGNÓSTICO DE LA COMUNIDAD

La Carrera de Medicina Veterinaria es una prestigiosa unidad académica dedicada a la formación de profesionales encargados de la integridad y salud de los animales, tanto de pequeñas especies y destinadas a la producción, consta de instalaciones que permiten brindar conocimientos para el diagnóstico de enfermedades al estar equipadas con microscopios, equipos de diagnósticos histológicos, equipos para análisis de bioquímica sanguínea. Al ser una instalación que brinda prácticas a sus estudiantes es necesario incorporar y renovar equipos para brindar nuevos conocimientos, es por ello que se propuso la implementación de un agitador orbital de microplacas, pipetas multicanales, Kit de insulina de humanos ELISA y depósitos de reactivos ELISA.

En el campo de la medicina veterinaria, la técnica ELISA es ampliamente utilizada para la detección y diagnóstico de enfermedades que afectan al ganado, aves o animales de compañía. De este modo, la detección de anticuerpos frente a la lengua azul, la Brucella, la leucosis enzoótica bovina, la peste porcina, la glicoproteína gE de la enfermedad de Aujeszky o de la proteína priónica patógena de las encefalopatías espongiformes transmisibles, son algunos de los ensayos comunes realizados mediante la técnica ELISA en laboratorios de entidades y empresas que se dedican al control de la salud animal.

La utilización de insulina de humanos ELISA es un método para la determinación cuantitativa de insulina humana en suero o plasma, es un inmunoensayo de fase sólida de dos puntos. Se basa en la técnica de sandwich directo según la que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos separados de la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados en peroxidasa y anticuerpos anti-insulina ligados con pocillo de microtitración (Mercodia, 2017).

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario en el Ecuador emplea las diferentes técnicas de Elisa en el diagnóstico de diferentes enfermedades en los animales mediante pruebas químicas descritas a continuación:

Cuadro 1: Diagnóstico de diferentes enfermedades en los animales mediante pruebas químicas.

Enfermedad	Diagnóstico	Técnica
Arteritis Encefalitis Caprina Maedi Visna	Diagnóstico de Arteritis Encefalitis Caprina/Maedi-Visna mediante la técnica ELISA para detección de anticuerpos, para la Detección oportuna de patógenos causantes de enfermedades veterinarias para la aplicación de medidas adecuadas de prevención, control y atención de problemas zoosanitarios	Elisa I (serología)
Circovirus Porcino Tipo II ELISA	La circovirosis porcina es una enfermedad de distribución mundial causada por el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), un virus de ADN de la familia Circoviridae (Todd et al., 1991) que afecta tanto a cerdos jóvenes como adultos, produciendo un fuerte impacto económico sobre la producción porcina	ELISA AC (virología)
Bronquitis Infecciosa Aviar ELISA	La Bronquitis Infecciosa (BI) es una infección altamente contagiosa entre las aves, aguda y de importancia económica que es causada por un Coronavirus del grupo 3.	Elisa I (serología)
Brucelosis Bovina ELISAc	diagnóstico de Brucelosis bovina ,Brucella abortus, B. suis, B. melitensis, mediante la técnica ELISA competitivo, prueba de tipo confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis	Elisa I (serología)

Brucelosis Bovina ELISAi	diagnóstico de Brucelosis bovina mediante la técnica ELISA indirecto, a partir de suero o leche. Prueba de tipo screening.	Elisa I (serología)
Fiebre Aftosa Bovina ELISA CFL	La fiebre aftosa es una enfermedad animal transfronteriza que afecta gravemente la producción de ganado, alterando el comercio regional e internacional de animales y productos de origen animal.	Elis CFL (virología)
Laringotraqueítis Aviar ELISA	diagnóstico anticuerpos contra Laringotraqueitis infecciosa aviar mediante la técnica ELISA. La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) es una enfermedad respiratoria de los pollos causada por un alfa- herpesvirus, gallid herpesvirus 1. Tal enfermedad puede afectar también a los faisanes, las perdices y los pavos reales	Elisa I (serología)
Neospora Caninum (ELISAi)	Neospora caninum es un protozoario Apicomplexa que infecta muchas especies de mamíferos, entre ellas perros, bovinos, ovinos, caballos y cabras. La neosporosis es una parasitosis que afecta el rendimiento económico del sector ganadero al ocasionar abortos y mortalidad neonatal.	Elisa I (serología)
NEWCASTLE mediante técnica ELISA	La enfermedad de Newcastle es una infección altamente contagiosa y con frecuencia severa que existe en todo el mundo y afecta a las aves, incluidas las aves de corral domésticas. Es causada por un virus de la familia de los paramyxovirus	Elisa I (serología)
Piroplasmosis equina Babesia caballi ELISAc	La piroplasmosis equina (PE) es una enfermedad infecciosa de los équidos producida por los protozoos parásitos intraeritrocitarios Babesia caballi (B. caballi) y Theileria equi (T. equi). Anteriormente T. equi se designaba como Babesia equi	Elisa C (Virología)
Gastroenteritis Transmisible Porcina ELISA	La gastroenteritis transmisible (GET), es una enfermedad entérica de los cerdos causada por el virus TGEV, que pertenece a los Coronaviridae	Elisa Ac (Virología)
Influenza Porcina H1N1 ELISA	La influenza porcina (gripe porcina) es una enfermedad respiratoria de los cerdos causada por el virus de influenza tipo A que regularmente causa brotes de influenza en los cerdos.	Elisa Ac (Virología)
Leucosis Bovina ELISAc	La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad neoplásica del sistema retículo endotelial del ganado causada por la infección con el virus de la leucosis bovina	Elisa Ac (Virología)

Mycoplasma gallisepticum Aviar ELISA	Mycoplasma gallisepticum (MG), son dos de los patógenos más importantes en la industria avícola. La infección puede cursar con signos muy variables, pudiéndose presentar de una manera subclínica o causando una enfermedad grave con signos respiratorios severos y problemas articulares.	Elisa Ac (Virología)
Neumonía Enzootica Porcina My hyop ELISA	Enfermedad crónica porcina de gran importancia mundial. Su forma crónica es frecuente en sitos de producción continua.	Elisa Ac (Virología)

Fuente: Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

4.2.IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria ha prestado sus instalaciones para la formación de los nuevos profesionales, permitiéndoles conocer diferentes técnicas de diagnóstico para la detección de diferentes patologías. Sin embargo, se carece de equipos como el agitador orbital de microplacas, pipetas multicanales, contenedores de reactivos. Esta carencia afecta directamente en la operatividad del equipo ELISA y, en consecuencia, a las actividades académicas de la Carrera.

4.3.PRIORIZACION DEL PROBLEMA

La principal prioridad en el laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinarias es brindar una formación académica de una mayor calidad, que, apoyada en la implementación de nuevos equipos de laboratorio, fortalezca la investigación y prácticas de los futuros profesionales

5. JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria es un establecimiento que se destaca por realizar prácticas con la guía del personal capacitado en el uso y el mantenimiento de los equipos. Aunque este establecimiento dispone del lector de ELISA, carece de determinados equipos cómo las pipetas multicanales, el agitador orbital y los contenedores de reactivos que contribuyen al adecuado funcionamiento del equipo, como ELISA que permitan realizar pruebas inmunológicas.

Por tanto, mediante la implementación de estos equipos se pretende avanzar en el desarrollo de proyectos de investigación que involucren este tipo de análisis y en la formación de los estudiantes.

6. OBJETIVO

5.1 Objetivo General

- Asesorar la adquisición de equipos y material complementario para implementación de la técnica de ELISA

5.2 Objetivos específicos

1. Adquisición de un agitador de microplacas, pipetas multicanales y recipientes para reactivos de ELISA como material complementario de un lector de ELISA.
2. Corroborar el correcto funcionamiento de los equipos mediante un kit de insulina.
3. Elaborar un manual instructivo para el correcto uso de los equipos.

7. MARCO DE REFERENCIA

La técnica ELISA es un ensayo inmunológico comúnmente utilizado para medir anticuerpos, antígenos, proteínas y glicoproteínas en muestras biológicas. Algunos ejemplos incluyen: diagnóstico de infección por VIH, pruebas de embarazo y medición de citocinas. Los ensayos ELISA generalmente se llevan a cabo en placas de 96 pocillos, permitiendo medir múltiples muestras en un solo experimento (Horlock, 2020).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica de uso común para la determinación de analitos. Se utilizan habitualmente en investigación científica, medicina veterinaria agrícolas y en cuidado de la salud. Consiste en reconocer el analito diana (un antígeno) con alta especificidad por anticuerpos, que son proteínas producidas por el sistema inmunológico. El sistema inmunológico de los animales produce anticuerpos en respuesta a la presencia de antígenos y pueden reconocer y unirse, finalmente el anticuerpo unido forma la base de la detección (Thompson, 2010).

El ELISA se basa en este reconocimiento antígeno-anticuerpo selectivo y específico. Se han desarrollado varios tipos de pruebas ELISA, tanto cualitativas como cuantitativas. La ejecución de una prueba ELISA implica el uso de al menos un anticuerpo específico para cada antígeno en particular. El principio básico es que uno de estos componentes inmunológicos está inmovilizado en una fase sólida en los pocillos de una microplaca. El analito extraído de la muestra interactúa con el sistema anticuerpo-antígeno. Esta interacción puede visualizarse mediante enzimas, unirse a anticuerpos o antígenos secundarios, e indicar si se ha producido la unión antígeno-anticuerpo. Se agrega un sustrato que es convertido por el complejo enzima-anticuerpo produciendo un cambio de color, que se puede medir con un espectrofotómetro (Hosseini et al., 2018).

El antígeno es aquella sustancia que, en condiciones apropiadas, es capaz de inducir la formación de uno o más anticuerpos, reaccionando específicamente con estos. Por otro lado, los anticuerpos son sustancias glicoproteicas también definidas como

inmunoglobulinas o gammaglobulinas y la producción de anticuerpos se obtiene por diferenciación de células plasmáticas tras la acción de la respuesta inmune (Satija et al., 2016).

Los anticuerpos son proteínas producidas en células plasmáticas de vertebrados, como parte del sistema inmunológico adaptativo contra estructuras (antígenos) que se reconocen como extrañas al cuerpo. Los anticuerpos se unen a sus respectivos antígenos de acuerdo con un patrón distintivo de interacciones iónicas e hidrófobas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La interacción entre el anticuerpo y el antígeno es selectiva y muy específica, similar a la de una cerradura con su propia llave (Guo et al., 2016).

Mientras que un ELISA tipo sándwich detecta solo proteínas intactas y fragmentos grandes con al menos dos sitios de unión, un ELISA competitivo puede detectar fragmentos de proteínas grandes y pequeños con un solo sitio de unión. Por esta razón, el ELISA competitivo también se puede utilizar para productos alimenticios altamente procesados (Grinyte et al., 2016).

Así, los ensayos de producción de anticuerpos dependen de la medida de la interacción del anticuerpo con el antígeno, esta unión de antígeno-anticuerpo se puede medir en solución por métodos como diálisis de equilibrio, midiendo la producción de complejos antígeno-anticuerpo insolubles en soluciones o geles acuosos, o midiendo la absorción de antígeno soluble al anticuerpo en fase sólida (Hornberck, 2019).

ELISA indirecto

En esta prueba, el pocillo tiene unido el antígeno específico contra el que va dirigido el anticuerpo que se está buscando en la muestra. En el primer paso, se agrega la muestra del paciente, y si el anticuerpo está presente, se unirá al antígeno que ya estaba adherido al pocillo. Luego se hace un lavado para eliminar todo lo que no se haya

unido al antígeno y, posteriormente, se agrega un anticuerpo conjugado con una enzima, el cual se unirá al anticuerpo, solo si está presente en la muestra del paciente (Ríos et al., 2012).

ELISA sándwich

Ésta es la forma más utilizada para la detección de antígenos. En esta prueba, el pocillo tiene unido un anticuerpo específico contra el antígeno que se está buscando en la muestra. En el primer paso, se agrega la muestra del paciente y, si el antígeno está presente, se unirá al anticuerpo que estaba adherido al pocillo. Luego se hace un lavado para eliminar todo lo que no se haya unido al anticuerpo (Rios, Mercadillo, Yuil, Castro, 2012).

ELISA competitivo

La clave del ELISA competitivo es el proceso de reacción competitiva entre el antígeno de la muestra y el antígeno unido a los pocillos de una placa con el anticuerpo primario. Primero, el anticuerpo primario se incuba con el antígeno de la muestra y se agregan los complejos anticuerpo-antígeno resultantes a pocillos que han sido recubiertos con el mismo antígeno (Gan & Patel, 2013).

En el cuadro 1 se aprecian las ventajas y desventajas de ELISA tipo sandwich:

Cuadro 1. Características del ELISA tipo sandwich

ELISA TIPO SANDWICH	Ventajas: 1. Esta técnica tiene una flexibilidad alta, por medio de la cual la detección se la puede realizar por un procedimiento directo e indirecto. 2. La especificidad y sensibilidad es alta en esta técnica ya que, frente al antigeno se usan dos anticuerpos Desventajas: 3. En este tipo de técnica no siempre es posible contar con pares de anticuerpos. 4. El tamaño que debe tener el antígeno debe ser grande ya que, debe permitir que los anticuerpos se unan de manera sincrónica.

Fuente: (Abynteck, 2019).

8. BENEFICIARIOS

8.1.BENEFICIARIOS DIRECTOS

- Docentes de la Facultad.
- Estudiantes de la Facultad.

Estos dos estamentos se consideran beneficiarios directos, pues un lector de ELISA permitirá desarrollar investigaciones que involucren a docentes y tesistas de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

8.2.BENEFICIARIOS INDIRECTOS

- Comunidad científica de la UTM

Este estamento es beneficiario debido que, al plantearse investigaciones en los laboratorios agropecuarios, probablemente se incrementan las publicaciones en la comunidad científica universitaria.

9. METODOLOGIA

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios Agropecuarios pertenecientes a la Carrera de Medicina Veterinaria ubicada en la parroquia Lodana, cantón Santa Ana, Provincia de Manabí, Ecuador. El trabajo consistió en la adquisición de equipos complementarios (Agitador orbital de microplacas, pipetas multicanales y depósitos de reactivos para ELISA)

Como primer paso se revisó el contenido del Kit de insulina, el mismo que contenía: 6 calibradores 0 (A), 5 (B), 25 (c), 50 (D), 100 (E) y 300 (F); reactivo de enzima de insulina, plato con pocillos, solución de lavado, sustrato A y B y solución de parada. Fue necesario utilizar material adicional para proceder a la calibración (ver anexos).

En el procedimiento se realizó lo siguiente:

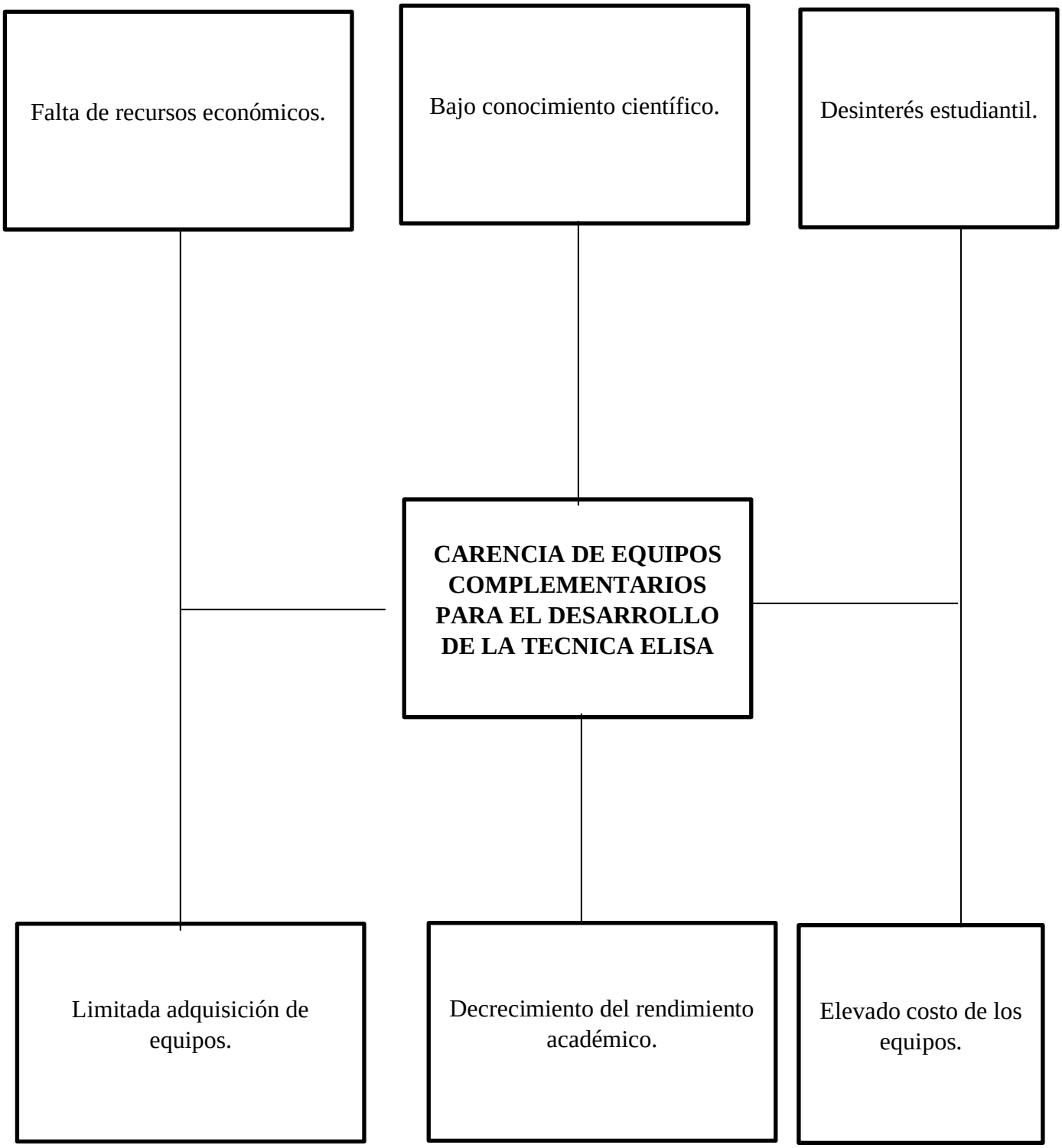
- Diluir la solución de lavado en 1000 ml de agua destilada y a su vez mezclar el Sustrato A con el B.
- Se seleccionó los pocillos para la calibración y se pipeteó 50 Ul de cada calibrador adicionalmente se agregó100 Ul de reactivo de enzima de insulina se procedió a poner en el agitador por 30 segundos y cubrir con papel wrap.
- Se incubó por 120 minutos a temperatura ambiente y se procedió a decantar y posterior a esto se adicionó a 35 Ul de solución de lavado 3 veces.
- Se adicionó 100 Ul de sustrato en los pocillos y se incubó por 15 minutos luego se adicionó 50 Ul de solución de parada y agitar por 15-20 seg en el agitador.
- Finalmente se colocó en el lector de ELISA.

Con lo descrito anteriormente se verificó el funcionamiento de los equipos y su correcta calibración dando cumplimiento a los objetivos planteados.

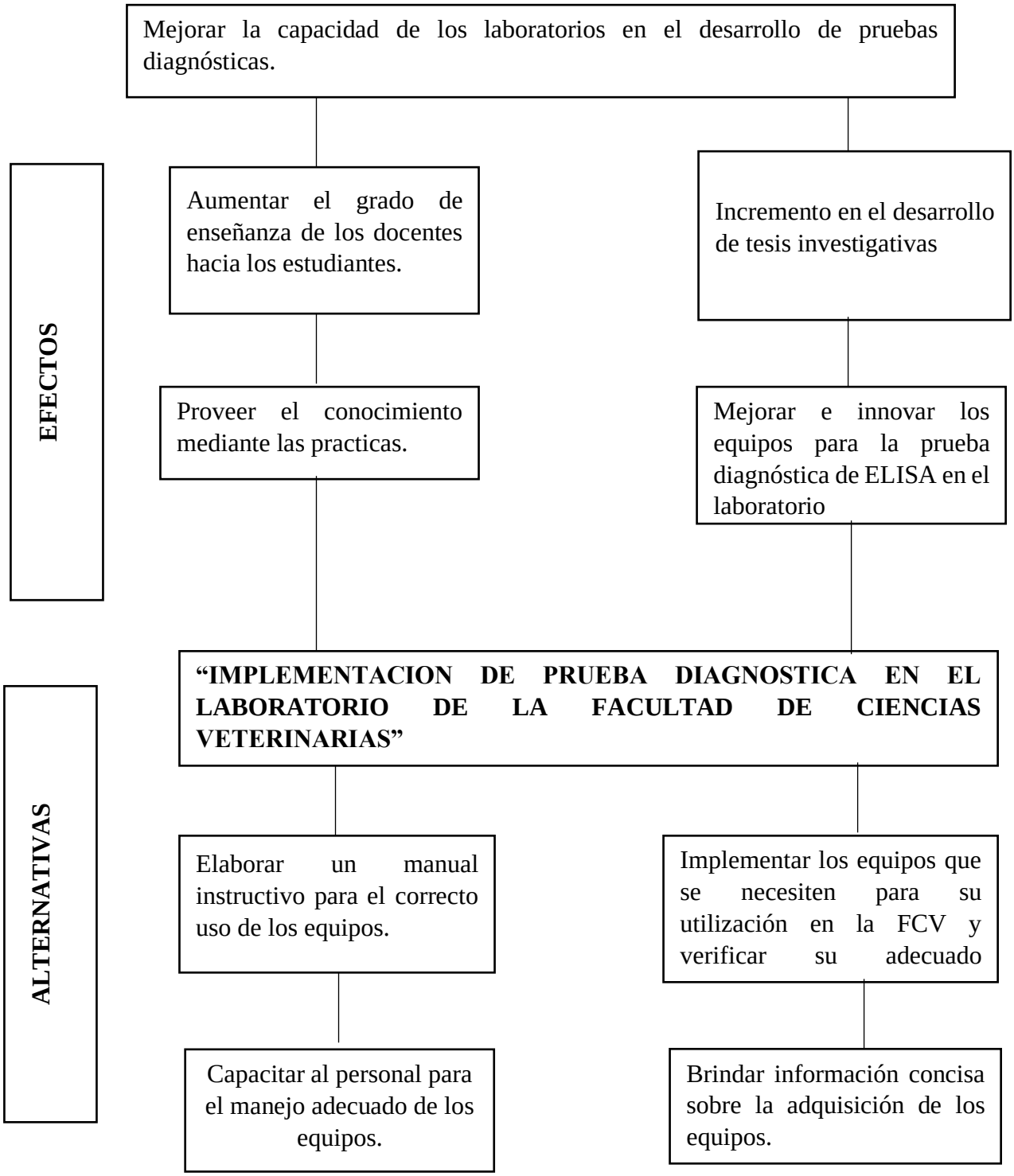
9.1.MATRIZ DE INVOLUCRADOS

GRUPOS	INTERESES	PROBLEMAS PREVISTOS	RECURSOS Y MANDATOS	INTERESE SDEL PROYECT O	CONFLICTOS POTENCIALES
Autoridade sDe la FCV. De la UTM	Ofrecer los equipos complementarios de pruebas diagnósticas ELISA para el desarrollo de proyectos de investigación	No obtención de los equipos yreactivos necesarios en el tiempo previsto.	Brindar material informativo para así desarrollar el interés d el docente y el estudiante	Fortalecer la la capacidad diagnóstica y de investigación de los laboratorio specuarios.	Escasez dematerial informativo sobre cuidado ymantenimiento delos equipos
Docentes de la FCV.	Impartir conocimiento alos estudiantes mediante las prácticas d elaboratorio	Escasez de conocimientos para el correcto manejo de los equipos	Capacitar a lpersonal para quela finalidad de laprueba s eaadecuadamente ejecutada	Disponer d e equipos q uepermitan incrementar la capacidad de investigación y docencia	No se utiliza el lector de ELISA
Estudiantes de laFCV.	Ampliar el conocimiento dela literatura mediante la práctica en el laboratorio	Dificultad para manejar e interpretar los resultados dados por la prueba diagnóstica	Mantener un ambiente confortable durante la práctica en el laboratorio	Reforzar l osconocimientos impartidos mediante l asprácticas	Carencia d e recursos para invertir en equipos complementarios para prueb adiagnóstica y bajorendimiento
Empleados delárea de investigación científica de la FCV	Mejorar la ejecución en cuanto al manejo de los equipos	Inconvenientes para manipular los equipos complementarios de la prueba diagnóstica	Informar de cómo manejar losequipos complementarios de la prueba diagnóstica	Personal capacitado para el adecuado funcionamiento de los equipos	Déficit deconocimiento para la utilización correcta de los equipos

9.2.ARBOL DEL PROBLEMA



9.3.ARBOL DE OBJETIVOS



9.4.MARCO LOGICO

OBJETIVO	INDICADORES	MEDIOS DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS
Fin Incremento de las capacidades de investigaciones diagnósticas de los laboratorios Agropecuarios	Proporción de proyectos de investigación y trabajos de titulación que involucran el uso del lecto de ELISA	Publicaciones y trabajos de titulación que involucran el lector de ELISA	Disponibilidad de recursos e interés de los involucrados
Propósitos Potenciar a los Laboratorios de la Carrera de Medicina Veterinaria mediante la adquisición de equipos y material complementario para implementación de una prueba de ELISA	Incremento en la utilización del equipo y las instalaciones.	Número de pruebas realizados en el lector de ELISA	Potenciar la capacidad de los laboratorios agropecuarios
Componentes Adquisición de agitador de microplacas y de pipetas multicanales, como material complementario de un equipo de ELISA.	Documentos de cotización de los equipos	Recepción y verificación de los equipos implementados por el Tutor de Tesis	Mayor índice de tesis investigativas por parte de docentes y estudiantes.
Corroborar el funcionamiento del ELISA mediante la implementación de una prueba de insulina.	Adquirir Kit de Insulina para realizar prueba de los equipos	Verificación de los resultados utilizando el equipo de ELISA	Pruebas realizadas con éxito en tesis investigativas.
Elaborar un manual instructivo para el correcto uso de los equipos.	Análisis de las fichas técnicas de los equipos implementados	Entrega y aceptación del manual a las autoridades del laboratorio	Aceptación de los manuales implementados en el laboratorio.
Actividades Investigar y cotizar el agitador de microplacas y pipetas multicanales.	Corroborar y presentar los diferentes equipos previa aceptación y aprobación por parte del Tutor de Tesis.	Proformas Facturas	Entrega de los equipos designados al laboratorio

Adquirir el Kit de Insulina para realizar la prueba de funcionamiento de los equipos	Adquisición del Kit de ELISA (Insulina).	Ensayo exitoso en la prueba de los equipos de ELISA. Fotografías. Facturas. Acta de entrega de los equipos en el laboratorio de FCV.	Pruebas eficientes y eficaces mediante el Kit de ELISA implementado.
Previo a la entrega de los equipos realizar un manual de acuerdo al funcionamiento de los equipos implementados	Presentar avance y correcciones de los manuales al Tutor de Tesis	Entrega del manual a las autoridades del laboratorio Fotografías.	Correcta interpretación y utilidad de los manuales implementados

10. RECURSOS UTILIZADOS

RECURSOS HUMANOS

- Tutor de tesis.
- Tesistas.
- Autoridades evaluadoras.

RECURSOS MATERIALES

- Agitador orbital de microplacas #1.
- Pipetas multicanales #6.
- Kit de insulina de humanos ELISA #1.
- Depósito de reactivos ELISA #200.

RECURSOS FINANCIEROS

- Trabajo de titulación financiado por los propios tesistas.

11. EJECUCION DEL PROYECTO

ACTIVIDADES	INSUMOS		FECHAS DE EJECUCION		FUENTES DE VERIFICACION	RESULTADOS CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS			
	MATERIALES	HUMANOS	PREVISTA	LIMITES		25%	50%	75%	100%
						P	B	MB	E
Elaboración del anteproyecto	Internet Computadoras	Alumnos Tutor	Abril	Junio	Proyecto deTesis				X
Corrección del anteproyecto	Internet Computadoras	Alumnos Tutor	Mayo	Junio	Revisión bibliográfica				X
Aprobación del proyecto	Internet Computadoras	Alumnos Tutor	Junio	Julio	Certificación emitida por Proceso de Titulación				X
Compra de equipos	Internet	Alumnos Proveedores	Julio	Agosto	Facturas				X
Avances del proyecto	Internet Computadoras	Alumnos	Junio	Agosto	Archivos del proyecto				X
Prueba de equipos	Instalaciones de Laboratorio	Alumnos Tutor	Septiembre	Agosto	Notificación del status de los equipos				X
Presentación final	Instalaciones de Laboratorio	Alumnos Tutor	Noviembre	Diciembre	Actas de entrega Manual de manejo para equipo ELISA				X

12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.1 Conclusiones

- La adquisición de equipos como el agitador orbital de microplacas, pipetas multicanales y depósitos de reactivos para ELISA, sirvieron de complemento para el lector de ELISA, con lo que favorece la realización de las pruebas que permiten el desarrollo de trabajos científicos en los laboratorios agropecuarios.
- Se corroboró el correcto funcionamiento de los equipos mediante una práctica con la utilización de un kit de insulina, empleando los equipos y materiales, dando como resultado el buen funcionamiento de los mismos.
- Se elaboró un manual instructivo para el correcto uso de los equipos y la descripción del procedimiento directo, contenido, material adicional, preparación de reactivos, procedimiento e interpretación.

12.2. Recomendaciones

- Es necesario capacitar a futuros docentes y estudiantes que hagan uso de los equipos implementados y no posean conocimiento en el correcto uso de los mismos.
- Instruir a los nuevos usuarios de los equipos la lectura de los respectivos manuales de cada equipo con el fin de preservar su vida útil y correcto funcionamiento.
- Incentivar el desarrollo de investigaciones científicas pudiendo proporcionar el respectivo uso a los equipos implementados.

13. SOSTENIBILIDAD Y SUSTENTABILIDAD

12.1 Sostenibilidad

El presente proyecto se basó en la carencia de equipos, materiales complementarios y la importancia que tiene cada uno para poder realizar pruebas y cuyo fin es beneficiar de manera positiva a los docentes y estudiantes de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Se tuvo la adquisición del agitador de microplacas, kit de insulina, pipeta multicanales y los depósitos de reactivos de Elisa para los laboratorios agropecuarios, los cuales complementan al lector de Elisa lo que permitirá desarrollar trabajos científicos y de carácter investigativo.

12.2 Sustentabilidad

La falta de recursos económicos y el elevado costo de los equipos y el material complementario para el lector de Elisa fueron los principales motivos por los cuales radicó la problemática es por esto que se realizó la adquisición de equipos y material el cual complementa al lector de Elisa en los laboratorios agropecuarios de la Facultad de Medicina Veterinaria ubicada en la parroquia Lodana del cantón de Santa Ana, de la provincia de Manabí.

14. RESULTADOS OBTENIDOS

1. Se contó con los equipos y el material complementario necesarios para realizar En un futuro ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

2. Se verificó el correcto funcionamiento de los equipos, mediante una práctica utilizando cada uno de los equipos y materiales comprobando que esté en buen estado.

3. Se elaboró el manual instructivo para lograr el mantenimiento, el cuidado y la operatividad de los equipos implementados para el correcto funcionamiento del equipo ELISA

15. CRONOGRAMA VALORADO

PRESUPUESTO TESIS			
Rubro	**Cantidad**	**Precio Unit.**	**Total USD**
Presupuesto Tesistas			
Agitador orbital de microplacas	1	$ 896,00	$ 896,00
Pipetas multicanales	6	$ 179,20	$ 1075,20
Kit de insulina de humanos ELISA	1	$ 300,00	$ 300,00
Depósito de reactivos ELISA	200	$ 0.99	$ 495,00
Movilización	5	$ 4,00	$ 20,00
Subtotal			$ 2786.20
Total			**$ 2786.20**

EL SIGUIENTE CRONOGRAMA VALORADO EQUIVALE AL PRESUPUESTO QUE SE DESTINÓ PARA LA ELABORACIÓN DE LA SIGUIENTE TESIS EN MODALIDAD DE PROYECTO COMUNITARIO CON EL TEMA **''ADQUISICIÓN DE EQUIPO COMPLEMENTARIO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA ELISA EN LOS LABORATORIOS AGROPECUARIOS, CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA, CANTÓN SANTA ANA, MANABÍ''** CABE RECALCAR QUE LA SIGUIENTE TESIS FUE FINANCIADA POR LOS AUTORES

16. BIBLIOGRAFIA

Abynteck. (2019). Tipos de Elisa. Recuperado el 2022, de https://www.abyntek.com/ventajas-y-desventajas-de-los-distintos-tipos-de-elisa/

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. peptides, 72, 4-15. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012

de la Rica, R., & Stevens, M. M. (2012). Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. Nat Nanotechnol, 7(12), 821-824. doi:10.1038/nnano.2012.186

Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chem, 56(2), 319-320. doi:10.1373/clinchem.2009.127803

Grinyte, R., Barroso, J., Möller, M., Saa, L., & Pavlov, V. (2016). Microbead QD-ELISA: Microbead ELISA Using Biocatalytic Formation of Quantum Dots for Ultra High Sensitive Optical and Electrochemical Detection. ACS Applied Materials & Interfaces, 8(43), 29252-29260. doi:10.1021/acsami.6b08362

Guo, L., Xu, S., Ma, X., Qiu, B., Lin, Z., & Chen, G. (2016). Dual-color plasmonic enzyme-linked immunosorbent assay based on enzyme-mediated etching of Au nanoparticles. Scientific Reports, 6(1), 32755. doi:10.1038/srep32755

Gan, S., & Patel, K. (2013). *Enzyme immunoassay and enzyme-linked Immunosorbent assay*. Recuperado el 2021, de https://core.ac.uk/download/pdf/82795341.pdf

Gelkop, S., Sobarzo, A., Brangel, P., Vincke, C., Romão, E., Fedida-Metula, S., . . . Lobel, L. (2018). The development and validation of a novel nanobody-based competitive elisa for the detection of foot and mouth disease 3abc antibodies in cattle. Front Vet Sci, 5, 250. doi:10.3389/fvets.2018.00250

Guzmán Vázquez, E. (2015). *Las pruebas de ELISA*. Recuperado el 2021, de https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf

Horlock, C. (2020). *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Recuperado el 2021, de https://www.immunology.org/public-information/bitesized-

immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay

Hornberck, P. (2019). *Enzyme-linked immunosobent assays (ELISA)*. Recuperado El 2021, de https://www.researchgate.net/publication/5419670_Enzyme-linked_Immunosorbent_Assays_ELISA

Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., & Martinez-Chapa, S. O. (2018). Advantages, Disadvantages and Modifications of Conventional ELISA. In Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): From A to Z (pp. 67-115). Singapore: Springer Singapore.

Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017). Indirect immunometric ELISA. Cold Spring Harb Protoc, 2017(5). doi:10.1101/pdb.prot093708

Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Methods Mol Biol, 1592, 79-94. doi:10.1007/978-1-4939-6925-8_7

Kuo, H. T., Yeh, J. Z., Wu, P. H., Jiang, C. M., & Wu, M. C. (2012). Application of immunomagnetic particles to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for improvement of detection sensitivity of HCG. J Immunoassay Immunochem, 33(4), 377-387. doi:10.1080/15321819.2012.655820

Lequin, R. (2005). *enzyme immunoassay (EIA)/ enzyme-linked immunosorbent (ELISA)*. Recuperado el 2021, de https://academic.oup.com/clinchem/article/51/12/2415/5629720?login=true

Martínez Covarrubias, A. G., Santillán Flores, M. A., Guzmán Ruiz, C. C., Favila Humara, L.D., Córdova López, D., Díaz Aparicio, E., . . . Blanco Ochoa, M. Á. (2012). Desarrollode un inmuno–ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev. mex. de cienc. pecuarias vol.3 no.1 Mérida ene./mar. 2012*.

Monzón , C. M., Mancebo , O., & Ruso , A. M. (2010). Evaluación de las pruebaselisa-s para detección de antígenos y anticuerpos en el diagnóstico de surra (mal de caderas) de los equinos. *Sitio Argentino de Producción Animal*.

Ochoa, F. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos* . Recuperado el 2021, de https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&alias=7 42-pubfinlay-librotecinmunoparaeclinvacunas2012&Itemid=226

Ochoa, R. (2012). *Tecnicas inmunoenzimaticas para ensayos clinicos de vacunas y estudios inmunoepidemiologicos.* La Habana: Finlay Ediciones. Obtenido de https://www.paho.org/cub/dmdocuments/PubFINLAY-LIBROTecInmunoParaEClinVacunas2012.pdf

Puente Pilacuán , V. C., & Oña Pachacama , D. M. (2013). *Evaluacion de los efectos de la administracion de un inmunomodulador de origen natural (birm®) en pollos de engorde.* Quito: Universidad Central del Ecuador.

Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. Br J Hosp Med (Lond), 77(7), C98-101. doi:10.12968/hmed.2016.77.7.C98

Shivaprasad, H. L. (2014). Patología de las Aves – Una Revisión. *Herramientas de Diagnósticoy Prevención.* Castelló: CECAV.

Rios, J., Mercadillo, P., Yuil, E., Castro, M. (2012). ELISA y sus aplicaciones en dermatología. Recuperado el 2021, de https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123j.pdf

Satija, J., Punjabi, N., Mishra, D., & Mukherji, S. (2016). Plasmonic-ELISA: expanding horizons. RSC Advances, 6(88), 85440-85456. doi:10.1039/C6RA16750K

Thompson, M. (2010). *Immunoanalysis*. Recuperado el 2021, de https://www.rsc.org/globalassets/03-membership-community/connect-with-others/through-interests/divisions/analytical-division/amc/technical-briefs/analytical- methods/immunoanalysis-part2.pdf

U-CyTech. (2020). *U-CyTech Biosciences*. Obtenido de https://ucytech.com/inmunoensayos-de-u-cytech

Weather Spark (2021). Clima promedio en Santa Ana. Obtenido de https://es.weatherspark.com/y/18294/Clima-promedio-en-Santa-Ana-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o

17. ANEXOS

DETERMINACION DE INSULINA HUMANA POR ELISA

INTRODUCCIÓN

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), por sus siglas en inglés, es conceptualizada en la actualidad como la prueba de oro para los inmunoensayos. Utilizada para la detección y cuantificación de sustancias como anticuerpos, proteínas, glicoproteínas y hormonas, el ELISA resulta muy sensible al detectar productos mediante la unión antígeno-anticuerpo de un compuesto cuantificable por su densidad óptica. La primera metodología de ELISA involucró moléculas cromogénicas y sustratos para generar un cambio de color observable, y en la actualidad, se emplean técnicas ultrasensibles basadas en enzimas que manipulan nanopartículas cromogénicas (Aydin, 2015; Engvall, 2010; Shah y Maghsoudlou, 2016).

La ejecución de un ensayo de ELISA prevé el uso de placas que típicamente poseen 96 pocillos recubiertos con soluciones de anclaje en función de la metodología a emplearse; el anticuerpo de detección primario es un anticuerpo específico que solo se une a la proteína de interés, mientras que un anticuerpo de detección secundario es un segundo anticuerpo conjugado con enzima que se une a un anticuerpo primario que no está conjugado con enzima. En términos prácticos, existen cuatro pasos principales para completar un inmunoensayo; i) recubrimiento con antígeno o anticuerpo; ii) Bloqueo; iii) detección; iv) lectura final. Entre cada uno de los cuatro pasos anteriores hay un "lavado" de la placa utilizando un tampón, como solución salina tamponada con fosfato (PBS) y un detergente no iónico, para eliminar el material no unido (de la Rica y Stevens, 2012; Kohl y Ascoli, 2017; Kuo *et al*., 2012).

Konstantinou (2017) y Gelkop *et al*. (2018) describen como existan cuatro tipos de ELISA empleados en la actualidad: 1) directo (placa recubierta de antígeno; detección de anticuerpos); 2) indirecto (placa recubierta de antígeno; detección de antígeno / anticuerpo); 3) tipo sándwich (placa recubierta de anticuerpos; detección de antígenos); 4) competitivo (detección de anticuerpos).

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DIRECTO

Nombre del test: Insulin Test System

Código del producto: 2425-300

Empleo: determinación cuantitativa

Casa comercial: Monobind Inc./Accu-Bind ELISA Microwells

Contenido del Kit

A. Calibradores de Insulina-2.0 ml/vial [Íconos A-F]. Seis viales para antígeno de insulina en los siguientes niveles 0(A), 5(B), 25(C), 50(D); 100(E); y 300(F) µlU/ml.
B. Reactivo de enzima de Insulina-13ml/vial.
C. Plato con pocillos (96).
D. Solución de lavado concentrada-20ml/vial.
E. Sustrato A-7ml/vial.
F. Sustrato V-7ml/vial.
G. Solución de alto o parada.
H. Inserto de instrucciones.

Material adicional

1. Pipetas con volúmenes de absorción entre 50µl a 100µl.
2. Contenedores para reactivo.
3. Lavadora de microplaca (opcional).
4. Agitador de microplaca.
5. Lector de ELISA con longitudes de onda entre 450nm a 620nm.
6. Papel absorbente para absorción al voltear microplaca.
7. Papel wrap como cobertor de microplaca.
8. Temporizador (opcional).
9. Agua destilada.

Preparación de reactivos

1. Buffer de lavado: diluir 20ml de solución de alto o parada en 1000ml de agua destilada.
2. Solución de sustrato de trabajo: mezclar el contenido de sustrato A y sustrato B.

Procedimiento:

Trabajar con los reactivos a temperatura ambiente (20-27).

A. Seleccionar los pocillos destinados al control y muestras.
B. Pipetear 50µl de cada calibrador en el pocillo seleccionado.
C. Adicionar 100µl de reactivo de enzima de insulina.
D. Agitar en el agitador de microplaca durante 30 segundos y posteriormente cubrir con papel wrap.
E. Incubar 120 minutos a temperatura ambiente.
F. Descarte el contenido del microplaca mediante el decantado o aspiración con lavadora. Si decanta, cubra y voltee el microplaca con papel absorbente.
G. Adicione 35µl del buffer de lavado, repita el paso (F) hasta completar 3 lavados.
H. Adicione 100µl de solución de sustrato de trabajo en todos los pocillos utilizados (preste atención a no agitar el microplaca).
I. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
J. Adicione 50µl de solución de alto o parada en cada pocillo y agite 15-20 segundos en el agitador de microplaca.
K. Lea la absorbancia en el lector de ELISA; longitud de onda 1: 450nm; longitud de onda 2: 630nm.

Interpretación

Procedimiento de calibración

El resultado de la calibración debe acercarse a la media de absorbancia (Mean Abs)

Ejemplo 1

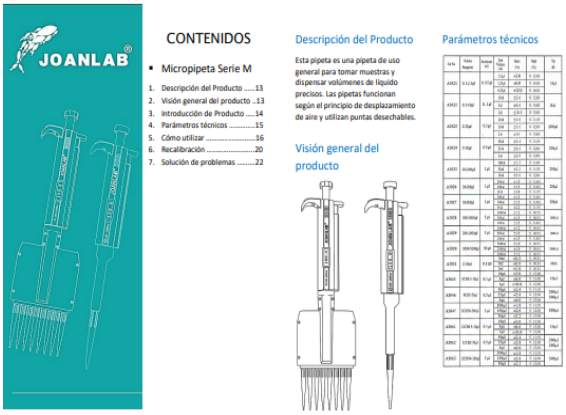
Ejemplo de identificación	Número de pozo	Absorción (A)	Media absorción (B)	Valor (µIU/ml)
Cal A	A1	0,011	0,01	0,0
	B1	0,009		
Cal B	C1	0,054	0,054	5,0
	D1	0,053		
Cal c	E1	0,244	0,43	25,0
	F1	0,241		
Cal D	G1	0,464	0,476	50,0
	H1	0,488		
Cal E	A2	0,882	0,902	100,0
	B2	0,922		
Cal F	C2	2,467	2,405	300,0
	D2	2,342		
Ctrl 1	E2	0,065	0,065	6,4
	F2	0,067		
Ctrl 2	G2	1,581	1,587	188,0
	H2	1,593		
Paciente 1	A3	0,597	0,624	66,8
	B3	0,651		

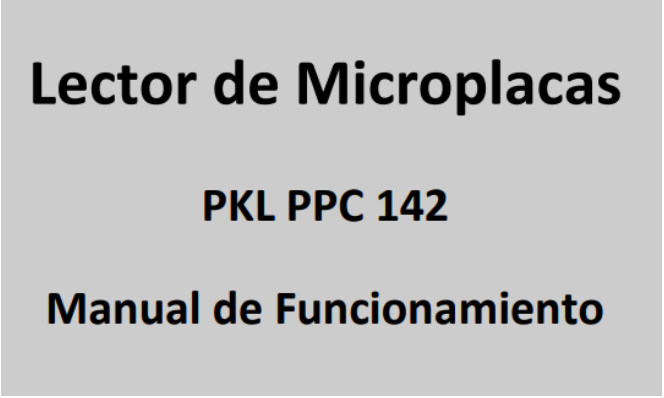
Una vez calibrada la prueba y establecido el punto de corte se procede con la interpretación:

Punto de corte: >0,400

Calibración		Muestra		Interpretación	Valor en µlU/ml
Cal A	0,010	Muestra 1	0,250	Negativo	24
Cal B	0,054	Muestra 2	0,420	Positivo	42
Cal C	0,243	Muestra 3	0,450	Positivo	47
Cal D	0,476				
Cal E	0,902				
Cal F	2,406				

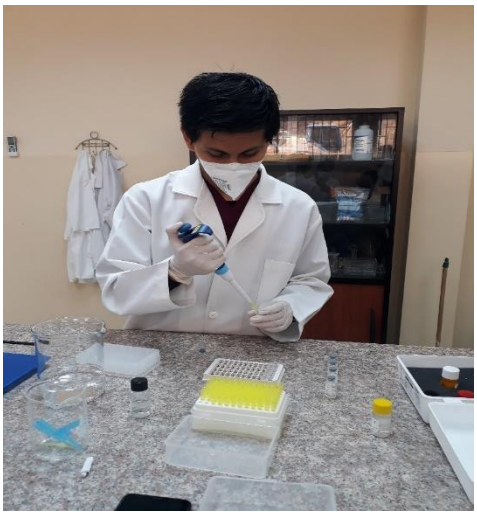
Anexos 2, 3 y 4.- Fotos de Manuales de equipos implementados





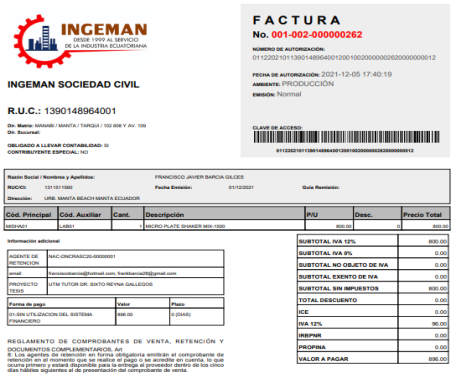
Anexos 4, 5 y 6.- Desempaque y revisión de los equipos

Anexos 6, 7, 8 y 9.- Ensayo de calibración de equipos



Anexos 10 y 11.- Entrega de los equipos

Anexos 12, 13, 14 y 15.- Factura correspondiente a cada equipo implementado.



INGEMAN
DESDE 1999 AL SERVICIO DE LA INDUSTRIA ECUATORIANA

INGEMAN SOCIEDAD CIVIL

R.U.C.: 1390148964001

Dir. Matriz: MANABI / MANTA / TARQUI / 102 608 Y AV. 109
Dir. Sucursal:

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD: SI
CONTRIBUYENTE ESPECIAL: NO

FACTURA
No. 001-002-000000262

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN:
0112202101139014896400120010020000002620000000012

FECHA DE AUTORIZACIÓN: 2021-12-05 17:40:19
AMBIENTE: PRODUCCIÓN
EMISIÓN: Normal

CLAVE DE ACCESO:
0112202101139014896400120010020000002620000000012

Razón Social / Nombres y Apellidos: FRANCISCO JAVIER BARCIA GILCES
RUC/CI: 1311511560 Fecha Emisión: 01/12/2021 Guía Remisión:
Dirección: URB. MANTA BEACH MANTA ECUADOR

Cód. Principal	Cód. Auxiliar	Cant.	Descripción	P/U	Desc.	Precio Total
MSHA01	LAB01	1	MICRO PLATE SHAKER MIX-1500	800.00	0	800.00

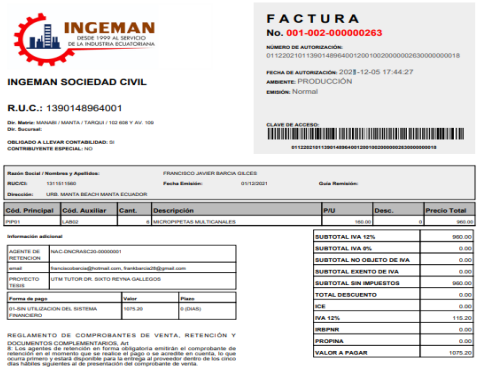
Información adicional

AGENTE DE RETENCION	NAC-DNCRASC20-00000001
email	franciscobarcia@hotmail.com, frankbarcia28@gmail.com
PROYECTO TESIS	UTM TUTOR DR. SIXTO REYNA GALLEGOS

Forma de pago	Valor	Plazo
01-SIN UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	896.00	0 (DIAS)

REGLAMENTO DE COMPROBANTES DE VENTA, RETENCIÓN Y DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS, Art
8. Los agentes de retención en forma obligatoria emitirán el comprobante de retención en el momento que se realice el pago o se acredite en cuenta, lo que ocurra primero y estará disponible para la entrega al proveedor dentro de los cinco días hábiles siguientes al de presentación del comprobante de venta.

SUBTOTAL IVA 12%	800.00
SUBTOTAL IVA 0%	0.00
SUBTOTAL NO OBJETO DE IVA	0.00
SUBTOTAL EXENTO DE IVA	0.00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	800.00
TOTAL DESCUENTO	0.00
ICE	0.00
IVA 12%	96.00
IRBPNR	0.00
PROPINA	0.00
VALOR A PAGAR	896.00



INGEMAN
DESDE 1999 AL SERVICIO DE LA INDUSTRIA ECUATORIANA

INGEMAN SOCIEDAD CIVIL

R.U.C.: 1390148964001

Dir. Matriz: MANABI / MANTA / TARQUI / 102 608 Y AV. 109
Dir. Sucursal:

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD: SI
CONTRIBUYENTE ESPECIAL: NO

FACTURA
No. 001-002-000000263

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN:
0112202101139014896400120010020000002630000000018

FECHA DE AUTORIZACIÓN: 2021-12-05 17:44:27
AMBIENTE: PRODUCCIÓN
EMISIÓN: Normal

CLAVE DE ACCESO:
0112202101139014896400120010020000002630000000018

Razón Social / Nombres y Apellidos: FRANCISCO JAVIER BARCIA GILCES
RUC/CI: 1311511560 Fecha Emisión: 01/12/2021 Guía Remisión:
Dirección: URB. MANTA BEACH MANTA ECUADOR

Cód. Principal	Cód. Auxiliar	Cant.	Descripción	P/U	Desc.	Precio Total
PIPI01	LAB02	6	MICROPIPETAS MULTICANALES	160.00	0	960.00

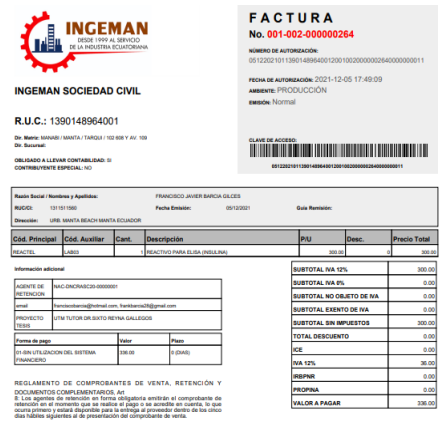
Información adicional

AGENTE DE RETENCION	NAC-DNCRASC20-00000001
email	franciscobarcia@hotmail.com, frankbarcia28@gmail.com
PROYECTO TESIS	UTM TUTOR DR. SIXTO REYNA GALLEGOS

Forma de pago	Valor	Plazo
01-SIN UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	1075.20	0 (DIAS)

REGLAMENTO DE COMPROBANTES DE VENTA, RETENCIÓN Y DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS, Art
8. Los agentes de retención en forma obligatoria emitirán el comprobante de retención en el momento que se realice el pago o se acredite en cuenta, lo que ocurra primero y estará disponible para la entrega al proveedor dentro de los cinco días hábiles siguientes al de presentación del comprobante de venta.

SUBTOTAL IVA 12%	960.00
SUBTOTAL IVA 0%	0.00
SUBTOTAL NO OBJETO DE IVA	0.00
SUBTOTAL EXENTO DE IVA	0.00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	960.00
TOTAL DESCUENTO	0.00
ICE	0.00
IVA 12%	115.20
IRBPNR	0.00
PROPINA	0.00
VALOR A PAGAR	1075.20



INGEMAN
DESDE 1999 AL SERVICIO DE LA INDUSTRIA ECUATORIANA

INGEMAN SOCIEDAD CIVIL

R.U.C.: 1390148964001

Dir. Matriz: MANABI / MANTA / TARQUI / 102 608 Y AV. 109
Dir. Sucursal:

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD: SI
CONTRIBUYENTE ESPECIAL: NO

FACTURA
No. 001-002-000000264

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN:
0512202101139014896400120010020000002640000000011

FECHA DE AUTORIZACIÓN: 2021-12-05 17:49:09
AMBIENTE: PRODUCCIÓN
EMISIÓN: Normal

CLAVE DE ACCESO:
0512202101139014896400120010020000002640000000011

Razón Social / Nombres y Apellidos: FRANCISCO JAVIER BARCIA GILCES
RUC/CI: 1311511560 Fecha Emisión: 05/12/2021 Guía Remisión:
Dirección: URB. MANTA BEACH MANTA ECUADOR

Cód. Principal	Cód. Auxiliar	Cant.	Descripción	P/U	Desc.	Precio Total
REACTIEL	LAB03	1	REACTIVO PARA ELISA (INSULINA)	300.00	0	300.00

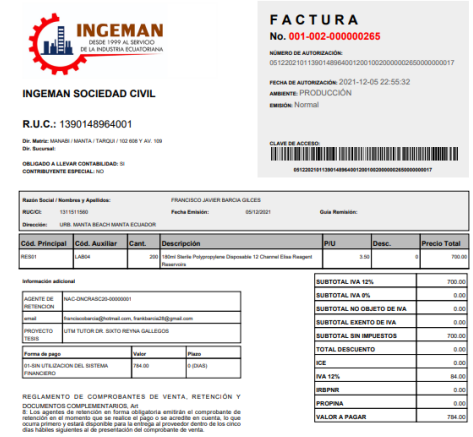
Información adicional

AGENTE DE RETENCION	NAC-DNCRASC20-00000001
email	franciscobarcia@hotmail.com, frankbarcia28@gmail.com
PROYECTO TESIS	UTM TUTOR DR.SIXTO REYNA GALLEGOS

Forma de pago	Valor	Plazo
01-SIN UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	336.00	0 (DIAS)

REGLAMENTO DE COMPROBANTES DE VENTA, RETENCIÓN Y DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS, Art
8. Los agentes de retención en forma obligatoria emitirán el comprobante de retención en el momento que se realice el pago o se acredite en cuenta, lo que ocurra primero y estará disponible para la entrega al proveedor dentro de los cinco días hábiles siguientes al de presentación del comprobante de venta.

SUBTOTAL IVA 12%	300.00
SUBTOTAL IVA 0%	0.00
SUBTOTAL NO OBJETO DE IVA	0.00
SUBTOTAL EXENTO DE IVA	0.00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	300.00
TOTAL DESCUENTO	0.00
ICE	0.00
IVA 12%	36.00
IRBPNR	0.00
PROPINA	0.00
VALOR A PAGAR	336.00



INGEMAN
DESDE 1999 AL SERVICIO DE LA INDUSTRIA ECUATORIANA

INGEMAN SOCIEDAD CIVIL

R.U.C.: 1390148964001

Dir. Matriz: MANABI / MANTA / TARQUI / 102 608 Y AV. 109
Dir. Sucursal:

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD: SI
CONTRIBUYENTE ESPECIAL: NO

FACTURA
No. 001-002-000000265

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN:
0512202101139014896400120010020000002650000000017

FECHA DE AUTORIZACIÓN: 2021-12-05 22:55:32
AMBIENTE: PRODUCCIÓN
EMISIÓN: Normal

CLAVE DE ACCESO:
0512202101139014896400120010020000002650000000017

Razón Social / Nombres y Apellidos: FRANCISCO JAVIER BARCIA GILCES
RUC/CI: 1311511560 Fecha Emisión: 05/12/2021 Guía Remisión:
Dirección: URB. MANTA BEACH MANTA ECUADOR

Cód. Principal	Cód. Auxiliar	Cant.	Descripción	P/U	Desc.	Precio Total
RES01	LAB04	200	190ml Sterile Polypropylene Disposable 12 Channel Elisa Reagent Reservoirs	3.50	0	700.00

Información adicional

AGENTE DE RETENCION	NAC-DNCRASC20-00000001
email	franciscobarcia@hotmail.com, frankbarcia28@gmail.com
PROYECTO TESIS	UTM TUTOR DR. SIXTO REYNA GALLEGOS

Forma de pago	Valor	Plazo
01-SIN UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	784.00	0 (DIAS)

REGLAMENTO DE COMPROBANTES DE VENTA, RETENCIÓN Y DOCUMENTOS COMPLEMENTARIOS, Art
8. Los agentes de retención en forma obligatoria emitirán el comprobante de retención en el momento que se realice el pago o se acredite en cuenta, lo que ocurra primero y estará disponible para la entrega al proveedor dentro de los cinco días hábiles siguientes al de presentación del comprobante de venta.

SUBTOTAL IVA 12%	700.00
SUBTOTAL IVA 0%	0.00
SUBTOTAL NO OBJETO DE IVA	0.00
SUBTOTAL EXENTO DE IVA	0.00
SUBTOTAL SIN IMPUESTOS	700.00
TOTAL DESCUENTO	0.00
ICE	0.00
IVA 12%	84.00
IRBPNR	0.00
PROPINA	0.00
VALOR A PAGAR	784.00