



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la Obtención del Título de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MODALIDAD
TRABAJO COMUNITARIO

TEMA:

**Implementación de equipos para el fortalecimiento de la Técnica de
Aglutinación Microscópica en el laboratorio de leptospira y
evaluación de las cepas existentes en cuanto a su viabilidad y
posibles contaminantes**

AUTORES:

RENGIFO MEZA MERCEDES MONSERRATE
GARCIA ZAMBRANO RAMON JAIR

TUTOR:

Dr. VÍCTOR MONTES ZAMBRANO PhD

SANTA ANA-MANABÍ- ECUADOR

2021

DEDICATORIA 1

Le dedico este trabajo a Dios por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan trascendental de mi formación profesional. A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo cuando más lo necesitaba. A mi padre, quien me motivo y no me dejó nunca solo, me ayudó y me sigue ayudando, siempre dándome palabras de aliento y brindándome todo su apoyo incondicional. A mis hermanas quienes me apoyaron en momento difíciles dándome sus buenos consejos cuando más lo necesitaba, a mi esposa que sin lugar a duda siempre ha estado pendiente de mí en cada paso que doy brindándome todo lo que esté a su alcance, a mi tutor de tesis que fue el motor principal, guía para que este proyecto se ejecutara, y a toda mi familia que sin ella no hubiera podido concluir este trabajo, gracias por toda su ayuda.

Y a todas las personas que fueron parte de mi formación tanto en la vida como en lo escolar, les dedico este trabajo que es fruto de su apoyo. Gracias a todos.

JAIR GARCIA ZAMBRANO

DEDICATORIA 2

Los sueños se hicieron para que tu como persona los termines de hacer realidad.

Primeramente, este trabajo y todo este proceso se lo dedico a mi Dios porque gracias a el, estoy terminar una etapa más en mi vida, segundo a mi padre Carlos Rengifo que siempre me estuvo apoyando en este paso tan grande, él ha sido mi ejemplo, que en la vida siempre ha tenido que mostrar una sonrisa antes las adversidades que llevas en tu vida. Eso me hacía más fuerte en este camino duro, pero no inalcanzables.

A mis hermanas Milenka y Kiara, que de una u otra manera siempre estuvieron presente en la vida de mi hijo, mientras yo me iba por las mañanas a estudiar y sin el apoyo de ellas tampoco hubiese obtenido este título.

A mi tía Rina Suarez por esos consejos que me da cada que conversamos, uno de esos es que me dice: hija la universidad es de constancia y no de rapidez ya falta poco no te desanimas.

A mi tutor de tesis que cuando lo busqué para que fuera mi director de titulación no dudó en aceptarme, el siempre con sus consejos y halada de orejas, tengo la satisfacción que en mi obtención del título, aprendí y mucho.

Mi hijo Francis Leonel, a él por saberme entender y comprender con tan corta edad; él sabía que su mamá se iba Lodana a estudiar, para ser la veterinaria que el ama, sé que él se siente orgulloso de lo que su mamita está logrando

A Jander Pinargote por darme el aliento y la fuerza de seguir avanzando en terminar este camino.

MERCEDES RENGIFO MEZA

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por habernos dado sabiduría, fortaleza, salud, coraje, y no dejarnos solo en los momentos difíciles y permitir concluir esta etapa en nuestra vida.

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a nuestros padres que dieron de ellos su esfuerzo para darnos los estudios y hoy en día ser unos profesionales y darnos comprensión incondicional y paciencia que nos demostraron todos estos años.

Agradecemos sinceramente y de todo corazón a nuestro director de tesis por permitirnos ser parte de sus tesis y darnos la oportunidad de titularnos con uno de sus proyectos, y por el gran apoyo y paciencia que nos la brindó durante la realización de la tesis.

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

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para poder ejecutar esta tesis, a nuestros docentes que nos brindaron su apoyo incondicional, a aquellos amigos que de una u otra manera estuvieron aportando en nuestra formación como profesionales, gracias a todos.

JAIR GARCIA & MERCEDES RENGIFO

CERTIFICACIÓN

Dr. Víctor Montes Zambrano, Certifica que el trabajo de titulación en la Modalidad Trabajo Comunitario titulada: “Implementación de equipos para el fortalecimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica en el laboratorio de leptospira y evaluación de las cepas existentes en cuanto a su viabilidad y posibles contaminantes”, es trabajo original de los Señores: Rengifo Meza Mercedes Monserrate y García Zambrano Ramón Jair, el que ha sido realizado bajo mi supervisión.

Dr. 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 el fortalecimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica en el laboratorio de leptospira y evaluación de las cepas existentes en cuanto a su viabilidad y posibles contaminantes”

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA

Dr. Edis Macías Rodríguez PhD
DECANO-PRESIDENTE

Dr. Víctor Montes Zambrano PhD
TUTOR DE TITULACIÓN

Dra. Laura De La Cruz Veliz PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Marina Zambrano Aguayo PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Maritza Barrera Valle PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN SOBRE LOS DERECHOS DEL AUTOR

Jair García Zambrano y Mercedes Rengifo Meza, declaramos que la investigación titulada "Implementación de equipos para el fortalecimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica en el laboratorio de leptospira y evaluación de las cepas existentes en cuanto a su viabilidad y posibles contaminantes" 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.

Jair García Zambrano

Mercedes Rengifo Meza

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
1.- LOCALIZACIÓN FÍSICA DEL PROYECTO.....	3
1.1. Macro localización	3
1.2. Micro localización.....	3
1.3. Límites.....	3
2.- FUNDAMENTACIÓN.....	4
3.-JUSTIFICACIÓN	6
4.1.- Objetivo General.....	7
4.2.- Objetivo Específico.....	7
5.1 Importancia de Bioseguridad Nivel II.....	8
5.2 Principios de bioseguridad	8
5.3 Niveles de Bioseguridad.....	9
5.4 Equipos de seguridad biológica.....	9
5.5 Niveles de bioseguridad	9
5.7 Leptospira riesgo a nivel de laboratorio	10
5.8 Identificación mediante la técnica de Campo Oscuro	11
5.9 Estudios Reportados de la enfermedad por MAT	11
5.10 Mechero de Alcohol	12
5.11 Cámara de bioseguridad	12
5.12 Cámara o cabina de Bioseguridad (CSB) tipo II.....	13
5.13 Microscopio de campo oscuro.....	14
5.14 Microscopio Biológico Binocular Olympus Modelo CX33.....	15
5.15 Cepas de Leptospira.	16
5.16 Aislamiento y Medios de Cultivos	17
5.18 Bacterias resistentes al 5-flourouracilo	18
5.19 La Tinción De Gram.....	19
6.- BENEFICIARIOS.....	21
6.1 Beneficiarios Directos	21
6.2 Beneficiarios Indirectos.....	21
7.2. ÁRBOL DEL PROBLEMA	25

7.3 ARBOL DE OBJETIVOS	26
7.4 MARCO LOGICO	27
8.-RECURSOS UTILIZADOS.....	28
9.-PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA.....	29
10.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
10.1 CONCLUSIONES.....	31
10.2 RECOMENDACIONES.....	31
11.-SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD.....	33
11.1 Sustentabilidad.....	33
11.2 Sostenibilidad.....	33
12. PRESUPUESTO	34
13. CRONOGRAMA	35
14.-Bibliografía.....	36
15.ANEXOS.....	39
.....	39

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 laboratorio de ciencias agropecuarias de la Universidad Técnica de Manabí en el cantón Santa Ana, parroquia Lodana, este proyecto tuvo como finalidad proveer de equipos de laboratorio para obtener mejores resultados en los análisis de cultivos y procesamiento de muestras para la investigación de leptospira. En base a las necesidades existentes en el área de leptospira se llevó a cabo la ejecución del proyecto “Implementación de equipos para el fortalecimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica en el laboratorio de leptospira y evaluación de las cepas existentes en cuanto a su viabilidad y posibles contaminantes”. En el cual se utilizaron criterios de los entendidos en el tema debido a las necesidades que fueron identificadas a lo largo de estudios previos de investigación en el área con estudiantes de pregrado. La implementación del laboratorio se realizó con el fin de satisfacer las principales necesidades del laboratorio de leptospira y que sirven a nivel general de los estudiantes de pre y posgrado para realizar sus investigaciones y poder titularse como médico Veterinario y Magister. Se realizó la compra de equipos y aparatos como el Gabinete de seguridad biológica tipo II y Microscopio Biológico Binocular (Olympus CX33) donde permitió identificar este tipo de patógenos que está siendo reportado en humanos por el contacto con animales infectados, por lo que se hace necesario su identificación y diagnóstico serológico en animales domésticos y silvestres, Esta área al estar dotada de estos equipos permitió ser independiente para la preparación de medios de cultivos gracias a contar con una cámara de bioseguridad propia del área y poder detectar anticuerpos contra leptospira mediante la técnica de aglutinación microscópica (MAT) con la dotación de un microscopio biológico, lo que fortalece en gran medida esta importante área de investigación.

SUMMARY

The present degree work in the Community Development modality consisted of the implementation of equipment for the leptospira laboratory that is located in the agricultural sciences laboratory of the Technical University of Manabí in the Santa Ana canton, Lodana parish, this project had as purpose to provide laboratory equipment to obtain better results in the analysis of cultures and processing of samples for the investigation of leptospira. Based on the existing needs in the leptospira area, the project “Implementation of equipment to strengthen the Microscopic Agglutination Technique in the leptospira laboratory and evaluation of existing strains regarding their viability and possible contaminants”. In which criteria of those understood in the subject were used due to the needs that were identified throughout previous research studies in the area with undergraduate students. The implementation of the laboratory was carried out in order to satisfy the main needs of the leptospira laboratory and that serve at the general level of undergraduate and graduate students to carry out their research and be able to qualify as a Veterinarian and Magister. The purchase of equipment and devices such as the Type II Biological Safety Cabinet and Binocular Biological Microscope (Olympus CX33) was made where it allowed identifying this type of pathogens that is being reported in humans by contact with infected animals, so it is necessary its identification and serological diagnosis in domestic and wild animals. This area, being equipped with these equipment, allowed it to be independent for the preparation of culture media thanks to having a biosafety chamber typical of the area and being able to detect antibodies against leptospira through the technique of Microscopic Agglutination (MAT) with the provision of a biological microscope, which greatly strengthens this important area of research.

1.- LOCALIZACIÓN FÍSICA DEL PROYECTO.

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 Agropecuarias de la Universidad Técnica de Manabí, en el área de Leptospira

1.2. Micro localización

El laboratorio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Manabí se encuentra ubicado en la parroquia Lodana vía principal del Cantón Santa Ana, ubicado geográficamente a $1^{\circ}09'54.98''S$ y $80^{\circ}23'29,73''O$ y una elevación de 71 msnm.

1.3. Límites

El cantón Santa Ana limita:

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

2.- FUNDAMENTACIÓN

La Implementación con equipamiento al área de Leptospira del laboratorio de Ciencias Agropecuarias permitirá desarrollar de mejor forma la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT), la cual beneficiará y permitirá incrementar el conocimiento de la situación actual de esta bacteria como responsable de enfermedad. El desarrollo de estudios epidemiológicos en animales permitirá inferir la situación presente de casos clínicos en humanos, debido al contacto existente de este último con animales domésticos, así como también con la fauna silvestre circulante. La implementación de estos estudios permitirá el entendimiento de las relaciones entre los serogrupo de leptospira existentes entre las especies de animales y el ser humano.

La provincia de Manabí, carece de laboratorios que permitan desarrollar MAT, lo cual imposibilita el diagnóstico de esta bacteria en animales, así como en humanos. La Facultad de Ciencias Veterinarias es una unidad académica de prestigio en el campo de la investigación veterinaria, vinculada al desarrollo de estudios epidemiológicos y patológico que se reportan tanto en animales domésticos como silvestres; pero no cuenta con equipos necesarios para un correcto procesamiento de las muestras permitiendo así llevar a cabo una investigación profunda sobre los diferentes tipos de enfermedades que se presentan en los animales de la provincia de Manabí.

El área de leptospira podría verse fortalecida con la implementación de equipos que facilitarían la manipulación y detección de la bacteria en muestras clínicas, provenientes de animales sospechosos de la enfermedad. Dentro de estos equipos necesarios estarían una Cabina de Bioseguridad tipo II que evita contaminación cruzada entre muestras procesadas y asegura el control biológico en la preparación de medios de cultivos y mantenerlos estéril hasta su fraccionamiento, así como de un Microscopio Olympus modelo CX33 útil para la evaluación y detección directa de la bacteria en la muestra así como la presencia de aglutinación producto de la reacción antígeno-anticuerpo. Es por esto que se propone implementar estos equipos a esta área, permitiendo de esta manera poder fortalecer el área que permitirán realizar investigaciones de leptospirosis en animales domésticos y

silvestres por su importancia zoonótica y de ocurrencia en humanos de la provincia de Manabí.

3.-JUSTIFICACIÓN

La necesidad de contar con equipos que fortalezcan el área de Leptospira dentro de los laboratorios agropecuarios de la UTM, es de suma importancia para continuar con el levantamiento de información epidemiológica sobre esta bacteria, que ocasiona problemas de salud pública, así como pérdidas en la producción en animales domésticos, afectando la economía de agricultores y demás integrantes del sector agropecuario. El identificar anticuerpos presentes de serovares de Leptospira es un indicativo de exposición de los animales a la bacteria, permitiendo identificar los riesgos y futuras complicaciones observadas en humanos que se infectan, al entrar en contacto con animales infectados, generando una información valedera para poder establecer futuras medidas de prevención y control hacia la población animal y humana expuesta a esta patología.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General.

Fortalecer el área de Leptospira en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí

4.2.- Objetivo Específico.

- Proveer de una Cámara de bioseguridad tipo II y un Microscopio Olympus CX33 al área de leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias
- Evaluar las cepas de leptospira que se utilizan en la técnica MAT en cuanto a su viabilidad y presencia de contaminantes presente en los medios de cultivos.

5.- MARCO DE REFERENCIA

5.1 Importancia de Bioseguridad Nivel II

Según la OMS (2005) señala que la bioseguridad es un conjunto de normas y medidas para proteger la salud del personal, frente a riesgos biológicos, químicos y físicos a los que está expuesto en el desempeño de sus funciones, también a los pacientes y al medio ambiente. Santos (2012) señala que debe existir un programa diseñado en forma particular, el cual debe contemplar políticas de bioseguridad tales como, responsable de Bioseguridad y un comité de Bioseguridad. El Comité de Bioseguridad tiene las funciones de desarrollar políticas y reglas de buenas prácticas, notificar al responsable de la institución cualquier novedad y debe estar constituido por profesionales del laboratorio, representantes del equipo técnico, del personal de lavado de material y esterilización, del personal de limpieza y personal administrativo.

5.2 Principios de bioseguridad

COMBOL (2013) señala que la bioseguridad está compuesta por tres aspectos importantes: Universalidad, Uso de barreras y Eliminación de material contaminado. Universalidad. Tiene que ver con las medidas que involucran a todos los pacientes trabajadores y de servicio, independiente de conocer o no su serología. Todo el personal debe seguir las precauciones estándares rutinariamente para prevenir la exposición de la piel y mucosas.

Uso de barrera. Evitar la exposición directa a todo tipo de muestras orgánicas, realizar lavado de manos, uso de guantes, lentes mascarillas, gorro, túnicas, cámaras de seguridad biológicas y proveer inmunizaciones.

Eliminación de material contaminado. Es un conjunto de procedimientos a través de los cuales se procesan los materiales utilizados en la atención de los pacientes, toma de muestras, realización de los exámenes y la eliminación de las muestras biológicas sin riesgo para los operadores y la comunidad.

5.3 Niveles de Bioseguridad

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EEUU, (CDC) detalla 4 niveles de bioseguridad para el manejo de agentes biológicos, Por lo tanto, los laboratorios que desarrollan las tareas con muestras infecciosas pueden ser clasificados en 4 tipos de acuerdo a los niveles de bioseguridad, en cada uno de ellos las buenas prácticas se desarrollan según los documentos y protocolos establecidos (Lara, & cols 2008).

5.4 Equipos de seguridad biológica

Son cámaras de circulación forzada que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección estos son fundamentales en un laboratorio de Microbiología Clínica y se clasifican según el nivel y tipo de protección.

5.5 Niveles de bioseguridad

- Nivel I: agentes que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en los seres humanos o animales.
- Nivel II: agentes patógenos que pueden producir enfermedades humanas o animales, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado en el laboratorio y la comunidad.
- Nivel III: agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o el animal, existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
- Nivel IV: agentes patógenas que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o el animal y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro. Normalmente, no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces (VISAVET, 2008).

El nivel de bioseguridad que vamos a utilizar en este proyecto es el nivel tipo II. Las prácticas, los equipos, el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2 son aplicables a laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos u otros laboratorios donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad y que están asociados con enfermedad humana de variada gravedad (Santos, 2012).

Con buenas técnicas microbiológicas, estos agentes se pueden utilizar en forma segura en actividades realizadas en una mesa de trabajo, siempre que no se produzcan salpicaduras o aerosoles en cuyo caso se utilizará Cabinas de bioseguridad biológica. Se deben utilizar las demás barreras primarias que correspondan, tales como máscaras contra salpicaduras, protección facial, batas y guantes y contar con barreras secundarias, tales como piletas para lavado de manos e instalaciones de descontaminación de desechos a fin de reducir la contaminación potencial del medio ambiente (Lara, & Cols 2008).

5.7 Leptospira riesgo a nivel de laboratorio

La *Leptospira* es una espiroqueta Gram negativa perteneciente a la familia Leptospiraceae, tiene forma helicoidal alargada, con los extremos abiertos en forma de gancho, y su tamaño es aproximadamente de 6-20 x 0,1 micras (μm). Es aerobia estricta, de crecimiento lento, y presenta movilidad gracias a la presencia de flagelos periplásmicos (INSST, 2013). Tiene como reservorio a mamíferos (roedores, bovinos, equinos, cérvidos, porcinos, caninos) y anfibios. La leptospira es capaz de sobrevivir en el medio exterior durante días o meses, según condiciones ambientales favorables como temperatura de 20°C-30°C, humedad elevada, pH neutro o ligeramente alcalino (Ministerio de Salud, 1998).

La transmisión de leptospira se produce mediante el contacto de las mucosas y la piel lesionada con tierra, agua, vegetación o alimentos contaminados con orina de animales infectados. También es posible que tenga lugar a través de la piel reblandecida por el agua. Otros mecanismos de transmisión, menos frecuentes es la transmisión de persona a persona que es rara. Vías de entrada parenteral, dérmica, mucosas, digestiva, respiratoria son reportadas. La distribución geográfica es mundial, excepto las regiones polares (INSST, 2013).

A nivel de laboratorio la manipulación de leptospira requiere de equipos y materiales de protección por el riesgo de infección existente por ser una zoonosis. Dentro de las medidas utilizadas están: guantes impermeables, mascarillas o máscaras con filtro P2 o P3 (dispositivos filtrantes de partículas) para operaciones en las que se generen aerosoles. Calzado impermeable antideslizante (botas), protección

ocular: gafas de protección o pantalla facial en caso de manipulación de tejidos animales y posibles salpicaduras (Ministerio de Salud , 1998).

Botella, (2009) da a conocer los principales riesgos a nivel de laboratorio como son riesgo por ingesta de material contaminante, inoculación parenteral accidental, el contacto de la piel o las mucosas con cultivos, tejidos infectados o fluidos corporales (principalmente orina) y la inhalación de bioaerosoles procedentes de fluidos contaminados. Estos tipos de contaminantes generan la necesidad de la utilización de cabinas de bioseguridad tipo II que eviten la exposición a estos fluidos como son: la sangre (primera semana), líquido cefalorraquídeo (4° - 10° días) durante la infección aguda, o la orina tras el 10° día y en actividades que generen bioaerosoles y salpicaduras.

5.8 Identificación mediante la técnica de Campo Oscuro

Pérez, (2015) Por otra parte, los microorganismos pertenecientes al género *Leptospira* se encuentran en el límite del poder de resolución del microscopio óptico como consecuencia de su escaso grosor, por lo que se recomienda el uso de microscopía de campo oscuro a través de la cual las espiroquetas se observan como hebras de plata sobre el fondo oscuro. Orellana en 2013 dice que la utilización del campo oscuro, es útil para quienes tienen considerable experiencia, para observar estos microorganismos en muestras clínicas o en cultivos, sin embargo, este tipo de diagnóstico es común encontrar animales falsos positivos y falsos negativos.

5.9 Estudios Reportados de la enfermedad por MAT

La prueba de detección de anticuerpos más usada es la Técnica de Aglutinación Microscópica o MAT, que consiste en mezclar el suero del paciente con leptospira una mezcla de diferentes serotipos de leptospira y posteriormente se examina en el microscopio la aglutinación (debida a la aglutinación de los antígenos de la superficie de las leptospira con los anticuerpos del paciente). Estos anticuerpos, llamados aglutinantes, se detectan en la sangre del paciente a partir de los días 5-7 de la enfermedad y se siguen detectando muchos años después (Astudillo, 2009).

OIE, (2014) da a conocer que el MAT es el método de referencia para el diagnóstico serológico de la leptospirosis por parte de la Organización mundial de salud animal (OIE) debido a su alta sensibilidad y especificidad, además puede identificar el serovar o serogrupo de *Leptospira* comprometida en la infección. Según Céspedes (2005) dice que el MAT detecta los anticuerpos aglutinantes en suero, para ello se incuban los sueros de los pacientes con el antígeno de los serovares de *Leptospira*, luego las mezclas del suero-antígeno se examinan en microscopio de campo oscuro para observar la aglutinación y luego se determina el título de la muestra. El MAT es una prueba compleja y de difícil realización e interpretación, por lo que requiere de personal con experiencia, cultivos vivos de todos los serovares requeridos para su uso como antígeno, los cuales deben ser mantenidos semanalmente, además es peligrosa para el personal de laboratorio por la continua manipulación de bacterias vivas.

5.10 Mechero de Alcohol

Galán, (2019) indica que el encendedor de alcohol es un producto de laboratorio que goza de una gran aceptación debido a su facilidad de uso, múltiples usos y muchas otras características. Todo ello demuestra que el mechero se ha convertido en una excelente herramienta que son capaces de esterilizar un lugar de trabajos para evitar cualquier contaminación, pensamos que es un instrumento indispensable en cualquier laboratorio, porque el calentamiento de muchas reacciones depende de la baja intensidad y combustión continua que pueda producir el instrumento. Por otro lado, estos encendedores de alcohol hace años atrás hacia las veces de una cámara de bioseguridad y de esta manera se desarrollaron muchos estudios.

5.11 Cámara de bioseguridad

Lozano, (2008) da a conocer que la cámara de bioseguridad tiene como objetivo proteger a los trabajadores, el entorno del laboratorio y los materiales de trabajo de la exposición a salpicaduras y aerosoles infecciosos, que pueden procesarse mediante la manipulación de sustancias infecciosas. Los aerosoles se producen por cualquier medio de transmisión (como los cultivos). Los trabajos como

siembra y otras actividades placa de agar, uso de pipeta para inocular matraces de cultivo celular, el uso de múltiples pipetas para dispensar la suspensión líquida del agente infeccioso en la placa de microcultivo, homogeneización y agitación de materiales infecciosos y centrifugación de líquidos. Las enfermedades infecciosas o el trato con animales pueden producir aerosoles infecciosos. Partícula de aerosoles de menos de 5 mm de diámetro y pequeñas gotas de 5 a 100 mm de diámetro son invisibles a simple vista.

5.12 Cámara o cabina de Bioseguridad (CSB) tipo II

Esta cámara de bioseguridad debido al uso de cultivos de células y tejidos para la propagación de virus y otros fines hacen que el paso de aire sin esterilizar en la sala ya no sea satisfactorio sobre la superficie de trabajo. Además de brindar protección personal, dentro de las características de la cámara de seguridad bioseguridad Clase II tipo A2 están:

- Proporciona protección a los operadores, los productos y el medio ambiente.
- La velocidad del viento al entrar en cabina es de 50,8 cm /s.
- Aplicable a agentes con nivel de bioseguridad 1, 2 o 3.
- Sistema de filtración: dos filtros HEPA.
- Todas las tuberías de contaminación biológica de presión negativa.
- Se le conoce como cabina combinada. Puede conectarse mediante un ducto y se le denomina como B3. Si carece del mismo es un tipo A: Recicla el 70% del volumen dentro de la cabina.

La diferencia con la CSB Tipo I es que solo permite que el aire que haya pasado por el filtro entre en contacto con la superficie de trabajo esto les permite retener eficazmente todos los agentes infecciosos conocidos y garantizar que de la cámara sólo sale aire exento de microorganismos En cambio, con la CSB tipo II se puede utilizar con enfermedades infecciosas en los grupos de riesgo 2 y 3, y grupo de riesgo 4, pero solo si se usen trajes presurizados (Lozano, 2008).

En las cabinas de Clase II y tipo A, el aire entra por la parte frontal, constituye una barrera para evitar que se escapen partículas del estudio, y el 70% del

aire se recircula en forma de filtrado para proteger la muestra y mantenerla libre de contaminación y / o cruce, y el 30% restante se descarga por la parte superior después de la filtración HEPA retienen el 99,97% de las partículas de 0,3mm de diámetro y el 99,99% de las partículas de tamaño mayor o menor; esto les permite retener eficazmente todos los agentes infecciosos conocidos y, por lo que también se garantiza la protección ambiental para mantener la entrada de aire frontal (Laboratorio, 2015).

En la sala de máquinas de la CBS Clase II Tipo B, el funcionamiento es básicamente el mismo, pero hay una salvedad: el porcentaje se invierte, es decir, el 70% del aire de escape, y el 30% restante se recircula. En la práctica, estas cámaras de aspersión no se utilizan, porque, aunque la excelente barrera frontal formada por el escape del 70% del aire puede garantizar definitivamente la protección del operador, no es propicia para la protección del flujo laminar FL, porque solo la protección tiene El 30% restante es aire (Laboratorio, 2015).

5.13 Microscopio de campo oscuro.

EL microscopio de campo oscuro es una técnica de contraste donde solo la luz difractada desde el espécimen se usa para formar la imagen. El espécimen aparece brillante contra un fondo oscuro. El microscopio de campo oscuro crea contraste en especímenes transparentes sin tinción como células vivas. Este depende de controlar la iluminación del espécimen para que la luz central que normalmente pasa a través y alrededor del espécimen se bloquee. En lugar de iluminar la muestra con un cono de luz completo (como en microscopia de campo claro) el condensador forma un cono hueco con luz que pasa alrededor del cono en lugar de pasar a través de este (Martínez, 2013).

Esta forma de iluminación permite que solamente los rayos de luz oblicuos peguen en el espécimen la platina del microscopio y se forme la imagen con rayos de luz dispersados por las muestras y capturados por el objetivo. Cuando no hay muestra en la platina del microscopio la observación es completamente oscura (Gil, 2016).

5.14 Microscopio Biológico Binocular Olympus Modelo CX33.

El microscopio biológico binocular CX33, de especificaciones fijas, es ideal para aplicaciones de enseñanza y rutina. Los controles principales están ubicados a poca distancia entre sí, lo que permite operar con mínimos movimientos. La facilidad de uso es asimismo mejorada por el condensador Abbe integrado, que aumenta la visibilidad y el contraste de la muestra bajo diferentes aumentos sin ajustes que hacen perder tiempo. Los objetivos UIS2 de Olympus garantizan imágenes claras, brillantes y de excelente plenitud, y las cámaras digitales Olympus se pueden adaptar fácilmente para crear imágenes digitales y generar documentación de manera eficiente (Olympus 2020). Dentro de las características de este equipo están:

- Alta resolución y amplio campo de visión
- Sobresalientes planos de imágenes de objetivos Plano C. Ideal para objetivos 10x y 40x usados frecuentemente en trabajos de reconocimiento.
- Sistema de iluminación con lámpara de luz halógena de alta intensidad 6V, 30W que permite captar imágenes brillantes y luminosas.
- Diseño duradero y rígido para hacer posible un alto desempeño y una larga vida del equipo.
- Imagen digital.
- Tratamiento anti-hongo. El tratamiento aplicado a todos los componentes del Microscopio, protege la calidad de las partes ópticas aún en las regiones de mayor humedad (Olympus 2020).

5.15 Cepas de Leptospira.

Muchas cepas de *Leptospira* pueden infectar una variedad de huéspedes animales (roedores, ganado y otros animales domésticos) y los humanos son huéspedes accidentales. Los animales domésticos y los animales salvajes de los portadores pueden liberar leptospira de forma intermitente durante muchos años o incluso durante toda su vida (OPS, 2019). La (OIE, 2018) dice que identificación de las cepas de *Leptospira* es tarea del laboratorio de referencia especializado. Para una identificación completa, se debe utilizar los siguientes procedimientos para determinar que cepas en si están presente.

- 1) Si la cepa es un patógeno y saprofitas.
- 2) El tipo leptospira a la que pertenece la cepa
- 3) El serogrupo y serotipo de la cepa.

La leptospira son microorganismos helicoidales que están constituido por un cuerpo citoplasmático y un axostilo que se presenta en forma de espiral tiene una membrana envolvente que recubre ambas estructuras. Ellas van tener un crecimiento lento en medio de cultivo semisólido . Además, tienen más de 250 serovares la cual se dividen en 25 serogrupos. Por tanto, la prueba de microaglutinación (MAT) es una herramienta de diagnóstico de referencia internacional con la mejor capacidad para distinguir y cuantificar anticuerpos frente a un determinado serogrupo (patógenos). MAT utiliza leptospira viva como antígeno, correspondiente a un serovar de referencia, o mejor un serovar local o más frecuente. Sin embargo, MAT aún necesita determinar los títulos de anticuerpos, los signos clínicos y el análisis bioquímico de los pacientes para definir una posible exposición, una infección o enfermedad reciente (OIE, 2018).

Es difícil cubrir una amplia gama de serotipos y la posibilidad de aglutinación cruzada porque se requieren cepas para preparar antígenos vivos (con los correspondientes riesgos para el personal de laboratorio). En serología la detención (aguda y convaleciente), un aumento en el título de anticuerpos igual o superior a cuatro veces se considera un indicador de infección aguda. Pueden producirse reacciones cruzadas entre serotipos, lo que dificulta la identificación precisa de

leptospira patógena. Por otro lado, si el serotipo no está presente en la estantería de antígenos utilizada, suele haber seronegatividad persistente (Pizarro, 2007).

5.16 Aislamiento y Medios de Cultivos

El diagnóstico de leptospira se realiza mediante aislamiento. Se utilizan métodos microbiológicos con medios de cultivos tales como Korthof, Fletcher y Ellingausem McCullough Johnson Harris (EMJH) para la investigación bacteriológica y finalmente la identificación utilizando métodos serológicos o moleculares; es una prueba práctica de verificación para vigilancia epidemiológica. La leptospira es fácil de cultivar, necesitan ácidos grasos como energía difusa en un ambiente aeróbico de 28 a 30 °C. Los requisitos para el crecimiento de leptospira son especiales, el único compuesto orgánico llamado nutriente son esenciales como las vitaminas B1 y B12 y los ácidos grasos de cadena larga (> C15) constituyen tanto una fuente de energía como el carbono; es la fuente de lípidos celulares porque leptospira no puede sintetizar ácidos grasos desde el principio debido a su toxicidad inherente, deben ofrecerse a las leptospira como un compuesto con albúmina (Godínez, 2013).

El cultivo debe realizarse en medio líquido o semisólido (agar 0,1-0,2%) que contenga albúmina de suero Bovino (BSA). La contaminación se puede controlar agregando varios antibióticos selectivos como 5-fluoro-uracilo. Sin embargo, el uso de agentes selectivos puede reducir cuando solo hay pocas leptospira vivas, existe la posibilidad de aislamiento; y ciertas cepas de leptospira no crecerán en los medios selectivos que contengan múltiples antibióticos. Al agregar suero de conejo al (0,4-5%) los cultivos semisólidos aumenta las posibilidades de aislar serotipos de leptospira exigentes (OIE, 2018).

5.17 Medio de cultivo EMJH.

Los medios de cultivos pueden presentarse de 3 formas; líquido, semisólidos y sólidos. Los medios sólidos son en general de uso menos frecuente que los otros dos. La mayoría de medios líquidos (Korrthoff, Stuart, y EMJH) son habitualmente utilizados para el aislamiento de cepas de referencia. Tanto unos como otros, son

utilizados para el aislamiento de muestras sospechosas. Basándose en sus componentes, los medios se pueden clasificar entre grandes grupos con suero de conejo, tween y seroalbúmina bovina EMJH y sin proteínas (Shemberg) (Jimenez, 2006).

El EMJH en medio de cultivo líquido, es utilizado para la conservación y mantenimiento de cepas usadas en pruebas serológicas. La proliferación de leptospira patógenas en un medio nutritivo artificial, como el medio EMJH, se hace notable a los 4-7 días; por tal motivo el crecimiento de las cepas saprofiticas ocurre a los 2 o 3 días (Jimenez, 2006).

El medio sintético EMJH, con albúmina sérica bovina y polisorbato 80 (Tween 80) es considerado un medio superior a otros medios de cultivo tradicionales que contienen suero de conejo como constituyente esencial. Los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a concentraciones relativamente bajas. La albúmina permite el crecimiento de las células en mayores niveles de Tween 80 dado su carácter destoxicante y estabilizador, al ser capaz de unir a su estructura los ácidos grasos libres en el medio de cultivo y de esta forma neutralizar su actividad citolítica. Este medio proteico es actualmente el más utilizado para el aislamiento y cultivo de cepas de Leptospira, en ocasiones en grandes volúmenes durante la obtención de inóculos para la producción de antígenos vacunales en medio libre de proteínas (Finlay, 2002).

5.18 Bacterias resistentes al 5-flourouracilo.

Las bacterias entéricas o enterobacterias son microorganismos que tienen una mayor resistencia a este fármaco, dada su composición antibiótica, estas bacterias que habitan, generalmente, en el intestino de los animales y las personas, pudiendo causar enfermedades en algunos casos. Las enterobacterias resistentes al 5-flourouracilo que expresan citosina desaminasa, se presenta en invención a un método para expresar enterobacterias resistentes que utiliza como agente terapéutico para tumores sólidos, puede crecer en tejidos tumorales anaeróbicos, está presente en

una concentración que es al menos eficaz para la actividad antitumoral (Hamaji, 2013).

Escherichia coli y *salmonella*, muchos estudios han informado que la introducción de genes CD en células de mamíferos puede conducir a una disminución en la sensibilidad selectiva de las células *in vitro* al 5-FC. El gen de la citosina desaminasa de *Escherichia coli*. Esta enzima es responsable de convertir la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, que es un metabolito citotóxico utilizado en el tratamiento del cáncer gástrico (Chávez & cols 2015).

5.19 La Tinción De Gram

La tinción de Gram fue creada en 1884 por Christian Gram y es un elemento fundamental en la identificación microbiológica. Aunque Gram observo lo que ahora se denomina la “reacción de Gram” no reconoció el valor taxonómico de su técnica. La tinción Gram permite diferencial las bacterias en dos grupos según el color de la célula después de la tinción. Es un sistema de dos tinciones simples sucesivas separadas por una fase de decoloración. Permite diferenciar las bacterias que retiene el primer color, que aparecen azules (Gram positiva) de las que no retienen se tiñen de rosa (Gram negativa).

La diferencia se debe a la pared celular, la clave es peptidoglicano, ya que es el material que contiene su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas. Esta pared celular debe estar intacta para que una correcta tinción. Durante la tinción, la pared celular de las células Gram positiva se deshidrata por el alcohol del colorante y pierden permeabilidad, por lo que retiene complejo formado por el colorante primario (violeta cristal) y el yodo (mordiente). Por lo contrario, las células Gram negativas que tienen una pared con mayor contenido lipídico se vuelven más permeable en la decoloración con alcohol y pierden el colorante primario, quedando teñidas posteriormente con el colorante de contraste

Procedimiento de la tinción

1. Cubrir la extensión fijada con el colorante primario, violeta cristal o violeta genciana fenicada. Dejar actuar durante 1 minuto.
2. Lavar con agua corriente. Eliminar el exceso de agua
3. Cubrir la extensión con el mordiente, el lodo PVP. Dejar actuar 1 minuto
4. Lavar con agua corriente. Eliminar el exceso agua
5. Decolorar la extensión con Decolorante Gram hasta que ya no se produzca Eliminación de colorante de la preparación. Aproximada 15-30 segundo dependiendo del grosor de la extensión.
6. Lavar con agua. Eliminar el exceso de agua.
7. Teñir la extensión con el colorante de contraste Safranina o Fucsina Gram, durante 1 minuto
8. Lavar con agua corriente y secar al aire
9. Examinar al microscopio con objetivo de inmersión

6.- BENEFICIARIOS

6.1 Beneficiarios Directos.

Docentes e investigadores de la Facultad.

Estudiantes de titulación de la Facultad.

Autoridades.

Animales: domésticos y silvestres.

6.2 Beneficiarios Indirectos.

Comunidad en General.

7.-METODOLOGÍA

La metodología utilizada fue modalidad básica de intervención social, no experimental, diagnóstica- operativa

Comprende:

Método: Investigativo
 Participativo
 Marco Lógico

Técnicas: Observación
 Entrevistas
 Sondeos de opinión

Instrumentos: Árbol de Problemas
 Árbol de Objetivos
 Matriz de Marco Lógico
 Cuadro de Involucrados

Se contó con el apoyo de Autoridades, Docentes, Empleados y Estudiantes de la Facultad, para llevar a cabo la realización de este trabajo, tanto en su inicio como en su ejecución.

Un ensayo adicional fue ejecutado para evaluar los contaminantes existentes en seis cepas disponibles en los laboratorios. Utilizando el siguiente protocolo:

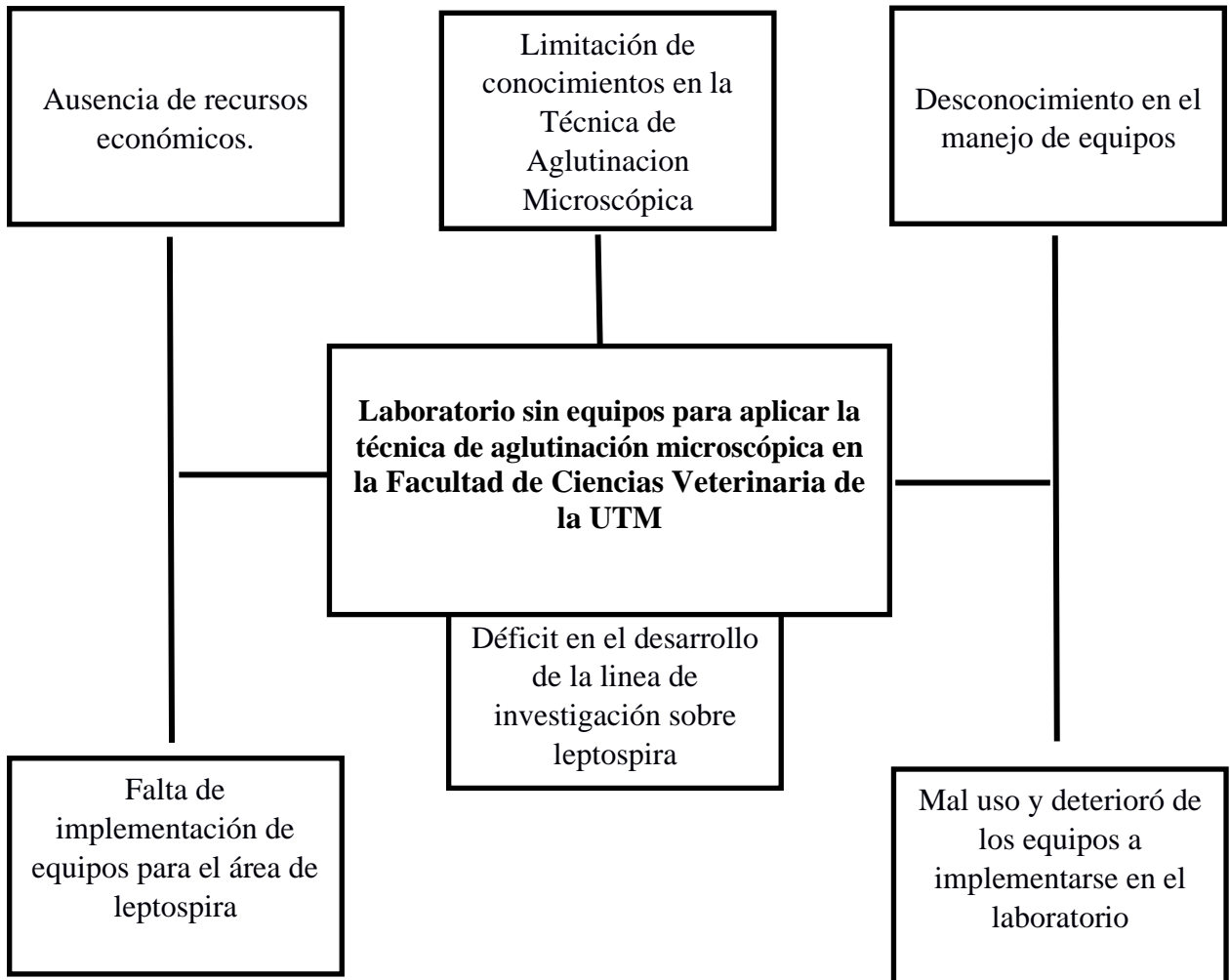
1. 5 Cajas de Petri estéril fueron usadas a las cuales se les agregó 8 ml de medio EMJH semisólido
2. Se inoculó las cajas Petri con 5 inóculos, (4 con cepas Leptospira; 1 control sin inóculo, 1 con contaminante)
3. Se incubaron a 28 a 30C° y se evaluaron a las 24, 48 y 288 horas
4. Los crecimientos fueron colocados en una placa portaobjeto y posteriormente teñidas con colorante Gram y leídas a 100X con lente de inmersión
5. Identificamos los diferentes tipos de contaminantes encontrados.

7.1 MATRIZ DE INVOLUCRADOS

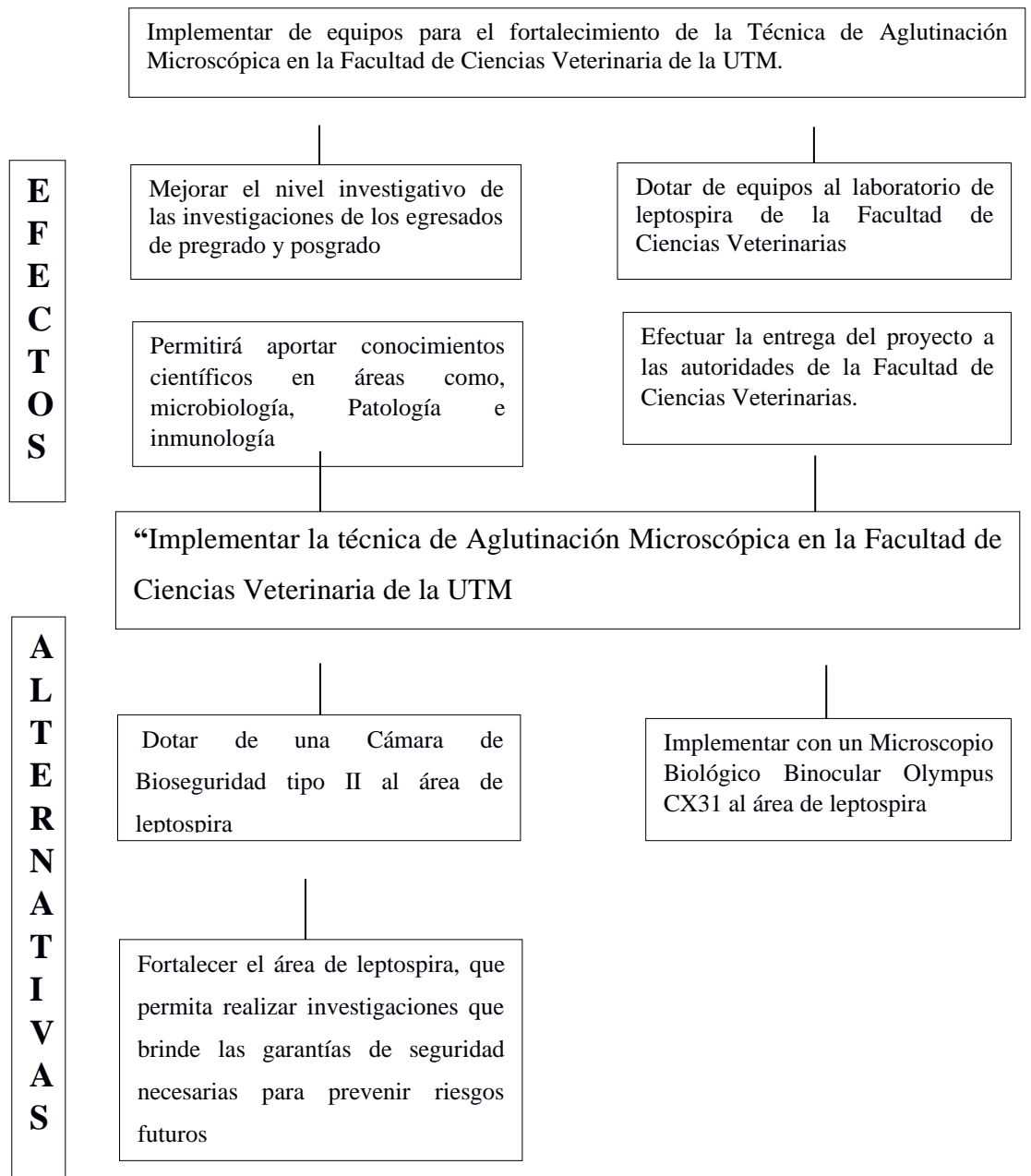
GRUPOS	INTERESES	PROBLEMAS PREVISTOS	RECURSOS Y MANDATOS	INTERESES DEL PROYECTO	CONFLICTOS POTENCIALES
Autoridades De la FCV. De la UTM	Proporcionar instalaciones adecuadas y equipos necesarios para investigación científica	No obtener los equipos necesarios para desarrollar nuevas líneas de investigación	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 un óptimo manejo de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT).
Docentes de la FCV.	Facilitar los recursos necesarios que promuevan e incentiven a los estudiantes de pregrado y posgrado.	Falta de equipos como: cámara de Bioseguridad y microscopio Biológico binocular Olympus modelo CX33	Ampliar el abanico de posibilidad sobre el estudio de otras patologías presentes en animales de producción	Facilitar los equipos para optimizar la técnica y estar disponible para investigación en estudiantes de pre y posgrado.	Poco desarrollo de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) en la provincia
Comunidad	Aporte en el campo de la medicina veterinaria para las investigaciones en pre y posgrado	Falta de herramientas de diagnóstico a la comunidad de médicos veterinarios sobre Leptospira	Crear una alternativa diagnóstica a investigadores médicos veterinarios involucrados en leptospira	Optimizar los conocimientos y la experiencia desarrollados durante la aplicación de esta técnica	Falta de recursos que conllevan a un déficit en el campo de las investigaciones

<p>Empleados del área de investigación de la FCV</p>	<p>Mejorar el desempeño en el manejo del laboratorio</p>	<p>Evitar riesgos al manipular bacterias dentro del laboratorio</p>	<p>Asesoramiento o sobre el manejo correcto de los equipos.</p>	<p>Proporcionar las capacitaciones adecuadas para fortalecer el funcionamiento y mantenimiento de los equipos y de la Técnica de Aglutinación Microscópica</p>	<p>Falta de herramientas de utilidad en la manipulación de cultivos y muestras clínicas</p>
--	--	---	---	--	---

7.2. ÁRBOL DEL PROBLEMA



7.3 ARBOL DE OBJETIVOS



7.4 MARCO LOGICO

OBJETIVO	INDICADORES	VERIFICADORES	SUPUESTOS
<p>Fin</p> <p>Dotar de equipos para el fortalecimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) en el área de Leptospira de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UTM</p>	<p>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.</p>	<p>*Informes de los tesis del proyecto de acuerdo al cronograma establecido.</p> <p>*Certificaciones del docente tutor del proyecto.</p> <p>*Oficios emitidos por las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias.</p>	<p>*Informes de los tesis del proyecto de acuerdo al cronograma establecido.</p> <p>*Certificaciones del docente tutor del proyecto.</p> <p>*Oficios emitidos por las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias.</p>
<p>Propósitos</p> <p>Acondicionar el área de leptospira, que permita realizar investigaciones que brinde las garantías de seguridad necesarias para prevenir riesgos futuros</p>	<p>Generar áreas adecuadas para los investigadores y estudiantes de pregrado y posgrado.</p>	<p>*Equipamiento del área destinada para adecuar el laboratorio de leptospira.</p> <p>*Fotos, informes, supervisores.</p>	<p>*Falta de conocimiento sobre manejo adecuado de la Técnica de Aglutinación Microscópica .</p> <p>*Deficiente utilización de los recursos.</p>
<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cámara de Bioseguridad tipo II. • Microscopio Biológico Binocular Olympus CX33 	<p>Se recomienda comprar equipos de calidad y alta durabilidad con garantía.</p>	<p>*Observación directa.</p> <p>*Facturas.</p> <p>*Fotografías.</p>	<p>Falta de recursos</p>
<p>Actividades</p>	<p>Costo</p>		
<p>1. Mantenimiento de los equipos.</p>	<p>\$ 0</p>	<p>Facturas</p>	<p>Ninguno</p>
<p>2.-Compra de cámara de Bioseguridad tipo II y Microscopio biológico binocular Olympus modelo CX33 con condensador de campo oscuro.</p>	<p>\$8.000</p>	<p>Facturas</p>	<p>Ninguno</p>
<p>3.- Capacitación al personal del laboratorio para el correcto uso de los equipos.</p>	<p>\$ 0</p>	<p>Facturas</p>	<p>Ninguno</p>
<p>4.-Gastos varios</p>	<p>\$ 0</p>	<p>Facturas</p>	<p>Ninguno</p>
<p>5.- Entrega de la obra física a las autoridades y docente responsable</p>	<p>\$ 0</p>	<p>Observación directa</p>	<p>Ninguno</p>

8.-RECURSOS UTILIZADOS.

Humanos	Materiales	Financieros
Rengifo Meza Mercedes	Cabina de bioseguridad tipo II	Beca por parte de la Universidad Técnica de Manabí
García Zambrano Ramón	Microscopio Biológico Binocular Olympus CX33	

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

Una vez implementado los equipos dentro del área de leptospira de la UTM, permitió dar mayor operatividad a esta área. La cámara de bioseguridad permitió evitar los riesgos de contagio al operador al manejar cepas de leptospira, así como evitar contaminación de los medios de cultivo, en el momento del procesamiento, además evitó eliminar contaminantes al ambiente de trabajo.

La dotación de un microscopio biológico binocular CX33 al área de leptospira permitió realizar una valoración de cepas de leptospira y cultivos, producto de siembras de muestras de orina provenientes de animales domésticos.

Con el presente trabajo de titulación contribuimos a mejorar los proceso que se llevan adelante en esta área, como son la preparación y fraccionamiento de medios de cultivo en tubos individuales para el trabajo y aislamiento y replicación de la bacteria, así como la técnica del MAT implementada en el diagnóstico de esta patología.

Por otra parte, este proyecto fue de gran ayuda para la realización de otros trabajos de titulación donde utilizaban la técnica del MAT como prueba diagnóstica, mejorando las condiciones y el nivel de las investigaciones de los egresados de pre grado de la Universidad Técnica de Manabí.

Mediante la aplicación de técnicas como la entrevista realizada a estudiantes, tesisistas, Autoridades de la facultad, y Médicos veterinarios que realizan práctica privada en clínica de pequeñas especies, sobre la leptospira, se obtuvo los siguientes resultados:

El 100% de los estudiantes entrevistados, desconoce que existe dentro de la facultad un área donde se puede diagnosticar esta enfermedad.

El 100% de tesisistas ven como un acierto que la universidad fortalezca espacios para la investigación y poder tener escenarios donde realizar sus trabajos de titulación dentro de la facultad y no estar dependiendo de laboratorios externos.

En cuanto a las respuestas obtenidas por las autoridades de la facultad ven con agrado esta modalidad de titulación, debido a que permite implementar equipos por medio de becas de titulación a las áreas de la facultad y poder realizar diferentes ensayos que son de gran importancia para el avance de las investigaciones, tanto en producción, sanidad y salud animal así como en el monitoreo de enfermedades zoonóticas que afectan al ser humano.

Un gran porcentaje de médicos veterinarios que realizan práctica privada respondieron no contar con un laboratorio que les brinde diagnóstico contra leptospira, lo que hace que se vean limitados a la realización de pruebas no específicas para el diagnóstico leptospira aumentando la certeza de su diagnóstico de esta patología muy frecuente en caninos de la provincia de Manabí.

10.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

10.1CONCLUSIONES.

- Es importante que los laboratorios Agropecuarios de la UTM estén debidamente equipados, para el diagnóstico de diferentes enfermedades que se encuentran presentes en los animales domésticos; así como potencializar el desarrollo de diversas pruebas diagnósticas como las desarrolladas por el área de leptospira garantizando la calidad de los procesos relacionados con la elaboración de medios de cultivos necesarios para la replicación de la leptospira en esta área.
- La cámara de bioseguridad evita que el operador se contamine con alguna de las muestras que se están analizando dentro de ella, así también evitan posible contaminación de otros agentes circulantes en el ambiente que podrían afectar los medios de cultivos preparados para el aislamiento y multiplicación de la Leptospira.
- Con la utilización de los equipos se busca encaminar nuevos proyectos de titulación mejorando el nivel de las investigaciones de los egresados de pregrado, aportando con conocimientos científicos en áreas asociada al campo de laboratorio.

10.2 RECOMENDACIONES.

- Brindar servicio externo en el diagnóstico de leptospira para las clínicas veterinarias privadas que requieren de este servicio, mejorando el diagnóstico de esta patología en los animales domésticos y contribuir en la lucha de esta enfermedad y a la salud pública.
- Seguir equipando las áreas de diagnóstico de los laboratorios con equipos especializados, para poder desarrollar nuevas técnicas diagnósticas directas como la PCR que requiere el área de Leptospira.

- Difundir a la comunidad universitaria y a la provincia de esta área y línea de investigación desarrollada dentro de la UTM.

11.-SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD.

11.1 Sustentabilidad.

El proyecto se sustenta en el fortalecimiento del área de leptospira particularmente en la técnica MAT, el cual sirve para la ejecución de nuevos proyectos de investigación que ayuden a alcanzar la titulación de estudiantes de pre y posgrado de la UTM, así como la integración con la comunidad científica del país en este tema de investigación que involucra el campo de la Medicina humana y Veterinaria.

11.2 Sostenibilidad.

La sostenibilidad del proyecto se mide en el incremento constante de trabajos de titulación de pregrado, así como el desarrollo de proyecto de investigación en Leptospira financiados por la institución.

El aumento de la actividad con otros grupos de investigación de instituciones gubernamentales así como universidades que se encuentran trabajando con el área de leptospira de la UTM, aseguran el avance y el desarrollo de nuevos proyectos y generación de información relevante sobre la leptospirosis en Manabí

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 en que se realizó el actual proyecto.

12. PRESUPUESTO

Cantidad	Denominación	Valor unitario	Total
1	Cámara de bioseguridad tipo II	\$ 4.098,00	\$ 4.098,00
1	Microscopio Biológico Binocular CX33	\$ 4.026,00	\$ 4.026,00
1	Tinción de GRAM	\$ 35.00	\$ 35.00
11	Caja Petri	\$ 2.00	\$ 22.00
TOTAL			\$ 8.181,00

13. CRONOGRAMA

Actividades	Años y meses																						
	2019					2020										2021							
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	
Aprobación del Proyecto	x																						
Compra de Equipos					x																		
Evaluación de contaminantes y viabilidad de las etapas															x	x	x						
Entrega de Equipos																	x						
Presentación de informe final																					x		
Sustentación y Defensa																							x

14.-BIBLIOGRAFÍA.

- Astudillo, M. (2009). SCIELO Revista Cubana de Medicina Tropical. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Estudio seroepidemiológico de la leptospirosis humana en el departamento del Valle del Cauca, Colombia: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000200004
- Botella, S. (2009). Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Leptospiriosis: https://www.insst.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Rev_INSHT/2009/55/60_fichas_practicas.pdf
- Céspedes, M. (2005). SCIELO Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Leptospiriosis: Enfermedad Zoonótica Emergente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400008
- Combol, A. (2013). Instituto de Higiene. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Bioseguridad: http://www.higiene.edu.uy/parasito/cursep/bioseg.pdf?fbclid=IwAR0lf67NNWkLE_z9D_hR32Fopw8q7tVsTNiHVjPeEl7guRNIVfQDd9kMfi8
- Finlay, C. (2002). Revista Cubana de Medicina Tropical. Obtenido de Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok en medio EMJH modificado: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000100008
- Galán, L. (2019). Materiales de Laboratorio. Recuperado el 16 de Octubre de 2020, de <https://www.materialdelaboratorio.top/mechero-de-alcohol/>
- Gil, M. (2016). Microscopio de campo oscuro. Recuperado el 05 de 10 de 2020, de <https://www.lifeder.com/microscopio-campo-oscuro/>
- Godínez, J. (2013). Manual De Diagnostico De Microbiólogo *Leptospira interrogans*. Recuperado el 29 de Octubre de 2020, de https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_godinez_santos.pdf
- Hamaji. (2013). Patente Internacional. Recuperado el 29 de Octubre de 2020, de <https://patentados.com/2013/bacterias-resistentes-a-5-fluorouracilo>
- Herrera, E., & Palomares, G. (2015). Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Recuperado el 25 de Junio de 2019, de

Leptospirosis bovina:
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/4371/Leptospirosis%20bovina.pdf?sequence=1>

Hilda Chávez, Daniel Hernández, Ariel Vichil, David Bermúdez, Gabriela Antonio, Rosendo Luria . (2015). Salmonella entérica: un aliado en la terapia contra el cáncer. Science Direct, 72, 15-25.

INSST. (2013). insht.es Riesgos Biológicos. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de *Leptospira* *interrogans:*
<http://insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Leptospira%20interrogans.pdf>

Jiménez, L. (2006). Leptospirosis en Bovinos. Recuperado el 05 de 10 de 2020, de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis245.pdf>

Lara, H., Ayala , N., & Rodríguez, C. (2008). medigraphic Artemisa. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Bioseguridad en el laboratorio: medidas importantes para el trabajo seguro: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2008/bq082c.pdf>

Lozano, C. (2008). Manual De Bioseguridad De Laboratorio. Recuperado el 02 de Octubre de 2020, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl083-4e.pdf>

Martínez, A. (2013). El microscopio de campo oscuro. Recuperado el 05 de 10 de 2020, de <https://www.revistacienciasunam.com/es/1349-el-microscopio-de-campo-oscuro.html>

Martínez, P. (2015). Cabinas De Bioseguridad. Recuperado el 03 de Octubre de 2020, de <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/cabinas-de-bioseguridad:-tipos-y-clases>

Ministerio de Salud . (1998). Perú, Manual de vigilancia y control de leptopirosis. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1172_DGSP35.pdf

OIE. (2014) Leptospirosis NB: Versión adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014.

OIE. (2018). Obtenido de Leptospirosis : https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.12_Lep_tospirosis.pdf

Olympus. (2020). Microscopio vertical CX31. Obtenido de [https://www.olympus-lifescience.com/es/microscopes/upright/cx31/#!cms\[focus\]=cmsContent693](https://www.olympus-lifescience.com/es/microscopes/upright/cx31/#!cms[focus]=cmsContent693)

OMS. (2005). ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Recuperado el 22 de Mayo de 2019, de Manual de Bioseguridad en el Laboratorio: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf

- OPS. (2019). Leptospirosis. Organización Panamericana de la Salud.
- Orellana, B. (2013). Paho.org. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Diagnostico de leptospirosis animal: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2013-CHA-Leptospirosis-HON-Orellana-2.pdf>
- Pérez, Y. (2015). SCIELO Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Revista Cubana de Medicina Militar: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572015000400006
- Pizarro, E. Z. (2007). Leptospirosis. Puesta al día. Revista chilena de infectología, 24(3). doi:0716-1018
- Santos, J. (2012). Scribd. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de Bioseguridad Según La OMS, OPS: <https://www.scribd.com/doc/77697217/Bioseguridad-Segun-La-Oms->
[Ops?fbclid=IwAR0uiD4QqejvdBPYErXu78OEL8NDzKif06iUbT1F6qnaywYC32rSWhvG7z0](https://www.scribd.com/doc/77697217/Bioseguridad-Segun-La-Oms-)
- VISAVET. (2008). VISAVET BIOSLab Plataforma de Formación en Bioseguridad en Laboratorios. Obtenido de CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID: https://www.visavet.es/es/bioslab/niveles-de-bioseguridad.php?fbclid=IwAR1EWGZMqat9YUA0FhE4VL72DsIQZrchbQoQk4NwBuvaMg_OWyzKar5D4tU

15.ANEXOS



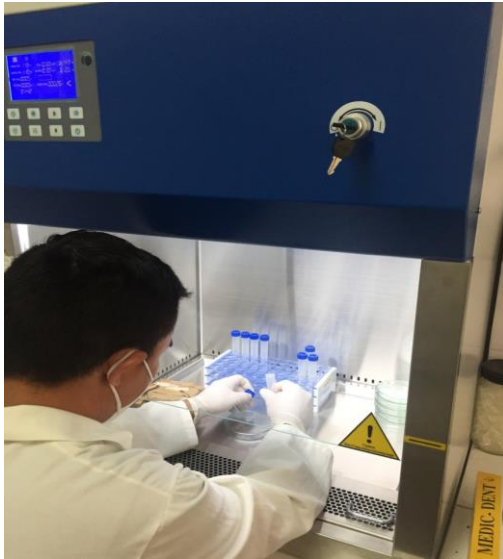
Cabina de Seguridad Biológica tipo 2



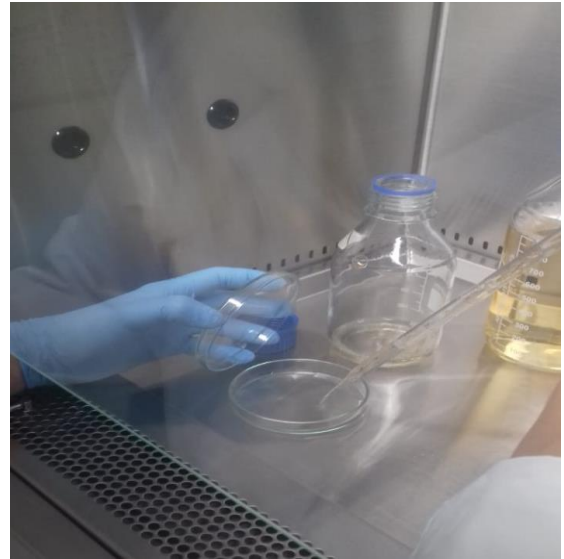
Microscopio Biológica Olympus



Entrega de los equipos al Decano de la FCV en el Área de Leptospira.
De izquierda a derecha: Ing Katerine Moreira, Mercedes Rengifo, Dr. Edis Macías, Jair García y Dr. Víctor Montes



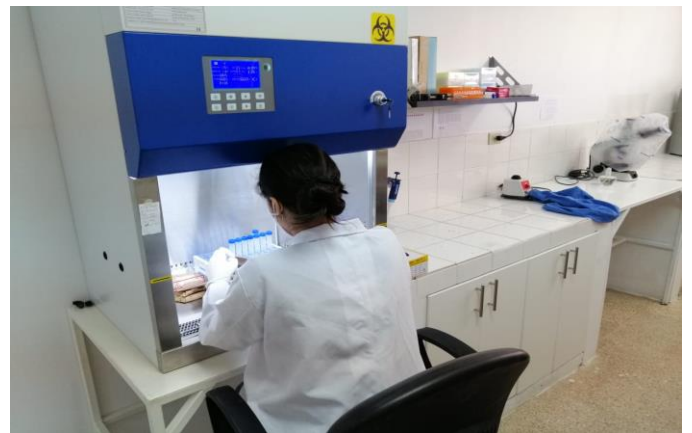
Siembra de cepas de leptospira en cajas Petri



Manipulación de medios de cultivos en la cabina de bioseguridad



Manipulación de cultivos de leptospira en la cámara de bioseguridad



Colocación de medios de cultivo en placas de Petri para evaluar cepas existentes

Entrevista a las autoridades de la opinión sobre la utilidad del área de leptospira en la relación a investigación y posible servicio a la comunidad

1. ¿Como ve usted la implementación de laboratorios por medio de becas de titulación?

De un total de 5 autoridades entrevistadas, el 100%, ven como favorable la implementación de los laboratorios por medio de la opción de becas de trabajo comunitarios entregadas por la universidad a sus estudiantes.

2. ¿Qué opinión le merece que se esté potencializando un área de leptospira en la facultad de ciencia veterinario?

El total de los entrevistados describieron como muy relevante la potencialización del laboratorio de leptospira en la facultad de ciencias veterinarias, evidenciando que, este laboratorio es de gran ayuda para las investigaciones que se están haciendo dentro de ella para en un futuro brindar servicio a la comunidad

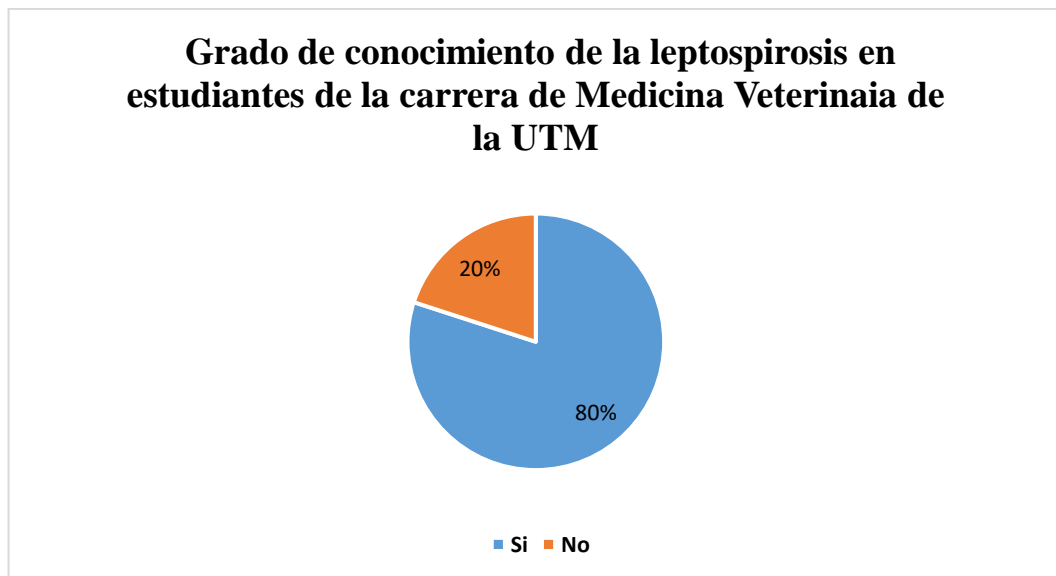
3. ¿Ud. cree que es importante el tema de leptospirosis en la carrera de medicina veterinaria puede decir algunas razones?

El 100% de los entrevistados respondió que es muy imponte que se hable de la leptospira en la carrera de medicina veterinaria porque va ayudar para los diferentes ensayos que sirven como avance para las investigaciones, tanto en producción, sanidad animal, así como monitoreo de enfermedades zoonóticas que afectan al ser humano.

Entrevista realizada a estudiantes de los niveles V, VI, VII de la carrera de Medicina Veterinaria de la UTM

1. ¿Conoce ud sobre la enfermedad llamada leptospirosis?

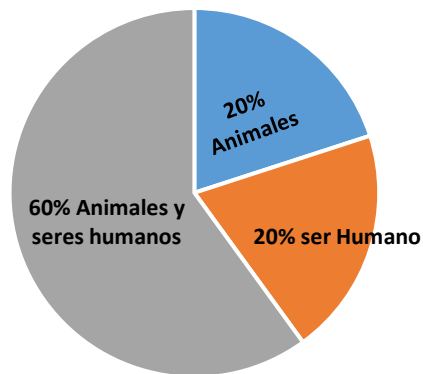
De un total de 10 estudiantes entrevistados el 80% (8/10) respondieron haber escuchado de la enfermedad mientras que el 20% (2/10) restante no conocen de la enfermedad, el cual se ve representado el siguiente gráfico



2. ¿De acuerdo a sus conocimientos a que especie animal afecta la leptospirosis?

El 60% de los estudiantes entrevistado respondieron conocer que la enfermedad afecta a la mayoría de animales y al ser humano, y el 40% restante solo afecta animales y al ser humano por separado, información que se describe en el siguiente gráfico.

Conocimiento de la afectación de la leptospirosis en los animales



3. ¿Sabes si la facultad cuenta con un área de trabajo para el estudio de la leptospirosis?

El 70% responde que conoce del área, el 30% de los estudiantes desconoce de esta área de estudio dentro de la facultad.

4. ¿Cuál sería la ayuda que recibirían como estudiantes si se cuenta con áreas y equipos para el diagnóstico de esta enfermedad?

El 100% de los estudiantes entrevistados respondieron que un área equipada para el diagnóstico de esta enfermedad sería de gran ayuda para sus investigaciones.

Entrevista a estudiantes en Tesis de la carrera de medicina veterinaria de la UTM

1. ¿Cuál es la ventaja de que el área de Leptospira cuente con equipos propios para sus actividades?

De un total de 10 estudiantes en tesis entrevistados el 100% indicó que es de mucha utilidad implementar y dotar de equipos al laboratorio de leptospira de la facultad de ciencias veterinarias

2. ¿Qué opinión le merece tener un área de leptospira para realizar los trabajos de titulación?

El 100% de los estudiantes en tesis entrevistados indicaron que es de mucha utilidad contar con un laboratorio de leptospira en la facultad de ciencias veterinarias, lo que permitirá poder tener una opción mas de titulación en esta línea de estudio y de investigación y poder hacer trabajos tanto en beneficio de la comunidad y de apoyo al Ministerio de Salud Pública de la provincia.

3. ¿Como ve la implementación de tesis con becas de titulación para equipamientos de laboratorio?

El 100% de los estudiantes en tesis entrevistados indicaron que es de mucha utilidad dotar de equipos a los laboratorio de la facultad lo que permite hacer mayores práctica y fomenta la investigación al terminar la carrera por medio de trabajos de titulación.

4. ¿Cuál es la utilidad que le ve a fututo al área de leptospira de la UTM?

Se pudo constatar que el 100% de los entrevistados respondieron que es de mucha utilidad el área de leptospira para el estudio e investigación de esta enfermedad zoonótica la cual es de preocupación general tanto en sanidad animal, producción y en ser humano, aportando con fines investigativos para la comunidad en general y resolver problemas sanitarios.

Entrevista a Médicos Veterinarios del cantón Portoviejo y de la provincia

1. ¿Conoce sobre leptospirosis?

Con el objetivo de conocer si la comunidad veterinaria tiene conocimiento de la de la leptospirosis, se realizó una entrevista a 10 médicos veterinarios, observando que el 100% respondió conocer acerca de la enfermedad, constatando que si tienen conocimiento sobre esta enfermedad la cual manifiestan que afectan al ser humano por ser una enfermedad zoonótica.

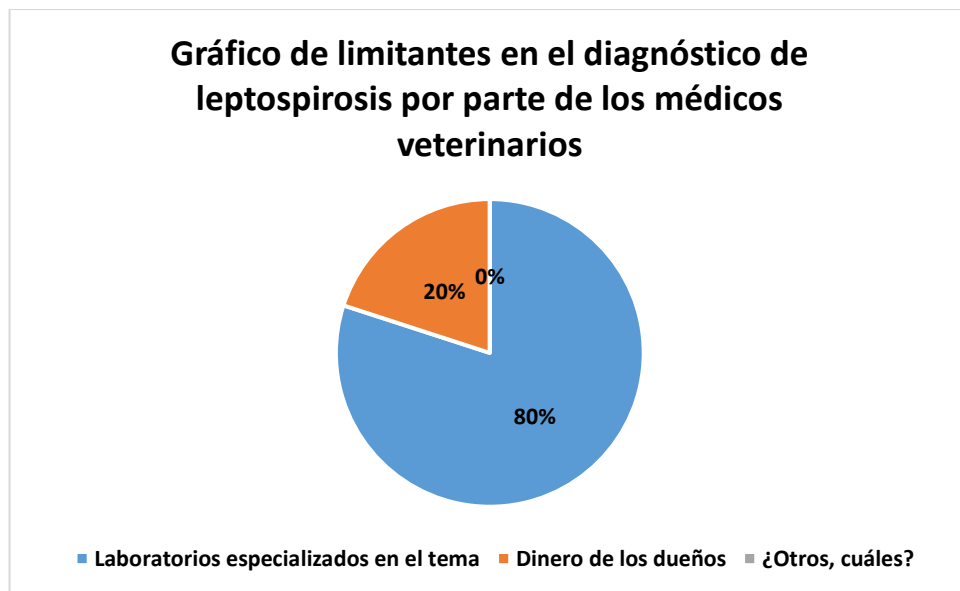
2. ¿Qué tan frecuente es la leptospirosis en los animales que Ud. trata en su consulta diaria?

El 40% respondió que es muy frecuente observar leptospirosis entre los animales atendido en sus consultas; otro 40% respondió que es poco frecuente la enfermedad; el 10% responde que es poco observada y el 10% restante indica que no es observada. Se pudo constatar que los médicos veterinarios en sus consultas diarias es muy frecuente que algún animal llegue con signos de leptospirosis, en el siguiente gráfico se presenta las respuestas correspondientes.



3.¿Cuáles son las limitantes como médico a la hora de diagnosticar la leptospirosis?

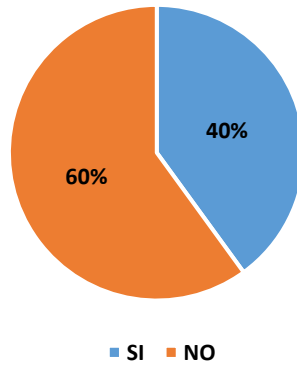
El 80 % de las respuestas, fueron atribuidas a la falta de laboratorios especializados para diagnosticar leptospirosis; el 20% atribuyeron a la falta de dinero por parte de los dueños para realizar un buen diagnóstico. Se pudo constatar que los médicos veterinarios que realizan prácticas privadas no cuentan con un laboratorio especializado que brindes este servicio, ver gráfico.



4.¿Conoce sobre la técnica de Aglutinación microscópica (MAT)?

El 40% de los entrevistados respondió conocer sobre esta técnica diagnóstica, y el 60% respondió no conocer esta técnica diagnóstica. Se pudo constatar que los médicos veterinarios en su mayoría no tienen conocimiento de esta técnica, la cual es de gran importancia para el diagnóstico de leptospirosis acompañada de signos clínicos compatibles con la enfermedad.

Gráfico que representa el nivel de conocimiento de la técnica del MAT por parte de los médicos veterinarios



5.¿En caso que la UTM brinde esos servicios diagnósticos los usaría?

Al consultar sobre la posibilidad de ofertar este servicio en los laboratorios veterinarios, el 100% de los entrevistados respondieron usar este servicio si llegase a ponerse en disponibilidad de la comunidad manabita como herramienta diagnóstica contra leptospirosis. Se pudo constatar que los médicos veterinarios si están dispuestos a utilizar los servicios de diagnóstico de leptospira de la UTM ya que no existen laboratorios particulares que cuenten con equipos especiales para el diagnóstico de la misma.