

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CONVOCATORIA 2020

1. **Nombre del proyecto de investigación:** Técnica de reacción en cadena de polimerasa (qPCR) en tiempo real para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y zoonóticas.
2. **Tipo de proyecto:** Proyectos de Investigación con componentes de desarrollo e Innovación.
3. **Grupo de investigación:** Soberanía, Seguridad Alimentaria y Biodiversidad

4. **Línea de investigación y Campos del Conocimiento:**

Línea de investigación: Producción agropecuaria sustentable.

Línea de investigación: Cuidado integral de enfermería

Campos del Conocimiento: Biología, Veterinaria, Medicina.

Especialidad del campo

Campo Amplio	Biología
Campo Específico	Veterinaria
Campo Detallado	Medicina

5. **Director del Proyecto, integrantes internos y/o externos (coautores), ayudantes y/o semilleros de investigación, todos son participantes en la investigación**

M.Sc. Martin Campos.	Director
M.Sc. Marcelo Ibarra.	Coautor
M.Sc. Ruth Salgado	Coautor

6. **Fecha de entrega del perfil:** 25 de mayo de 2020

7. **Fecha planificada de finalización del proyecto:** mayo de 2021

8. **Introducción**

El diagnóstico serológico y molecular de las enfermedades infecciosas ha tenido un desarrollo marcado en los últimos años, es así que estas pruebas resultan irremplazables en el campo de la sanidad pública y animal como una herramienta

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI		SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN		

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

diagnostica de enfermedades transmitidas por bacterias, virus y parásitos.

Prevenir enfermedades y evitar su diseminación mediante un diagnóstico temprano de las mismas es uno de los objetivos fundamentales actualmente ya que los microorganismos infecciosos causan desequilibrio en la salud provocando pérdidas económicas, por muerte, tratamientos médicos, parálisis de las actividades, entre otros.

La provincia del Carchi es una de las provincias del Ecuador que no cuenta con la infraestructura tecnológica para realizar diagnóstico molecular de enfermedades de manera constante, inclusive considerando el límite provincial con Imbabura, esta provincia limítrofe tampoco cuenta con infraestructura para realizar este tipo de diagnóstico.

Las enfermedades infecciosas algunas de ellas zoonóticas se encuentran presentes afectando la salud pública y la producción animal alrededor de todo el mundo, son producidas por bacterias, virus y parásitos, estos microorganismos tienen la capacidad de transmitirse fácilmente por transmisión directa o indirecta, lo que hace que su propagación sea rápida y muchas veces difícil de controlar, por lo que se hace muy necesario recurrir a herramientas de laboratorio que nos brinden un alto grado de sensibilidad y especificidad en lo que al diagnóstico se refiere, es por eso que la presente investigación se enfoca en incorporar el uso de biología molecular para el diagnóstico preciso e identificación de agentes etiológicos de enfermedades infecciosas que estén presentes en la Provincia del Carchi.

El proyecto de investigación también se relaciona o articula con el Plan Nacional de Desarrollo o de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en este caso con el objetivo número tres que dice: Garantizar una vida saludable y promover el bienestar para todos y todas en todas las edades, ya que, al investigar enfermedades infecciosas y zoonóticas, involucra directamente a la salud de las personas, ya que están afectando la salud pública.

Por lo antes mencionado, el presente proyecto tiene por objetivo dotar a la UPEC de un laboratorio de diagnóstico molecular a través del uso de la técnica de PCR en tiempo real, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, validado y adaptado a la zona epidemiológica.

1. El problema

Los animales domésticos son la fuente base de proteína para la población humana, ya que aportan esta proteína a través de carne, leche, huevos y derivados. Además, la tendencia de crecimiento poblacional mundial en los últimos años ha hecho que las personas y/o empresas dedicadas a la crianza de

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

animales, aumente su producción para poder suplir los requerimientos de alimento para la población.

Dentro de los procesos productivos existen factores que afectan el rendimiento, y uno de ellos es la salud de los animales, siendo una de las principales causas las enfermedades infecciosas. que son una preocupación mundial y más aún en países en vía de desarrollo, donde muchas de ellas son endémicas y además tienen un potencial zoonótico.

Las enfermedades son provocadas por microorganismos ya sean estos virales, bacterianos o parasitarios, estos tienen consecuencias productivas, reproductivas y ciertas ocasiones pueden incluso causar la muerte de muchos animales ya sean estos jóvenes o adultos. Muchas de las enfermedades que se presentan en bovinos, tienen un diagnóstico clínico similar, lo que dificulta la aplicación de estrategias de control específicas dentro un hato ganadero, por lo que para el diagnóstico preciso se requiere de pruebas diagnósticas de laboratorio con buenas características de sensibilidad y especificidad, y que estas se adapten a la zona epidemiológica en mención.

El presente proyecto tiene la finalidad de implementar las técnicas de serología y biología molecular en los laboratorios de la UPEC, con el fin de aportar a la investigación a través de la aplicación de estas tecnologías diagnósticas, mismas que constituyen un aporte muy valioso y que contribuyen para cualquier programa de diagnóstico y control de enfermedades a nivel de la provincia del Carchi, además estas pruebas son útiles para establecer la presencia de una enfermedad infecciosa en una población de animales y de esta manera poder contribuir a establecer programas de control de animales enfermos o infectados. Es muy importante mencionar que las pruebas serológicas sirven para frenar la propagación de enfermedades a través de un diagnóstico oportuno de las mismas y de esta manera evitar la movilidad de animales enfermos, así como la presencia de posibles enfermedades zoonóticas.

A pesar de que las pruebas serológicas o de laboratorio son la base para establecer estrategias de control de una enfermedad, es también importante identificar de manera directa el agente causal, lo que en la actualidad se realiza mediante diagnóstico molecular, ya que con esta información se podría aplicar estrategias específicas para el agente causal circundante dentro de una zona.

2. Las variables

VARIABLE DEPENDIENTE
Prevalencia de enfermedades infecciosas, determinación en porcentaje de animales positivos.
Identificación molecular de, determinación de serotipos de agentes patógenos circundantes en la provincia del Carchi

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

VARIABLE INDEPENDIENTE
Características de la zona de estudio, la provincia es una zona netamente ganadera, y es una zona endémica de enfermedades infecciosas.

3. Operacionalización de las variables de la investigación

VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIÓN	INDICADORES	ITEMS
Prevalencia de enfermedades infecciosas, determinación en porcentaje de animales reactivos seropositivos.	Prevalencia de la enfermedad.	Prueba PCR en tiempo real. Para determinar los porcentajes de prevalencia de la enfermedad que se vaya a estudiar y poder determinar la situación actual de la provincia en cuanto al número de animales diagnosticados como positivo ante la enfermedad del estudio.	Observación. Porcentaje de prevalencia.
Identificación molecular de, determinación de serotipos de agentes patógenos circundantes en la provincia del Carchi	Diagnóstico Molecular mediante la prueba de PCR en tiempo real.	Prueba PCR en tiempo real, este tipo de prueba permite aislar el agente patógeno específico de cada enfermedad que se estudie en la investigación.	Observación. Determinación de agente causal propio de la zona en la que se realiza la investigación.
VARIABLE INDEPENDIENTE			

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

Características de la zona de estudio.	Provincia del Carchi.	Fincas ganaderas de la provincia.	Número de fincas ganaderas
--	-----------------------	-----------------------------------	----------------------------

4. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Diagnosticar enfermedades infecciosas y zoonóticas mediante el uso de PCR en tiempo real (qPCR)

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Implementar el laboratorio de biología molecular en la UPEC para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas y zoonóticas en bovinos.
- Definir protocolos apropiados de extracción de ADN para el diagnóstico molecular.
- Determinar la prevalencia de enfermedades infecciosas y zoonóticas de bovinos en la provincia del Carchi.
- Identificar el agente causal de las enfermedades en estudio.

5. Justificación y alcance territorial.

El desarrollo y uso de equipos de diagnóstico serológico y molecular para el diagnóstico y tipificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas permite comprender los potenciales usos de la biología molecular en el campo de la salud pública, animal y vegetal, ya que la presencia de enfermedades parasitarias o infecciosas en varias ocasiones han causado graves problemas en la salud humana. Estos hechos han dado como resultado que las técnicas diagnósticas como biología molecular y serología se conviertan en instrumentos fundamentales para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Las nuevas técnicas diagnósticas que se basan en el uso de la biología molecular y serología enzimática permiten identificar y diagnosticar de manera precisa la presencia de agentes infecciosos tales como virus, bacterias, parásitos, además permite entender la epidemiología de una enfermedad y de esta manera contribuir como institución al desarrollo de avances en investigación.

La UPEC, bajo este contexto tiene la oportunidad de aportar a través de la implementación de un laboratorio de diagnóstico molecular con investigación sobre enfermedades infecciosas, y dar a conocer no solo al país sino al mundo por medio de publicaciones científicas a cerca de la presencia de agentes etiológicos que estarían causando determinadas enfermedades en esta región del Ecuador, este hecho resulta de suma importancia para investigadores de países vecinos quienes quizás no

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

conocen sobre la presencia real y evidenciada científicamente de determinados microorganismos patógenos responsables de algunas enfermedades infecciosas, y así de esta manera poder relacionar con patologías presentes en sus países, incluso hacer investigaciones similares para poder confirmar la presencia de microorganismos iguales que estén afectando la salud.

De esta manera evidencia la necesidad de la creación de un laboratorio de diagnóstico molecular, ya que se apoyaría directamente a la provincia del Carchi, se informaría por medio de investigaciones y publicaciones científicas los resultados alcanzados no solo a nivel nacional sino también internacional, ya que al ayudar a diagnosticar enfermedades infecciosas se pueden prevenir estas y dar lugar a que las autoridades desarrollen estrategias adaptadas al contexto para controlar enfermedades infecciosas y parasitarias.

6. Marco Teórico

PCR en tiempo real

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) en tiempo real es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas, cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces. (Aguilera, et al., 2016)

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10,000 y 100,000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa, 1,000 veces más sensibles que la hibridación por Dot blot² y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN.

Además, se ha reportado que para la PCR convencional (punto final), la cantidad final de producto amplificado puede verse afectada por inhibidores, saturación de la reacción o bien por falta de una estandarización adecuada. (Aguilera, et al., 2016)

Entonces, los resultados de la PCR punto final pueden no tener relación entre la cantidad de ácidos nucleicos que había al inicio de la reacción y la concentración final del producto amplificado. Debido a la enorme proyección que tienen los ensayos de la PCR en tiempo real como herramienta útil y extremadamente sensible en investigación clínica, industrial, biológica y biomédica, en este capítulo se revisan las bases teóricas de esta técnica, sus aplicaciones, el análisis de resultados y se da un ejemplo específico para realizar un ensayo de cuantificación. (Aguilera, et al., 2016)

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales

El diagnóstico y control de las enfermedades virales de importancia económica ha progresado de forma notable en la última década, gracias a la aplicación de las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a las diferentes aplicaciones de esta, como son la reacción de PCR basadas en la detección de fluorescencia en tiempo real (rPCR), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y las técnicas basadas en la secuenciación de ácidos nucleicos. Estos enfoques permiten la amplificación, la cuantificación simultánea y el análisis de secuencias de ácidos nucleicos, donde se combinan rapidez con elevadas sensibilidad y especificidad; sus beneficios con relación a los ensayos de PCR convencional o de punto final incluyen, además de un elevado rango dinámico, reducido riesgo de contaminación cruzada, capacidad para ser escalados y cuantificación precisa de la diana, lo que permite la determinación de la carga viral. (Perera, et al., 2018).

Detección del virus de la COVID-19 mediante la RT-PCR en tiempo real

Mientras el virus que provoca la COVID-19 se propaga por todo el mundo, el OIEA, en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), ofrece su apoyo y sus conocimientos especializados para ayudar a los países a utilizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real), uno de los métodos de laboratorio más exactos para detectar, seguir y estudiar el coronavirus. (Nicole, et al., 2020).

La RT-PCR en tiempo real es una técnica muy sensible y precisa que puede ofrecer un diagnóstico fiable tan solo en tres horas, aunque a los laboratorios suele tomarles entre seis y ocho horas de media. En comparación con otros métodos disponibles de aislamiento de virus, la RT-PCR en tiempo real es bastante más rápida y tiene menos posibilidades de contaminación o error, ya que todo el proceso puede llevarse a cabo en tubos cerrados. De los métodos existentes, sigue siendo el más exacto para detectar el coronavirus. (Nicole, et al., 2020).

La RT-PCR en tiempo real no sirve para saber si alguien estuvo infectado por el virus, lo cual es importante para comprender su desarrollo y propagación, ya que los virus solo están presentes en el organismo durante un período determinado. Para detectar, seguir y estudiar infecciones pasadas, en particular las que han podido cursarse o propagarse de manera asintomática, se precisan otros métodos. (Nicole, et al., 2020).

Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda

Se validó una técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando el termociclador y los reactivos del LightCycler 2.0 de Roche, según las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal, y se evaluó su desempeño para la detección del virus de fiebre aftosa en la infección aguda de bovinos vacunados e infectados experimentalmente con virus A Argentina/2001 o A24 Cruzeiro. La técnica demostró ser robusta, presentó coeficientes de variación menores del 4 % al considerar días, extracciones y repeticiones diferentes y logró detectar hasta 0,4 DICT50%, o hasta

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

100 moléculas de ARN. La sensibilidad diagnóstica en líquido esófago-faríngeo (LEF) fue 93,1 (IC95%: 86,5-96,6) y la especificidad diagnóstica fue 100 (IC95%: 96,3-100). Se observó protección total en lo referido a aparición de síntomas clínicos tras la infección aguda experimental con virus A Argentina/2001 o A24 Cruzeiro en animales multivacunados o vacunados 7 o 14 días antes de la exposición viral, y se pudo detectar la presencia viral por RT-PCRtr en LEF desde el primer día y hasta por lo menos el día 9 posexposición en todos los animales expuestos. Los títulos virales en estos bovinos fueron de hasta 2 log 10 inferiores que los observados en los animales con signos clínicos. (Fondevila, et al., 2014)

Identificación de bovinos persistentemente infectados y genotipo del virus de la diarrea viral en bovinos de Anta, Cusco, Perú

El objetivo del presente estudio fue identificar bovinos persistentemente infectados (PI) y el genotipo del virus de la diarrea viral (VDVB) en bovinos de pequeños ganaderos de cinco distritos de la provincia de Anta, Cusco, que resultaron negativos a anticuerpos contra el VDVB (n=558) en un estudio previo. La identificación de los animales PI se realizó en las 558 muestras de suero de bovinos Holstein, Brown Swiss y criollos hembras de varias edades, mediante la prueba de ELISA de captura. La identificación del genotipo viral fue realizada en cuatro muestras de bovinos PI mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real. El 7.2% (40/558) de los bovinos resultaron positivos a antígeno viral en un primer análisis, donde el antígeno fue detectado en animales mayores a 6 meses hasta los 5 años en las tres razas. En el segundo análisis, realizado 30 días después, en los 40 positivos, 30% (12/40) continuaron siendo positivos a antígeno viral indicando que eran animales PI entre mayores a 6 meses y 4 años de cuatro de los cinco distritos de Anta. La prevalencia de los animales PI en la población bovina muestreada de la provincia de Anta fue de 2.2% (12/558). La prueba RT-PCR en tiempo real mostró la amplificación de un producto específico correspondiente al genotipo 1 (VDVB-1). No hubo amplificación de la secuencia objetivo del genotipo 2. (Valdez, et al., 2018)

Identificación del Genotipo del VDVB en Animales PI

Se escogieron cuatro muestras de animales PI, uno de cada distrito con un coeficiente M/P de 0.3 a 0.8. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C y enviadas al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, para la identificación del genotipo viral mediante la prueba de RT-PCR en tiempo real. (Valdez, et al., 2018)

La extracción de ARN a partir de sueros de bovinos PI (n=4) se hizo empleando el kit comercial MagMAX-96 Viral RNA Isolation (Applied Biosystems, EEUU), el cual utiliza perlas magnéticas como sistema de purificación. Se realizaron cuatro lavados y la elución fue con 90 µl del Elution Buffer provisto por el kit. Los ARN extraídos fueron utilizados como moldes para la detección del VDVB-1 y VDVB-2, empleando dos pares de cebadores, dos sondas y controles del kit BVDV genesig® RT-PCR (Primerdesign, UK); y el master mix del Oasig OneStep qRT-PCR (Primerdesign, UK). La elaboración de la mezcla de reacción y las condiciones para la amplificación de los fragmentos del

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

genoma blanco se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante en el termociclador qTOWER 2.2 Real-Time PCR System. (Valdez, et al., 2018)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

Hoy en día, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza normalmente en la rutina asistencial de la mayoría de nuestros laboratorios, pero su empleo se ha limitado, con pocas excepciones, al campo de la virología y en especial a un reducido grupo de virus con gran interés económico, para los que se dispone de ensayos comerciales bien estandarizados. Por diversas razones, la PCR convencional se ha implementado poco en el diagnóstico de otras muchas enfermedades infecciosas a pesar de aportar indudables ventajas. La PCR a tiempo real combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCR a tiempo real, irá reemplazando la PCR convencional y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones microbiológicas. Costa J, (2004).

Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba

EL objetivo de esta investigación fue, detectar Salmonella spp. por PCR en tiempo real (PCR-TR) y el método convencional en alimentos de la vía pública y canales de bovino de una planta certificada de beneficio animal con sistema HACCP de Montería. Se analizaron 311 muestras de alimentos: 256 de la vía pública y 55 de una planta de beneficio animal. Los análisis microbiológicos se realizaron por el método estándar convencional y la PCR-TR con LightCycler® foodproof Salmonella detection kit (Roche Diagnostics).

Se aisló Salmonella spp. en 16,1% de las muestras. La prueba de χ^2 mostró significancia estadística entre las técnicas (p PCR-TR y 12,3% por el método convencional; quesos, con 18,4% por PCR-TR y 5,3% por el método convencional; cerdo, con 23,1% por PCR-TR y 15,4% por el método convencional, y carne molida, con 9,3% por PCR-TR y 15,6% por el método convencional. En canales de bovinos la presencia de Salmonella spp. fue de 1,8%. Se observó diferencia con respecto al tiempo empleado por cada una de las técnicas: la de PCR-TR permitió obtener resultados a las 24 horas, en comparación con los cuatro días del método, convencional. Como conclusiones tenemos que el uso de PCR-TR es una valiosa alternativa para determinar Salmonella spp., en alimentos por su especificidad y rapidez. También es importante la alta presencia de Salmonella en los alimentos callejeros representa un problema de salud pública para los consumidores. (Yáñez, et al., 2008).

Detección de Coxiella burnetii en leche de bovinos del Ecuador

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

Coxiella burnetii es un coccobacilo Gram negativo intracelular estricto, cuyo reservorio animal es el ganado vacuno. Este microorganismo es el causante de la Fiebre Q, una enfermedad zoonótica transmitida hacia a los humanos a través del contacto e inhalación con fluidos de animales infectados o el consumo de leche. Se utilizó PCR en tiempo real con una sonda fluorescente TaqMan, para la detección de una secuencia repetitiva de 61-63pb del transposón IS1111. Las muestras de leche bovina analizada fueron colectadas en 9 provincias del territorio ecuatoriano escogidas aleatoriamente. El estudio encontró muestras positivas para *C. burnetii* tanto en las fronteras de Colombia y Perú, como en la provincia de Chimborazo en el Ecuador. Este trabajo representa el primer estudio en América Latina de detección de este patógeno a través de un método molecular de alta sensibilidad. Rojas, (2012)

Detección de *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real

En Ecuador, los estudios sobre las bacterias del género *Listeria* son escasos en quesos artesanales y en leche cruda prácticamente inexistentes. La producción de leche es una de las principales actividades ganaderas en la provincia de Pichincha y se hace indispensable el estudio de estos productos. Siendo todos los cantones que conforman Pichincha, productores de leche, se muestrea al azar tres de ellos, Cayambe, Quito y Pedro Moncayo. El objetivo de este estudio fue determinar *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real. El método empleado fue la aplicación de la técnica qPCR en la detección de microorganismos y sobre todo de bacterias en alimentos, se basa en cuatro aspectos fundamentales: su sensibilidad, especificidad, rapidez y capacidad de procesamiento de gran flujo de muestras. Es posible detectar pequeñas cantidades de microorganismos patógenos, como es el caso de *Listeria spp.* en leche cruda, previa extracción y cuantificación de ADN total. Los resultados obtenidos en este estudio fueron, en leche cruda, se determinó 1 positivo de un total de 60 muestras, que representa el 1.6% de *Listeria spp.* y 16 muestras positivas de 45, que representa el 35.6 % de *Listeria monocytogenes* en quesos artesanales de tres haciendas de la provincia de Pichincha. Como conclusión, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados con la prueba de Kruskal – Wallis, demuestran que en Pichincha se encuentra presente la bacteria en leche cruda, pero en cantidades no representativas, mientras que para *Listeria monocytogenes* existe significancia estadística en las muestras de quesos artesanales. (Chiluisa, et al., 2017)

Detección mediante RT-PCR en tiempo real del virus vacunal en cerdos inmunizados con la vacuna cubana contra la peste porcina clásica

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral infectocontagiosa, producida por un virus ARN del género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*. En la actualidad es una de las causas de pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. En su prevención se han utilizado vacunas vivas atenuadas, empleando la cepa China lapinizada. La Reacción en Cadena de la Polimerasa Reverso Transcriptasa (RT-PCR) ha sido uno de los métodos más sensibles aplicado en Medicina Veterinaria para la detección de virus ARN. En el caso del virus de la PPC es muy útil porque el ácido

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

nucleico se puede detectar desde muy temprano en la infección y en periodos más largos en aquellos animales que se recuperan. El objetivo de este estudio fue aplicar la técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección de la cepa China lapinizada de la vacuna cubana contra la PPC. Las tonsilas de los cerdos vacunados fueron el órgano más positivo en la detección del ARN del virus vacunal. Los resultados obtenidos evidenciaron una interferencia del virus vacunal en el diagnóstico, siendo el día 12 posvacunación en el que se obtiene una emisión umbral de fluorescencia más bajo. (Campos, et al., 2016).

7. Marco Metodológico

Los métodos de detección por serología para el diagnóstico de enfermedades infecciosas suelen requerir días o semanas para lograr el crecimiento exitoso de las bacterias. Por otra parte, las pruebas serológicas tradicionales presentan la desventaja de ser poco sensibles y/o específicas, pudiéndose tener falsos positivos causados por otros tipos de bacterias. La causa de esta reactividad cruzada es por la gran similitud de los lipopolisacáridos (LPS) presente en la superficie de estas bacterias. Mientras que resultados falsos negativos pueden ocurrir durante las primeras etapas de la enfermedad o en casos de infección focal. (Cevallos et al., 2008).

Debido a su sensibilidad y especificidad para detectar cantidades mínimas y específicas de organismos tanto en fluidos corporales provenientes de animales en la primera etapa de infección, así como muestras de sangre contaminada, la técnica de amplificación de ácidos nucleicos por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes, resulta cada vez una mayor alternativa para diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por microorganismo desagradables o de lento crecimiento, tales como los del género *Brucella* spp, que como ya mencionamos está presente en nuestra provincia y es de carácter zoonótico. (Cevallos et al., 2008).

Otra de la ventaja de esta técnica molecular es que permite un diagnóstico más rápido y eficaz y además permite identificar el agente patógeno causal específico de las enfermedades presentes en la zona de estudio. (Cevallos et al., 2008).

En base a lo anterior, en la presente investigación se planteó como objetivo implementar la técnica de la PCR en tiempo real en los laboratorios de la UPEC, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y zoonóticas en la provincia del Carchi.

El proyecto de investigación tiene un enfoque cuantitativo, ya que se tomarán datos numéricos para explicar las hipótesis.

Esta investigación está diseñada siguiendo una modalidad de campo y exploratoria, es de campo ya que no se modificará el área de estudio y exploratoria ya que se indagará la predisposición a contraer enfermedades infecciosas y zoonosis (Factores de riesgo); y un tipo de investigación explicativa, en la que se fundamentaran los resultados a través de la revisión de literatura tomando como base las ciencias básicas.

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI		SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN		

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

En este proyecto de investigación, la población a ser estudiada o zona de estudio es la provincia del Carchi ya que es una zona netamente ganadera, y es una zona endémica de enfermedades infecciosas, las mismas que además pueden ser zoonóticas, en lo que se refiere al número de muestras para el diagnóstico molecular se tomarán 300 muestras para el diagnóstico de cada enfermedad que se vaya a estudiar, así por ejemplo podemos nombrar dos enfermedades zoonóticas que existen en nuestra provincia, que son la brucelosis y la tuberculosis, en este caso se tomarían 300 muestras de bovinos de distintas fincas ganaderas para cada una de las enfermedades anteriormente mencionadas.

En cuanto a la aplicación de la prueba PCR en tiempo real se procederá de la siguiente manera. De los animales que sean muestreados, y una vez que se haya obtenido suero sanguíneo, se procederá a la extracción de ADN, para la obtención de ADN para el diagnóstico molecular, se utilizará la técnica de extracción de ADN “in house” para la obtención de ADN y esta se validará mediante el uso de Kit de extracción.

Hay que recalcar que el uso de este método permite diferenciar entre especies de los géneros de los agentes causales de la enfermedad que se esté estudiando así por ejemplo especies del género *Brucella*, e inclusive entre biovares dentro del género.

8. Impactos esperados

- Diagnóstico molecular por medio de PCR en tiempo real, de principales enfermedades infecciosas y zoonóticas de la provincia
- Insumos para definir estrategias de control de principales enfermedades infecciosas y zoonóticas de la provincia

9. Productos de investigación

- Artículos científicos, en revistas de alto impacto.
- El principal producto de investigación del proyecto es, la implementación y funcionamiento del Laboratorio de Biología Molecular con PCR en tiempo real, hecho que resulta innovador, ya que en la provincia no se cuenta con este tipo de infraestructura tecnológica para realizar diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas y al ser la provincia ganadera es de suma importancia contar con este tipo de tecnología para el campo de la investigación como para la comunidad que se verá beneficiada.

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

18. Cronograma

ACTIVIDADES	INICIO	FIN
Adecuación e Implantación del Laboratorio de Biología Molecular	01/8/2020	30/8/2020
Validación de protocolos de extracción A	1/9/2020	30/9/2020
Validación qPCR	1/9/2020	30/9/2020
Muestreo Diagnóstico	1/10/2020	30/5/2021
Publicaciones científicas	1/10/2020	07/2021

19. Recursos y presupuesto

Presupuesto para el desarrollo de la investigación

Actividad	Item Presupuestario	Fecha de ejecución	Descripción	Cantidad	Precio Un	Monto con IVA
Equipamiento laboratorio de Diagnóstico Molecular	840104	jul-20	Agitador de tubos tipo vortex	1	1000	1000
Equipamiento laboratorio de Diagnóstico Molecular	840104	jul-20	Micropipetas de volumen variable 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	8	300	2400
Equipamiento laboratorio de Diagnóstico Molecular	840104	jul-20	Centrifuga con refrigeración con rotor de tubos de 1,5 a 2 ml 24x, con pantalla táctil.	1	10000	10000
Equipamiento laboratorio de Diagnóstico Molecular	840104	jul-20	Micro-Volume Spectrophotometer Pro for DNA and RNA	1	13000	13000
Equipamiento laboratorio de Diagnóstico Molecular	840104	jul-20	CFX96 TOUCH™ REAL-TIME PCR DETECTION SYSTEM WITH STARTER PACKAGE	1	53500	53500
Levantamiento de información y muestreo	530826	jul-20	Kit toma de muestras virales	20	300	6000
	530802	jul-20	Overoles descartables talla M	50	12	600
	530802	jul-20	Overoles descartables talla L	50	12	600
	530802	jul-20	Guantes de nitrilo desechables talla M caja por 100	6	26	156

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

Extracción ARN y Diagnóstico Molecular (qPCR)	530802	jul-20	Guantes de nitrilo desechables talla L caja por 100	6	26	156
	530802	jul-20	Mascarillas quirúrgicas descartables caja por 50	6	30	180
	530826	jul-20	Kit de extracción de ARN	20	800	16000
	530826	jul-20	Kit RT qPCR	20	550	11000
	530826	jul-20	Puntas para micropipeta uso biología molecular 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	20	35	700
	530826	jul-20	Tubos plásticos 1,5 a 2 ml	8	25	200
	530819	jul-20	Alcohol antiséptico	50	8	400
	530819	jul-20	Amonio cuaternario	50	6	300
	530819	jul-20	Reactivos varios	25	100	2500
	840104	jul-20	Equipos de laboratorio	1	7200	7200
	840104	jul-20	Equipos de laboratorio	1	6200	6200
	840104	jul-20	Equipos de laboratorio	1	3200	3200
	840104	jul-20	Equipos de laboratorio	1	2800	2800
	840104	jul-20	Equipos de laboratorio	1	1200	1200
	840104	jul-20	Equipos de laboratorio	1	2000	2000
TOTAL AÑO 2020						141292
						0
Publicación de Artículos científicos.	530204	jul-21	Pago Publicación de Artículo científico.	1	2000	2000
TOTAL AÑO 2021						2000

20. Bibliografía

Aguilera P, Ruiz M, Rocha M, Pineda B, Cháñez M. (2016). PCR en tiempo real. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>

Perera C, Acevedo A. (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000300007&lng=es&nrm=iso

Nicole J, (2020). Detección del virus de la COVID-19 mediante la RT-PCR en tiempo real. Recuperado de: <https://www.iaea.org/es/newscenter/news/pcr-en-tiempo-real-covid-19>

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

Fondevila N, Compaireda D, Maradeib E Duffy S. (2014). Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213032482004.pdf>

Valdez E, Pacheco I, Vergara W, Pinto J, Fernández F, Guzmán F, Navarro, Rivera H. (2018). Identificación de bovinos persistentemente infectados y genotipo del virus de la diarrea viral en bovinos de Anta, Cusco, Perú. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172018000400050&script=sci_arttext

Costa J, (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)

Yáñez E, Máttar S, Durango A (2008). Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n4/v12n4a03.pdf>

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

Chiluisa V, Utreras M, Cabrera A, Valladares P. (2017). Detección de Listeria spp. y Listeria monocytogenes en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6182147>

Campos T, Coroas L, Martínez L. (2016). Detección mediante RT-PCR en tiempo real del virus vacunal en cerdos inmunizados con la vacuna cubana contra la peste porcina clásica. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=66905>

Organización de las Naciones Unidas, ONU. Objetivos de Desarrollo Sostenible. Recuperado de: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/>

Cevallos O, Emerick M, Cedeño V, Carranza M, Canchignia H, Saucedo S. (2008). Implementación de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) Para el Diagnóstico de la Brucelosis de Bovinos en el Ecuador. Recuperado de: http://uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_articulo6.pdf

21. Certificaciones

- Oficio de Aprobación del Decano de la Facultad.
- Oficio de Compromiso del Director y los miembros.
- Informe del porcentaje de similitud en el sistema antiplagio del proyecto de

	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI	SGC-UPEC
	TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA - CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	

Código UPEC-P5-S2.1-FT01; Versión: 01; 08 de Junio del 2018

investigación.

- d) En el caso de que el proyecto cuente con investigadores externos deberá anexarse la copia de sus currículos, así como los convenios marco, convenio específico o carta de intención.

Atentamente;



Dr. Martin Campos
DIRECTOR PROYECTO