

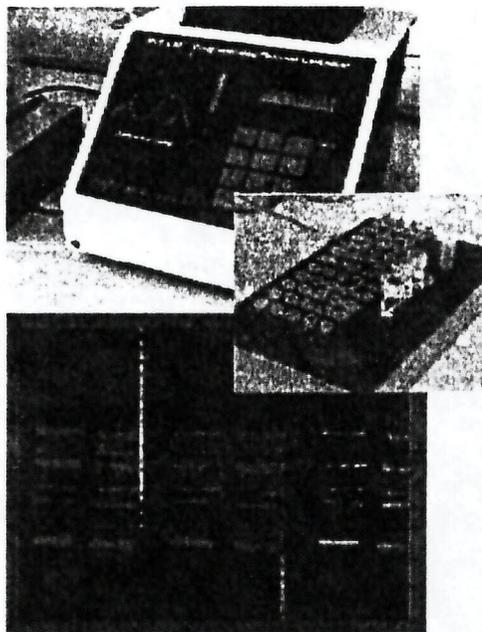


033

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

Handwritten signature

PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2001



FORMULARIO PARA LA PRESENTACIÓN
DE PROPUESTAS

JUNIO 2001



Handwritten signature



CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2001

FORMULARIO DE PRESENTACIÓN DE PROPUESTAS

La propuesta de proyecto deberá presentarse en este formulario, en tres ejemplares (un original y dos copias) y en disquet. Aquellos postulantes que no cuenten con medios computacionales, pueden transcribir el contenido del proyecto directamente a este cuadernillo.

Antes de iniciar la preparación del proyecto y el llenado del formulario se solicita leer con detención todos los puntos del "Instructivo para la Presentación de Propuestas", a fin de evitar errores que dificultarán posteriormente la evaluación de la propuesta por parte de la Fundación, o que puedan ser motivo de rechazo de la propuesta en las etapas de admisión o evaluación.

El formulario está dividido en secciones, que incluyen cierto espacio para la presentación de la información. Si el espacio en una sección determinada no es suficiente, se podrán agregar hojas adicionales, identificando la sección a la cual pertenecen. Podrá adjuntarse además cualquier otro tipo de información adicional o aclaratoria que se considere importante para la adecuada descripción de la propuesta.





FOLIO DE BASES 033

CÓDIGO (uso interno)

BIOT-01-8-024

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

Desarrollo, Optimización e Implementación de un método de diagnóstico molecular para la detección del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) en plantales porcinos.

Línea Temática: Agricultura y ganadería

Rubro: Diagnóstico

Región(es) de Ejecución: VI, VIII y Metropolitana

Fecha de Inicio: 20/01/2002

DURACIÓN: 30 meses

Fecha de Término: 20/07/2004

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : Laboratorio de Diagnóstico GAM S.A. o Diagnotec S.A.
Dirección : Avenida 11 de Septiembre 1881 Oficina 1202. Providencia. Santiago
RUT :
Teléfono : 3769370 Fax: 3769371

AGENTES ASOCIADOS:

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: Geraldine Mlynarz Zylberberg
Cargo en el agente postulante: Gerente Desarrollo
RUT: Firma:
Dirección: Avda. 11 de Septiembre 1881 of. 1202 Ciudad y Región: Santiago, XIII
Fono: 3769370 Fax y e-mail: 3769371, gmlynarz@diagnotec.cl
Cuenta Bancaria (tipo, N°, banco):

COSTO TOTAL DEL PROYECTO (Valores Reajustados) : \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO (Valores Reajustados) : \$ 61,0 %

APORTE DE CONTRAPARTE (Valores Reajustados) : \$ 39,0 %





2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

2.1. Equipo de coordinación del proyecto (presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO

NOMBRE	RUT	FIRMA
GERALDINE MLYNARZ ZYLBERBERG		
AGENTE	DEDICACIÓN PROYECTO (%/año)	
LABORATORIO DE DIAGNOSTICO GAM LTDA	30 %/año	
CARGO ACTUAL	CASILLA	
GERENTE DE DESARROLLO	-----	
DIRECCIÓN	CIUDAD	
AV. 11 DE SEPTIEMBRE 1881 OF. 1202 PROVIDENCIA	SANTIAGO	
FONO	FAX	E-MAIL
3769370	3769371	adm@diagnotec.cl

COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

NOMBRE		FIRMA
Ana María Sandino García		
AGENTE	DEDICACIÓN PROYECTO %/AÑO	
LABORATORIO DE DIAGNOSTICO GAM S.A.	20%/año	
CARGO ACTUAL	CASILLA	
DIRECTOR CIENTÍFICO	-----	
DIRECCIÓN	CIUDAD	
AV. 11 DE SEPTIEMBRE 1881 OF. 1202 PROVIDENCIA	SANTIAGO	
FONO	FAX	E-MAIL
3769370	3769371	adm@diagnotec.cl



2.2 . Equipo Técnico del Proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
Geraldine Mlynarz		Ingeniero agrónoma	Microbiología Biología Molecular	Coordinador del proyecto	30
Ana María Sandino García		Bioquímico, PhD	Biología Molecular Virología	Coordinador alterno	20
Andrea Verónica Hueche Kähs		Bioquímico	Diagnóstico molecular	Investigación y desarrollo del método de diagnóstico	80
Claudio Antonio Garrido Olave			Técnico de Laboratorio	Procesamiento de muestras y Electroforesis	20
Violeta del Carmen Alvear Ceballo			Auxiliar de Laboratorio	Esterilización y preparación del material de laboratorio.	30
María Teresa Castillo		Microbiologa de alimentos	Cultivo celular y biología molecular	Preparación de células y propagación de virus	100
Cristian Sanchez		Técnico en administración de empresas	Finanzas	Administrador	30

3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

(Completar esta sección al finalizar la formulación del Proyecto)

El sector porcino se ha visto enfrentado a una gran competitividad tanto nacional como internacional, por lo que los productores han realizado grandes esfuerzos por mejorar sus parámetros productivos, optimizándolos considerablemente. Sin embargo, la presencia de enfermedades los afecta seriamente mermando los resultados esperados.

La industria porcina se ha caracterizado por mantener un estándar sanitario privilegiado a nivel nacional; sin embargo a pesar de los resguardos, el año pasado fue notificada oficialmente la presencia del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) enfermedad de carácter exótico que causa grandes estragos en otros países. Dado la reciente introducción del virus, el país no cuenta con técnicas de diagnóstico rutinarias necesarias para realizar una detección precoz, específica y rápida de este patógeno. Sin embargo el SAG pretende realizar un plan de erradicación del virus PRRS que implica el uso de técnicas de diagnóstico molecular. Por esta razón, el objetivo de este proyecto es implementar, optimizar y desarrollar la técnica de Transcripción Reversa (RT) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación específica de PRRSV en plántales porcinos chilenos.

Esta técnica permite diagnosticar el patógeno mediante la amplificación de su genoma y se caracteriza por ser altamente específica, sensible y rápida. El principal inconveniente de esta técnica, dada su alta sensibilidad, es la contaminación entre muestras. Por esta razón, se pretende también adaptar la técnica desarrollada a sistemas automatizados como es el Light Cycler, los cuales no han sido utilizados aún para este virus.

Hasta la fecha, en Chile sólo se dispone de un ELISA para la detección de PRRSV, el cual presenta una serie de limitaciones que impiden el diagnóstico certero del virus. Es por esto que en otras partes del mundo cuentan también con la técnica de RT-PCR como un complemento fundamental para el diagnóstico de este virus. Para implementar esta técnica en el país, primero se desarrollará un método de diagnóstico utilizando material no infeccioso como es el ácido nucleico extraído de cepas controles de PRRSV y se obtendrá el mejor protocolo de PCR tradicional. Posteriormente se optimizará para muestras provenientes tanto de cerdos faenados como vivos. Una vez montada la técnica de PCR tradicional se adaptarán los protocolos aprobados al equipo de PCR automatizado Light Cycler.

La técnica de RT-PCR se comparará con la técnica de ELISA, con el fin de comprobar las ventajas y desventajas de ambas y de determinar el momento adecuado de la infección en que éstas se deben aplicar, ya sea por separado o juntas. Para esto, se propone implementar la técnica de ELISA también en este proyecto.

El resultado final es que los productores cuenten con las herramientas de diagnóstico adecuadas para la detección del virus PRRS en forma específica, sensible y rápida, en todas las etapas del sistema productivo, teniendo con esto la posibilidad de erradicación del virus. Además, podrán obtener una visión real del impacto de esta enfermedad en sus plántales. De esta forma podrán optimizar las medidas de control hasta ahora utilizadas y en un futuro contarán con una técnica que les permitirá mantenerse libres de esta enfermedad, lo que está dentro de los planes de erradicación de este patógeno proyectado por el SAG.

El costo total del proyecto es de \$ 130.926.132, de los cuales \$ 51.089.351 serán aportados por Diagnotec y \$ 79.836.782 serán financiados por FIA.



4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

Dentro de la evolución del sector pecuario nacional, el sector porcino ha demostrado en los últimos 25 años un crecimiento sostenido de la producción, lo que se ha manifestado en un marcado incremento del beneficio de animales y de la oferta de carne en vara al mercado.

Las razones que explican este crecimiento se deben a que Chile ha tenido que lograr una alta eficiencia técnico-productiva, para poder asumir los niveles de competitividad, tanto frente a los mercados de alimentos nacionales como a los externos. Una de las características estratégicas del sector porcino nacional consistió en orientarse fuertemente hacia sistemas de alta eficiencia, basados en el confinamiento de la producción, tendiendo a independizar la producción de las variables ambientales (en especial de las climáticas, de costo y calidad de la tierra) y transformando una explotación agrícola tradicional en una empresa pecuaria relativamente cerrada. Estas medidas han hecho que el sector porcino tienda a aumentar los planteles comerciales, con un menor número de unidades comerciales y que disminuya la presencia del cerdo de campo en la oferta de carne en el mercado.

El aumento de la oferta que ha presentado el sector porcino ha significado que hoy en día sea una de las principales fuentes abastecedoras de carne. En 1990 el consumo per cápita de carne porcina fue de 7,74 Kg y actualmente es de 16 Kg aproximadamente. Este aumento del consumo se explicaría además, por los menores precios en relación con los de carne de bovino y por la mejor calidad del producto entre otros factores.

Los productores nacionales han realizado grandes esfuerzos por mejorar sus niveles productivos, sin embargo, estos parámetros se ven seriamente afectados por la presencia de enfermedades. Si bien es cierto que ha sido una necesidad del sector el confinamiento de los cerdos, el mayor hacinamiento ha agudizado algunos problemas sanitarios como los respiratorios, los cuales hoy en día representan los problemas infecciosos más graves que afectan a todos los productores de cerdos.

La industria nacional se ha caracterizado por tener un comportamiento altamente dinámico, ya que se ha visto enfrentada a crear nuevas estrategias competitivas debido a la gran globalización de mercados que se ha producido en los últimos años. Dentro de estas estrategias ha estado mantener y mejorar la condición sanitaria, ambiental, genética y productiva. Por esta razón después de grandes esfuerzos, en el año 1998 Chile fue declarado país libre de Peste Porcina Clásica, lo que ha abierto grandes posibilidades de colocar sus productos en mercados tan importantes como el asiático y sudamericano (Díaz, 1999).

A comienzos de 1999 el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) junto al sector, comenzaron a desarrollar un trabajo de implementación de Planteles de Cerdos Bajo Sistema de Control Oficial (PABCO). El objetivo es que todos los productores de cerdos participen del sistema, con el fin de asegurar la calidad final del producto, lo cual involucra a toda la cadena de producción. Esto demuestra la gran preocupación del sector por mantener y mejorar la sanidad, ya que se ha entendido que actualmente la competitividad puede ser seriamente afectada por la calidad sanitaria de los animales (Rojas, 1999). Sin embargo, a pesar de todas estas preocupaciones en la década de los noventa se introdujo al país el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), un virus que ha producido grandes pérdidas en planteles de cerdos norteamericanos y europeo.



Aparte de los graves daños económicos que provoca la enfermedad en sí, uno de los principales inconvenientes que se presenta hoy en día es su diagnóstico certero, por dos motivos. Por un lado, porque se utilizan principalmente técnicas inmunológicas para el diagnóstico, las que están dirigidas fundamentalmente a la determinación del título de anticuerpos contra el virus lo que no indica el estado actual del cerdo en cuanto a viremia sino solamente si alguna vez estuvo expuesto al patógeno. Por otro lado, la detección del virus, que se puede realizar mediante RT-PCR no resulta tan fácil a partir de cerdos vivos, ya que la viremia parte después de 5 días post infección aproximadamente y tiene una duración de solamente 8 semanas. Por este motivo, en Norteamérica y Europa se utilizan tanto los métodos inmunológicos como el RT-PCR para realizar un diagnóstico certero y para realizar los estudios epidemiológicos de este virus.

Lamentablemente en Chile el avance tecnológico no ha ocurrido a la misma velocidad como se ha realizado en los países desarrollados y esto se ve claramente reflejado al diagnosticar enfermedades, ya que muchas veces no es posible distinguir la presencia de una enfermedad determinada o no existe la tecnología para detectar su agente causal.

Los métodos de diagnóstico deben tener cualidades fundamentales como poseer una máxima especificidad, sensibilidad y rapidez. Con el aumento de la especificidad se evitan las reacciones cruzadas y por ende los falsos positivos; y con el aumento de la sensibilidad se intenta detectar la mínima cantidad de patógeno existente con lo que se evitan los falsos negativos. La rapidez con que se entreguen los resultados es fundamental para una oportuna decisión en cuanto a las líneas de acción a seguir.

En consecuencia pensamos que nuestro país necesariamente debe contar con tecnología de punta para ser competitivos tanto a nivel nacional como mundial. Para los productores porcinos el contar con técnicas que permitan hacer un diagnóstico precoz de PRRSV sería un gran apoyo para intentar erradicar el agente viral. Al aplicar el PCR podrían saber con seguridad cual es la situación real del virus PRRS en sus planteles. De esta forma podrán saber el impacto que este virus les provoca, determinar el origen de la infección y cuales son los individuos más susceptibles. Con estos datos podrán tener un conocimiento acabado de la enfermedad, estableciendo las mejores medidas de control en los momentos oportunos y en un futuro crear criaderos libres de PRRSV, con el consiguiente beneficio económico. De este modo, además podrían llevarse con éxito los planes de erradicación de PRRSV que ha propuesto el SAG en el país, a través del proyecto denominado: " Programa Nacional de Diagnóstico, Control, Eliminación y Erradicación del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS)", el cual fue adjudicado a la Asociación de Productores de Cerdos (ASPROCER) en el 2° Concurso Nacional del Fondo de Mejoramiento del Patrimonio Sanitario del FONDOSAG.

Por este motivo, proponemos la implementación y desarrollo de la técnica de RT-PCR para la identificación específica del virus PRRS, a partir de muestras naturales y luego hacer extensiva la detección para todos los productores porcinos



5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

A pesar de la gran preocupación que han mostrado los productores de cerdos en Chile por mantener un excelente estado sanitario en sus planteles, hay un profundo desconocimiento de la epidemiología del virus PRRS, tanto debido a su reciente introducción, como a la falta de herramientas para diagnosticarlo. A nivel mundial esta enfermedad provoca grandes pérdidas económicas por lo que es urgente controlar de modo anticipado al patógeno. Los productores de cerdos chilenos sospechaban de la presencia de la enfermedad desde la década de los noventa, sin embargo recién en el año 2000 el Ministerio de Agricultura mediante el decreto exento 191 declara como enfermedad infecto-contagiosa de denuncia obligatoria al síndrome disgenésico respiratorio porcino o PRRS (Diario oficial octubre 2000).

Estudios internacionales estiman que la enfermedad en brotes agudos causa pérdidas a la industria porcina por valores entre 250 dólares y 500 dólares por cerda. Sin considerar las restricciones de exportación que tiene la carne de cerdo contaminada con el virus PRRS. (Polson et al 1992)

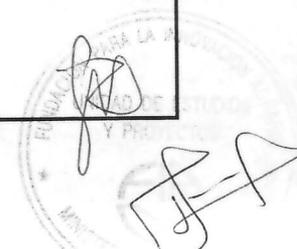
El síndrome reproductivo y respiratorio fue descrito por primera vez en Norte América en el año 1987 con el nombre de Enfermedad Porcina Misteriosa (mystery swine disease) (Hill 1990). Pero el agente etiológico se aisló por primera vez en Europa en el año 1990 (Weensvoort 1991) designándose con el nombre de virus Lelystad y posteriormente en el año 1992 se aisló en EEUU y se llamó virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino PRRS (Collins JE 1992).

El PRRSV es un virus miembro de la familia Arteriviridae. Esta familia la constituyen virus pequeños, con manto, cuyo genoma es RNA de hebra simple positiva. Pertenecen a esta familia además de virus PRRS los virus EAV o virus de la arteritis equina, LDV o virus elevador de la lactato deshidrogenasa y SHFV o virus de la fiebre hemorrágica del simio. El virion de PRRSV posee un diámetro de 50 a 60nM con una nucleocápside isométrica central de aproximadamente 30 a 35 nM en diámetro. La molécula de RNA que constituye su genoma se encuentra poliadenilada y posee un largo de aproximadamente 15kb. Su genoma posee 8 marcos abiertos de lectura (ORF). Los ORF 1a y 1b codifican para la replicasa viral y los ORF restantes codifican para proteínas estructurales. (Eric Snijer 1998).

En los cerdos susceptibles este produce diversos signos clínicos dependiendo de la edad y sexo del animal. Esta enfermedad en cerditos en amamantamiento, destete y a termino puede provocar distrés respiratorio acompañado de fiebre, hiperapnea, cianosis, letargia y altas tasas de mortalidad. En puercas y cerdas jóvenes puede provocar anorexia y fiebre la cual dura varios días. Además les provoca bajas tasas de concepción, abortos de fase tardía y nacimiento de cerditos débiles y muertos(Weensvoort 1991).

Esta enfermedad es transmitida principalmente por contacto, exposición a aerosol o vía transplacentaria Weensvoort 1991. Un cerdo infectado disemina el virus a través de las secreciones nasales, orina, semen y heces. Yoon 1993

Es por esta razón que las principales vías de ingreso de esta enfermedad a planteles libres es a través de la introducción de cerdos provenientes de planteles infectados ó por inseminación artificial con semen proveniente de cerdos infectados (Albina 1997) (Gradil 1996) (Yaeger 1993). Sin embargo otras rutas de ingreso se han descrito tales como transporte aéreo del virus de un plantel a otro.



El periodo de incubación puede variar de 4 a 5 días a 6 meses dependiendo de la edad y sexo del animal. Sin embargo un plantel que ha introducido un animal infectado generalmente tendrá un periodo ventana más largo en el cual no se manifestarán signos clínicos (Paton and Done 1992).

El gran impacto económico que provoca esta enfermedad se ve agravado al carecer de métodos de detección que permitan hacer un diagnóstico rápido, seguro y antes que aparezcan los signos clínicos.

Para el diagnóstico de PRRS es necesario diferenciar si el predio ha visto afectado su rendimiento por efecto del virus o no. Un diagnóstico definitivo se basará en el análisis tanto del rendimiento en reproducción como en producción además de los exámenes de laboratorio.

El diagnóstico basado en sólo en signos clínicos no es suficiente pues no existen signos patognomónicos para el síndrome y además las infecciones secundarias son frecuentes. (Zimmerman 1997) Sin embargo la observación de problemas reproductivos, aumento de los cerditos nacidos muertos o débiles y cianosis son signos clínicos que deben alertar para el estudio de la presencia del virus.

En laboratorio es posible realizar varias pruebas serológicas para determinar si el plantel ha sido expuesto al virus estos incluyen: Ensayo de la inmuno peroxidasa (IPMA), primer ensayo en desarrollarse que detecta anticuerpos para el virus PRRS (Weensvoort 1991). Test de Elisa indirecto más simple, rápido y sensible que IPMA. Este se encuentra disponible como kit comercial producido por IDEXX inc Albina et al 1992. Test de ELISA de bloqueo, el cual supera los problemas de alto ruido de fondo de los métodos anteriores. Es también más sensible que IPMA Houben 1995. Test de fluorescencia de anticuerpo indirecta (IFA), este test es muy utilizado debido a su alta sensibilidad ya que permite detectar anticuerpos de manera temprana en la infección, además es rápida y relativamente barata. Esta técnica es también más sensible que IPMA Yoon 1992. La serología es actualmente ampliamente utilizada en el diagnóstico, seguimiento y control de la enfermedad. La mayor limitación que estos métodos presentan es la amplia variación antigénica del virus PRRS lo que significa que la sensibilidad de cualquier test para una cepa específica puede variar. Se aconseja que hasta tener disponibles test más sensibles es mejor utilizar test desarrollados en la región de procedencia de los cerdos a ser estudiados.

Al interpretar los exámenes serológicos es importante considerar que la presencia de anticuerpos no esta directamente relacionada con la protección de la infección debido a que cerdos seropositivos pueden presentar viremia. Por lo tanto, el testeo serológico es de poco valor como indicador de inmunidad. De igual manera un resultado serológico positivo no indica si un cerdo es o no infeccioso. Además se ha visto que una porción significativa del predio puede mantenerse seronegativo durante un brote. Por otro lado los títulos de anticuerpos de algunos cerdos seropositivos se han visto que desaparecen a los 12 meses Paton DJ, Drew TW. (1995). No esta claro si esto representa una diferencia significativa en el estatus inmune o meramente insensibilidad del test serológico. Por lo tanto un test serológico negativo no implica que el cerdo no fuese previamente infectado ni tampoco se puede asumir que el cerdo no esté infectado. Probablemente las diferencias en las interpretaciones de los resultados de la serología se deban a que el virus PRRS puede producir persistencia, lo que implica una muy baja producción de virus en el tiempo impidiendo su detección (Wills 1997).

En cuanto a los anticuerpos maternos estos no previenen la viremia, pero son protectores en el sentido que la enfermedad clínica generalmente solo se manifiesta cuando los títulos han decaído. (Albina 1994).



Otro método de diagnóstico para PRRSV de laboratorio es el aislamiento viral. Esta técnica es muy valiosa para el diagnóstico. Desafortunadamente la complejidad del aislamiento viral lo limita a laboratorios especializados y además es una técnica lenta. Las muestras útiles son suero y tejidos pulmonar, amígdalas, nódulos linfoides bronquiales y lavados bronquioalveolares. Las células utilizadas en la propagación del virus pueden ser macrófagos alveolares porcinos (PAM) cosechados de cerdos no infectados. También se han utilizado líneas celulares tales como MA-104, MARC-145 y CL2621. Se ha observado ha determinado que los aislados virales provenientes de EEUU son capaces de propagarse tanto en PAM como en líneas celulares, pero los aislados europeos solo se han obtenido por propagación en PAM. (Bautista 1993) (Kim et al 1993).

Para demostrar la presencia de antígeno viral en tejido fresco y fijado se desarrolló la técnica de inmunofluorescencia (IF). El virus se ha encontrado en el citoplasma de pneumocitos y macrófagos obtenidos de cerdos afectados. Posee la ventaja que es más rápida que las técnicas de aislamiento viral. Se han desarrollado anticuerpos más específicos para permitir la diferenciación de distintas cepas. Con este mismo fin se ha desarrollado la técnica de inmunoperoxidasa que mantiene las características de IF pero no requiere de un microscopio fluorescente (Halbur 1994). Sin embargo ambas técnicas presentan la desventaja que la demostración de la presencia de bajos niveles de antígenos es muy subjetiva

Con el fin de solucionar el problema de sensibilidad y/o especificidad que presentan las pruebas directas e indirectas se comenzó con el desarrollo de distintos sistemas de detección de PRRSV basados en la técnica de RT-PCR.

Desde el año 1994 a la fecha se han realizado esfuerzos en el desarrollo de distintos RT-PCR para la detección de este virus (Suaréz 1994). Desde un comienzo se implementó la técnica para la detección de PRRSV tanto desde aislados virales como de muestras clínicas (suero, sangre y tejido). Los primeros partidores se diseñaron en base a la secuencia del virus Lelystad (cepa europea). La región del genoma utilizado correspondió al ORF7 el cual codifica para la nucleocápside viral. Posteriormente la técnica se implementó también para el diagnóstico a partir de semen, para lo cual fue necesario estudiar que fracción seminal era la más apropiada así como el método de extracción correcto (Christopher-Hennings et al 1995). En cuanto a los partidores actualmente se han desarrollado partidores para distintas regiones del genoma de PRRS, según el propósito para el cual son diseñados. Partidores para la región ORF1b se diseñaron para la detección de ambas cepas EEUU y Europeas. El segmento del genoma obtenido de esta manera se reamplificó con dos set de partidores, uno para cepas EEUU y otra para cepas Europeas, lo que permitió discriminar entre ambas cepas. Este PCR se conoce como PCR múltiple para tipificación del virus PRRS. (Gilbert 1997). Otra región del genoma de PRRSV utilizado para el diseño de partidores es el ORF 5 que codifica para una glicoproteína del virión. La mayor variabilidad de esta región del genoma ha permitido mediante la técnica de PCR realizar estudios de variación genética geográfica y temporal. (Goldberg 2000)

Para la implementación de esta poderosa técnica diagnóstica en nuestro país será necesario analizar las diferentes alternativas de partidores disponibles. Esto es importante debido a la alta tasa de variación genética que experimenta este virus. Será necesario por lo tanto determinar que cepas se encuentran en el país y estudiar sus secuencias determinando de esta manera su grado de homología con cepas de otros países para de esta manera poder seleccionar los partidores correctos para la realidad nacional.

Todo lo anteriormente descrito indica que es urgente comenzar con los estudios a nivel nacional de modo de optimizar y automatizar los protocolos desarrollados y así determinar el método más efectivo de ser aplicado a nivel comercial

Bibliografía

Albina E, Leforban Y, Baron T, Plana Duran JP, Vannier P. (1992) An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech Vet* 23(2):167-76

Albina E, Madec F, Cariolet R, Torrison J (1994) Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec.* May 28;134(22):567-73.

Albina E. 1997 Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* Apr;55(1-4):309-16

Bautista E.M., Goyal S.M. Yoon I.J. Joo H. S. Collins J.E. (1993) Comparison of porcine alveolar macrophages and CL2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), *J. Vet. Diagn. Invest.* 5:163-165.

Christopher-Hennings J., Nelson E., Nelson J., Hines R., Swenson S., Hill H., Zimmerman J., Katz J., Yaeger M., Chase C. Y Benfiel D. (1995) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* July: 1730-1734.

Collins JE et al (1992) Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolated ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet Diagn. Invest.* 4:117-126.

Diario Oficial (2000) nº 36808 correspondiente al mes de Octubre pag 39.

Eric J. Snijder and Janneke J.M. Meulenberg (1998) The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*,79:961-979.

Gilbert S.A., Larochelle R., Magar R., Cho H.J. y Deregt. (1997) Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR Assay. *Journal of Clinical microbiology* Jan:264-267.

Goldberg T., Hahn E., Weigel R. Y Scherba G. (2000) Genetic, geografic and temporal variation of porcine reproductive an respiratory syndrome virus in Illinois. *Journal of General Virology* 81:171-179.

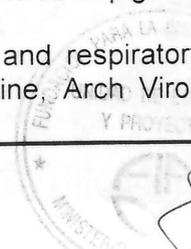
Gradil C, Dubuc C, Eaglesome MD. 1996 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *Vet Rec* May 25;138(21):521-2

Halbur PG, Andrews JJ, Huffman EL, Paul PS, Meng XJ, Niyo Y. (1994) Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J Vet Diagn Invest.* 1994 Apr;6(2):254-7.

Hill, H. (1990) Overview and history of mystery swine disease (Swine Infertility Respiratory Syndrome) . In "Proceedings of the mystery swine disease committe Meeting", October 6, 1990, Denver, CO; and Livestock Conservation Institute, October 29-31, 1990, Madison, WI.

Houben S, Callebaut P, Pensaert MB (1995) Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J Virol. Methos* Jan; 51 (1):125-8.

Kim J.B. et al (1993) Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogenous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol.* 133:477-483.



Meredith M.J. (1993). - Porcine reproductive and respiratory syndrome. 7th edition pp62. Pig Disease Information Centre. University of Cambridge.

Paton , D.J. & Done, S.H. (1992). -Porcine reproductive and respiratory syndrome ('blue-ear disease'). Veterinary Annual, 33: 278-292.

Paton DJ, Drew TW. (1995) Serological monitoring of PRRS transmission: a case study Vet Rec Mar 25;136(12):297-8

Polson,D.D., Marsh, W.E. Dial, G.D. y Christianson, W.T. (1992) Financial impact of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). Proceedings of 12th Int. Pig Vet. So. Congr. 1:132.

Suarez P., Zardoya R., Prieto C., Solana A., Tabarés E., Bautista J.M. y Castro .M. (1994) Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) Arch Virol 135:89-99.

Weensvoort G.,Terpstra C., Pol JMA Ter Laak EA., Bloemraad M., de Kluyver EP., et al. (1991) Mystery swine disease in the Neatherlands: The isolation of Lelystad virus. Vet Q. 13:121-130.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet Microbiol Apr;55(1-4):231-40.

Yaeger MJ, Prieve T, Collins J, et al. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. Swine Health Prod. 1993;1(5):7-9.

Yoon I.J., Joo H.S., Christianson W.T., Kim H.S., Collins J.E., Morrison R.B. & Dial G.D. (1992). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest., 4, 144-147.

Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, Morrison RB, Dial GD: 1993, Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Swine-Health-Prod. 1:5-8.

Zimmerman JJ., Yoon KJ., Wills RW., Swenson SL. (1997) General overview of PRRSV: a perspective from the United States. Vet Microbiol. 1997 Apr;55(1-4):187-96. Review.

6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

Actualmente en Chile no existe ningún laboratorio que realice el diagnóstico de este patógeno mediante la técnica de PCR. DIAGNOTEC gracias a la experiencia que posee en la detección molecular de patógenos (ver sección 19) tiene un gran interés en poder contribuir con esta innovación al país, ya que la aplicación de esta técnica sería una herramienta fundamental para los productores porcinos.

El sector porcino nacional está constituido por dos grandes categorías de productores: una es la de los grandes productores, compuesto por sólo seis empresas que constituyen el 50% del sector, liderando Super Cerdo con 50.000 hembras, y las cinco restantes con planteles entre los 2.500 y 10.000 hembras. El 49% restante está compuesto por alrededor de 90 empresas medianas y pequeñas que van desde planteles compuestos por 40 a 2.500 madres. Cabe destacar que en los últimos años ha ocurrido un aumento de los parámetros productivos, tanto en respuesta a las inversiones realizadas en tecnología por los grandes productores como por la incorporación de la Inseminación Artificial en forma generalizada. Si bien los parámetros han mejorado desde pequeños a grandes productores, aún se está lejos de alcanzar los parámetros potenciales. Según el diagnóstico por ELISA realizado por el SAG el año pasado se encontraron de un total de 135.000 madres, aproximadamente 28.000 cerdas reproductoras seropositivas. Esta situación implicaría que en dos años más se verían afectados los parámetros de producción, observándose una disminución constante de éstos en un 3% anual, si no se toman las medidas adecuadas. Por ello es fundamental desarrollar planes sanitarios para el control, eliminación y vigilancia de la enfermedad, de modo de poder erradicarla del país. Para lograr este objetivo se requieren herramientas tecnológicas inexistente hasta ahora en nuestro país que permitan detectar precozmente a los patógenos que provocan daños a la industria del cerdo, lo que beneficiará tanto a los grandes, medianos y pequeños productores, ya que les permitirá realizar planes de monitoreo y detección, de modo de llevar un programa de control adecuado y así poder determinar los focos de infección, las categorías de animales más susceptibles a la enfermedad y la prevalencia que ésta presenta. Esto les ayudaría a adoptar las medidas de control pertinentes, ya sea basadas en estrategias de control o medidas de reemplazo de modo de conseguir planteles libres de PRSSV. Así podrán acercarse a los parámetros productivos esperados y de ese modo poder producir a costos convenientes, y permitir una mayor competitividad de los pequeños y medianos productores, mejorando la rentabilidad general del sector. Adicionalmente, la posibilidad de alcanzar la meta impuesta por el SAG de erradicar este virus es un desafío enorme pero certificar cerdos libres de PRSSV abre paso a la comercialización de cerdos con el consiguiente valor agregado, motivando la aparición de nuevos negocios en el sector.





7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

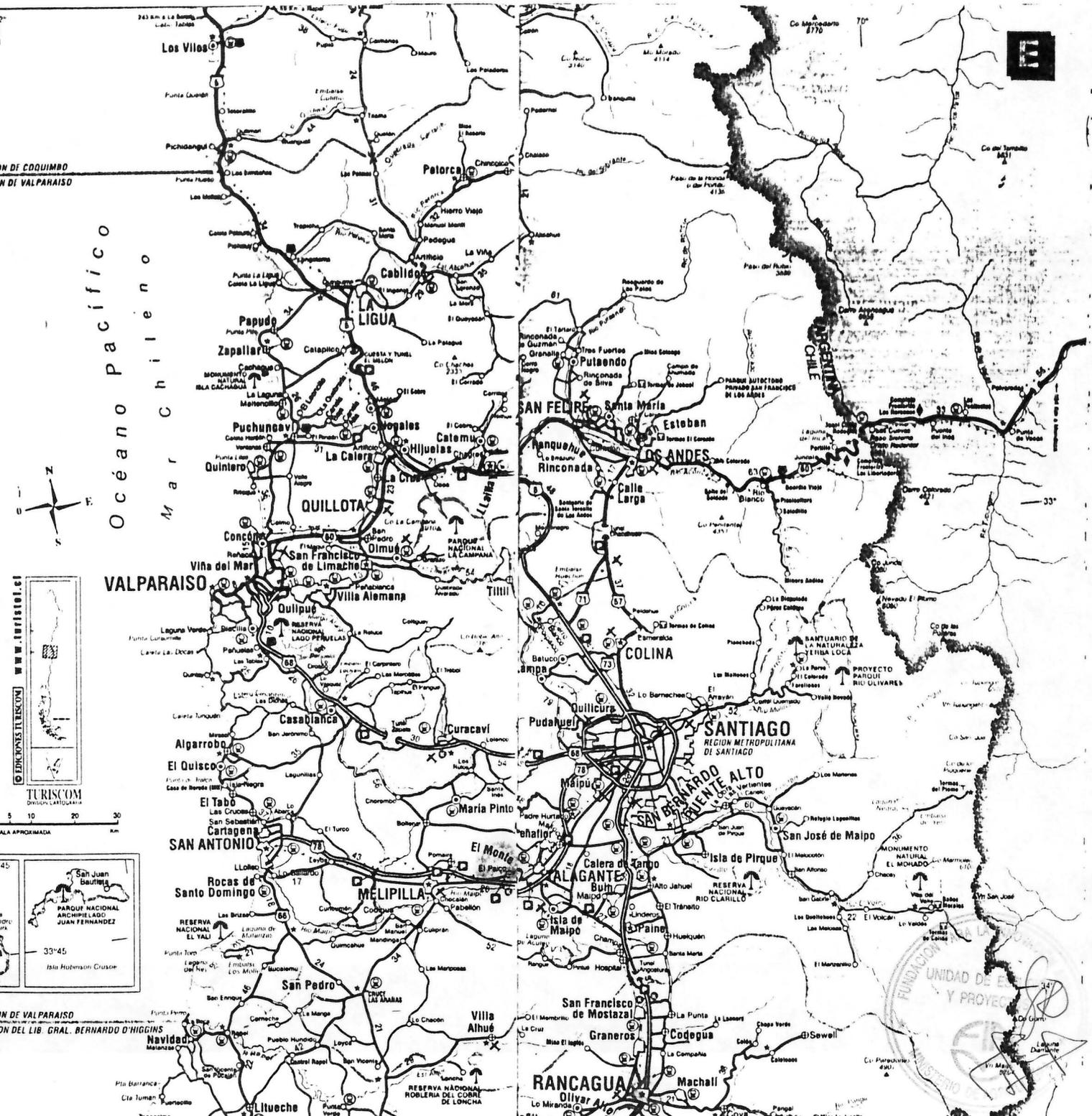
(Anexar además un plano o mapa de la ubicación del proyecto)

La obtención de muestras para realizar el proyecto se realizará en la zona centro sur del país, lugar donde se concentran los productores porcinos. Las regiones comprendidas serán la Metropolitana, VI, VIII, IX y X. No se especifica la localización de los productores en mas detalle debido a que se mantendrá en absoluta confidencialidad su identificación hasta que se obtengan la autorización pertinente.

Los resultados serán analizados en DIAGNOTEC, laboratorio ubicado en Santiago en la comuna de Providencia.

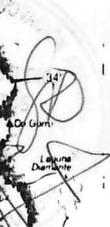
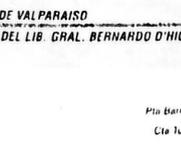
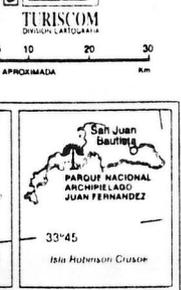
Las escalas de los mapas incluidos están una escala de escala aproximada de 1:1.000.000.

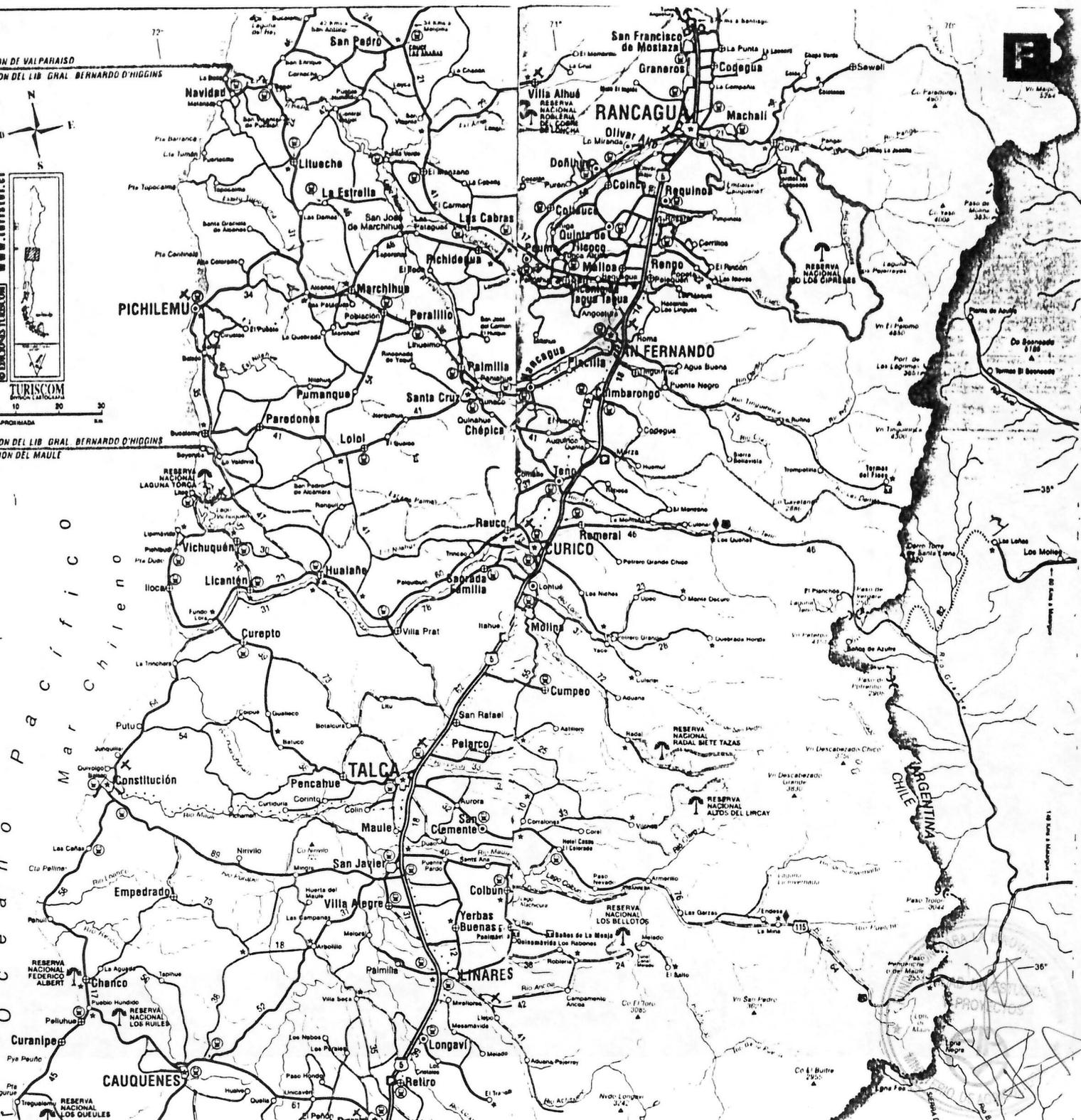




E

Océano Pacífico
Mar Chileno





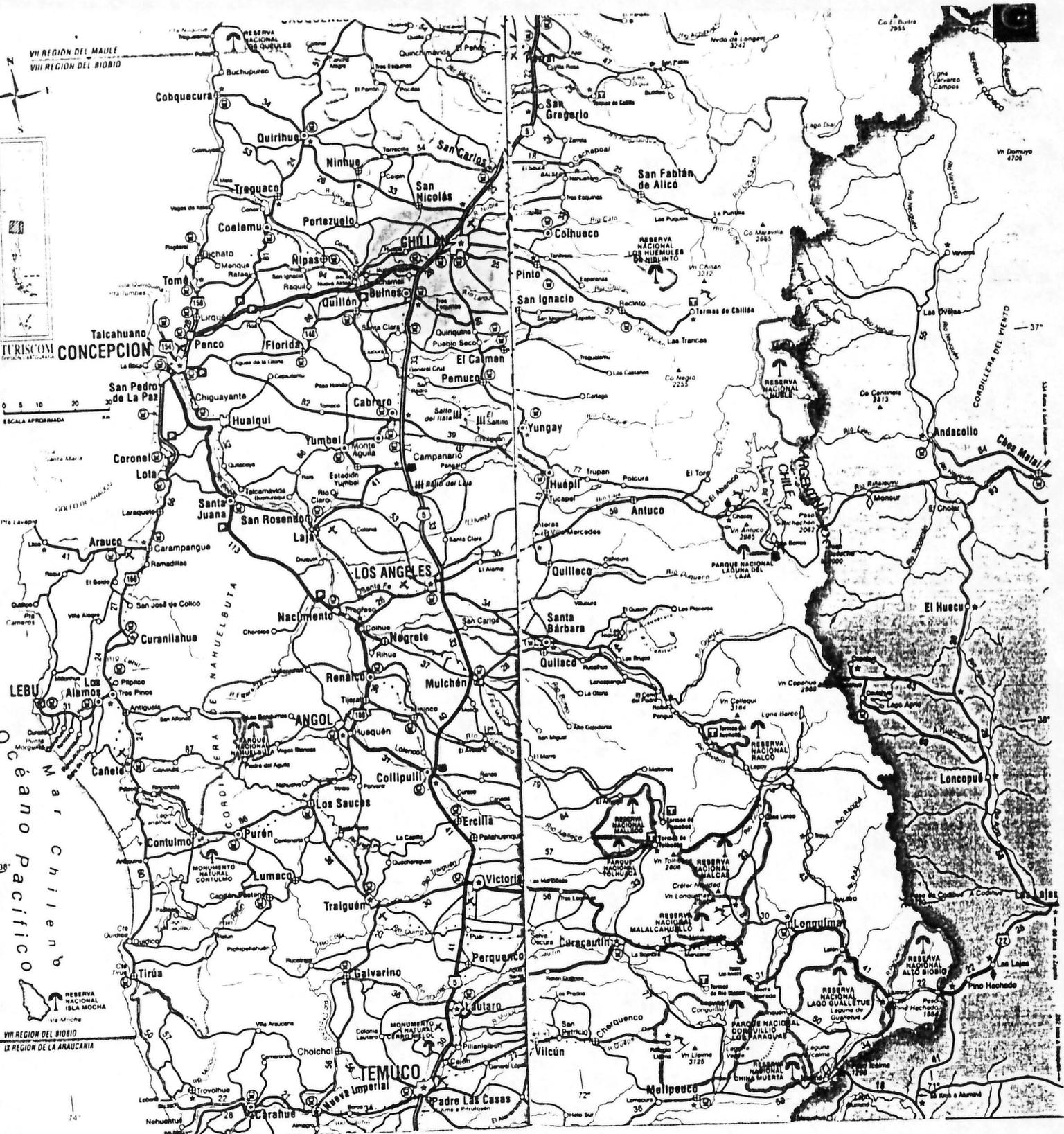
IN DE VALPARAISO
ON DEL LIB. GRAL. BERNARDO O'HIGGINS



TURISCOM
10 20 30
PROYECTADA
ON DEL LIB. GRAL. BERNARDO O'HIGGINS
ON DEL MAULT

Pacifico
MARCHIENO
Curanipe
CAUQUENES
RESEVA NACIONAL FEDERICO ALBERT
RESEVA NACIONAL LOS RIELES
RESEVA NACIONAL LOS QUEULES

ARGENTINA
CHILE
RESEVA NACIONAL LOS GIBALES
RESEVA NACIONAL LOS GIBALES
RESEVA NACIONAL BIE TETAZAS
RESEVA NACIONAL ALTOS DEL LIRCAI
RESEVA NACIONAL LOS BELLOTOS
RESEVA NACIONAL LOS QUEULES



VI REGION DEL MAULE
VIII REGION DEL BÍO BÍO

ESCALA APROXIMADA

TURISCOM

CONCEPCION

San Pedro de la Paz

Coronel

Lota

Arauco

Curanilahue

Los Alamos

LEBU

Canol

Contulmo

Purén

Lumaco

Tirúa

Reserva Nacional Isla Mocha

VI REGION DEL BÍO BÍO

IX REGION DE LA ARAUCANIA

Temuco

Padre Las Casas

Carahue



8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

8.1. GENERAL:

Desarrollar, optimizar e implementar la técnica de PCR en Chile para el diagnóstico del virus PRRS en planteles porcinos.

8.2 ESPECÍFICOS:

1. Optimizar la técnica de PCR para la detección del virus PRRS a partir de cepas controles, basándose en los métodos descritos previamente.
2. Desarrollar la técnica de PCR para la detección del virus PRRS a partir de muestras provenientes de cerdos faenados (muestras de tejidos)
3. Desarrollar la técnica de PCR para detección del virus a partir de muestras provenientes de cerdos vivos (muestras de sangre, suero o plasma).
4. Comparar y evaluar a nivel de campo el uso de análisis inmunológicos y moleculares para el diagnóstico del virus PRRS.

9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

(Describir en detalle la metodología y procedimientos a utilizar en la ejecución del proyecto)

Con el fin de disponer de controles positivos, se adquirirá material no infeccioso, tal como, el ácido nucleico extraído de distintas cepas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) desde Estados Unidos. El ácido nucleico viral, el cual es inocuo, se mantendrá a -20°C en el laboratorio y se usará posteriormente como control positivo para implementar la técnica de RT-PCR.

Como método de detección del patógeno se utilizará la técnica de Transcripción Reversa asociada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Debido a que este virus es un virus que tiene como genoma RNA, este debe ser convertido a DNA mediante la reacción de transcripción reversa antes de ser amplificado por PCR, ya que la enzima que es capaz de copiar el DNA utiliza como templado sólo el DNA, es decir, no reconoce el RNA como templado. La técnica de PCR permite detectar directamente la presencia del patógeno, mediante la amplificación específica de una región de su genoma. Esta técnica se basa en la utilización de dos oligonucleótidos de DNA denominados partidores los que reconocen específicamente el DNA blanco y luego la enzima Taq DNA polimerasa copia esta región del DNA. La reacción se repite una serie de ciclos, con lo cual el DNA es amplificado en múltiples copias, pudiendo ser visualizado mediante diferentes técnicas.

A pesar de que el método de PCR pareciera ser simple, lograr un diagnóstico adecuado mediante su uso, requiere tomar en cuenta una serie de rigurosas e indispensables precauciones respecto a los siguientes ítems:

a. Infraestructura y montaje del laboratorio para evitar problemas de contaminación: La contaminación es el problema más importante en el diagnóstico por PCR. Una reacción típica de PCR produce millones a billones de copias de un fragmento de DNA amplificado. Estos productos de PCR pueden ser transferidos accidentalmente a una nueva muestra o pueden contaminar los reactivos que se utilizan en la reacción. Estos productos son muy estables, por lo que una vez ocurrida una contaminación es muy difícil eliminarla. Por ello, se debe contar con un laboratorio que cumpla con los requisitos básicos para el buen desempeño del proyecto, los cuales se relacionan fundamentalmente con la separación física de las distintas etapas involucradas en el proceso. Además, se incluye una serie de normas sanitarias tales como: uso de guantes, delantales y gorros desechables, uso de material plástico estéril, aplicación de desinfectantes y luz ultravioleta antes y después del proceso, uso de controles internos (negativos y positivos), entre otros. Finalmente cabe destacar que para lograr un funcionamiento óptimo del proceso no basta con una implementación adecuada, además es fundamental contar con personal especializado y competente que sea capaz de trabajar y desenvolverse en un sistema tan estricto y riguroso. Por ello es que se destinará personal calificado de DIAGNOTEC para el desarrollo del proyecto.

b. Diseño de secuencias partidoras y Control de especificidad :

La especificidad de la reacción se obtiene mediante la **correcta elección** de la secuencia de los partidores. Por lo tanto, se seleccionarán por literatura partidores que hubiesen demostrado ser específicos para la detección de PRRSV. Luego se confirmará mediante alineamientos computacionales la especificidad de los partidores utilizando para esto el programa de alineamiento BLAST (Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico). Este programa permite explorar todas las secuencias de DNA disponibles en una base de datos en búsqueda de similitud con la secuencia del partidador. Por lo tanto, permite determinar si la secuencia del partidador está presente sólo en el patógeno de interés, ya que por un lado existe el potencial de que ocurran reacciones cruzadas con otros patógenos en el lugar incorporado y por otro que existan distintos genotipos y/o subtipos del patógeno que no son capaces de ser detectados mediante el método desarrollado.



Se evaluará además la calidad del partididor para la correcta realización del ensayo. Un partididor apropiado es aquel que no presenta secuencias complementarias con su partididor pareja o con si mismo, posee una temperatura de melting similar a su partididor pareja, el porcentaje de GC que posee fluctúa entre 40 y 60% y no presenta dominios ricos en GC o AT. Luego de seleccionado el partididor este será enviado a sintetizar a laboratorios externos.

Una vez recibidos los partididores se ensayará la amplificación del genoma de las cepas controles de PRRSV probando los distintos protocolos ya descritos y también se usarán otros patógenos que infectan cerdos para demostrar que estos patógenos no interfieren con la reacción, es decir, solo se reconoce al virus PRRS. En base a estos resultados se definirá un protocolo patrón y/o estándar que sirva como control para enfrentar la optimización y desarrollo de los protocolos posteriores. Para ello se extraerá el ácido nucleico de los virus controles, se cuantificará por espectrofotometría y se determinará el número de virus al que equivale. Luego se realizarán diluciones seriadas del ácido nucleico extraído los cuales serán amplificados por RT-PCR, para determinar la sensibilidad y/o dilución máxima detectable de cepas puras. Además, se evaluará la reproducibilidad de la técnica, para lo cual se realizarán ensayos en triplicado para determinar si los resultados son consistentes.

Como método complementario se utilizará el diagnóstico inmunológico de los títulos de anticuerpos contra el virus. Para ello, se montará la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) en el laboratorio. Para montar la técnica de ELISA se adquirirá un lector de placas, un lavador de placas y el kit de diagnóstico para PRRSV. Se montará la técnica mediante las instrucciones señaladas por el fabricante y se determinará su sensibilidad y reproducibilidad a partir de muestras controles.

Por otra parte, una vez implementado el método de RT-PCR patrón, el que utiliza un termociclador tradicional, se adaptará a un termociclador de detección automática "Light cycler". En este sistema de PCR, a diferencia del termociclador manual, el producto amplificado se une a un colorante emitiendo una señal luminosa, la cual es detectada por el equipo y transmitida a un computador recibiendo y procesando los resultados al mismo tiempo. Esta metodología posee ventajas tales como: menor manipulación de la muestra, menor tiempo de duración de la reacción, visualización simultánea de la aparición de productos y evita la manipulación de productos de PCR. Esto implica finalmente menor tiempo de entrega de resultados y menor riesgo de falsos positivos debido a contaminación, principal problema de la técnica de PCR, debido a su alta sensibilidad. No obstante, las condiciones de funcionamiento varían respecto al termociclador tradicional por lo que es necesario evaluar la efectividad del protocolo seleccionado y ajustarlo a las condiciones del equipo, para ello se determinará tanto la sensibilidad como la reproducibilidad de igual manera que para el termociclador tradicional, de modo de obtener un protocolo de RT-PCR adecuado a usar en este tipo de equipo como estándar.

Obtenido el método de RT-PCR patrón, se procederá a desarrollar e implementar la técnica que resulta más efectiva para la detección de PRRSV desde muestras provenientes de cerdos faenados, es decir desde distintos tipos de muestras de tejido.

Cabe destacar que el proceso de RT-PCR se puede subdividir en cuatro fases: la fase pre-PCR (Procesamiento de la muestra), RT(Reacción de Transcripción Reversa), PCR (Reacción de polimerización) y post-PCR (Visualización del producto amplificado). La fase de pre-PCR consiste en procesar una muestra clínica para dejarla apta de ser sometida a la reacción de RT-PCR. Esta etapa se caracteriza por ser una de la más crítica del proceso, la cual persigue tres objetivos: (a) Separar el ácido nucleico del patógeno desde la muestra. (b) Concentrar el ácido nucleico en un volumen adecuado (pequeño) para la reacción de RT-PCR. (c) Remover los compuestos inhibidores del RT-PCR. Los inhibidores son sustancias propias de las muestras, los cuales reducen la eficiencia de las enzimas involucradas en el RT-PCR y por ende reducen la sensibilidad del método. Para lograr una fase de pre-PCR efectiva, especialmente cuando las muestras presentan una baja cantidad del patógeno a detectar, deben analizarse una serie de variables como: localización del patógeno, lo que va a determinar el tipo y volumen de muestra a analizar (sangre, suero,



tejidos, fluidos, etc), compuestos inhibidores que pueda presentar tanto la muestra seleccionada, como el material con que se realiza la toma de muestra, tipo de espécimen a mostrar, entre otros.

En consecuencia será necesario evaluar las siguientes variables:

Tipo de muestra: tejidos o fluidos.

Tipos de medio de mantención: Buffer Fosfato Salino (PBS), MEM u otros

Tipo de espécimen a muestrear: Sospechosos positivos seleccionados por antecedentes clínicos entregados en el predio, sanos o enfermos.

Para ello, será necesario comenzar probando el protocolo patrón en cada una de las situaciones descritas, una vez obtenido los resultados, se determinará de modo cualitativo el grado de inhibición que ocurre sobre la reacción de RT-PCR estándar. En función de ello, para cada una de las variables descritas, se definirán y estudiarán diversos métodos de extracción del ácido nucleico (Fase Pre-PCR) de modo de desarrollar un método efectivo para detectar al patógeno desde cerdos muertos. En cuanto se disponga de la mejor manera de realizar la toma y la preparación de la muestra se determinará la reproducibilidad de la técnica de RT-PCR para muestras naturales provenientes de cerdos muertos, de igual modo que en el punto 1.

Esta experiencia se adaptará al termociclador de detección automática "Light Cycler". En estos equipos automatizados la exigencia de la calidad de la muestra es mayor, debido a que es más sensible a la presencia de inhibidores. Es por lo tanto importante nuevamente evaluar si el método de extracción es el adecuado para el equipo. Posteriormente, se determinará también la reproducibilidad de sus resultados para muestras naturales provenientes de cerdos muertos.

Se desarrollará la detección de PRRSV a partir de muestras provenientes de cerdos vivos mediante la técnica de RT-PCR, de manera análoga al punto anterior, pero en muestras de sangre, suero y plasma. La toma de muestra será dirigida a especímenes sospechosos de estar infectados, los que serán seleccionados por signología clínica, debido a que la probabilidad de encontrar el PRRSV en este tipo de muestras es más baja.

En cuanto se disponga del conocimiento del mejor tipo de muestra para extracción del ácido nucleico del virus, se determinará la reproducibilidad de la técnica de RT-PCR para muestras naturales provenientes de cerdos vivos.

Esta experiencia también se adaptará posteriormente al termociclador de detección automática "Light Cycler" y se determinará la reproducibilidad de los resultados para muestras naturales provenientes de cerdos vivos.

Finalmente, con el objeto de determinar la factibilidad de utilizar la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de PRRSV a nivel del ciclo productivo porcino, se enfrentará esta técnica con la técnica de ELISA. El estudio se comenzará por la identificación de planteles positivos para PRRS. Para esto se realizará un muestreo dirigido a cerdos que hayan presentado sintomatología característica de la enfermedad. A estos cerdos se les realizará análisis por RT-PCR y ELISA durante varias semanas y se estudiarán los resultados obtenidos con ambas técnicas. Con esto también se pretende determinar cual es el momento más adecuado para tomar las muestras para cada una de las técnicas.

Paralelamente se realizarán muestreos al azar para evaluar la capacidad de los métodos ELISA y PCR de detectar individuos portadores asintomáticos.

Además, se pretende realizar en planteles positivos a PRRSV un muestreo seriado, para ello se tomarán muestras en distintas etapas de crecimiento del cerdo. Se utilizará RT-PCR y ELISA en animales vivos. El propósito de este muestreo es obtener un estudio integral a nivel de campo, de modo de, determinar en que momento ocurre la infección, que categorías son la más susceptibles y evaluar en su conjunto y por separado las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas diagnósticas.



En resumen, como se dijo anteriormente una vez que se prueben los distintos pares de partidores, se estudie la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR utilizando el ácido nucleico extraído de cepas controles; se comenzará a aplicar y optimizar la técnica utilizando muestras, ya sea, de tejidos o suero o sangre, de cerdos que sean seropositivos al ELISA y que presenten algún signo de la enfermedad. Finalmente, basándose en estos resultados, se modificarán los protocolos para adaptar la técnica al equipo automático Light Cycler que permite tener un resultado en menor tiempo y con menor riesgo de contaminación.

Cabe destacar que la investigación de este proyecto, dado su carácter de Biotecnológico, apunta preferentemente al desarrollo de un método de diagnóstico molecular que permita detectar el virus en la forma más eficiente posible, más que tener una orientación de estudio epidemiológico. Aunque también se podrá obtener este tipo de información de los resultados del proyecto, ya que se realizarán muestreos a diferentes edades de los cerdos de modo de conocer a que edad son más susceptibles de ser infectados. Se realizarán muestreos en distintos lugares de los planteles de modo de encontrar los sitios de mayor riesgo de infección (recria, engorda u otro) Finalmente, se realizarán muestreos en el tiempo a los mismos cerdos (cinéticas), y se analizarán tanto por ELISA como por RT-PCR, con el fin de estudiar el momento de aparición del virus y el momento de aparición de la respuesta inmune y posteriormente la curva de desaparición de ambos. Para esto, se extraerá sangre, suero o plasma de 5 cerdos, cada semana, los cuales se continuarán muestreando durante al menos 8 semanas consecutivas.

En general, los muestreos serán dirigidos, es decir, se analizarán de preferencia cerdos que presenten algún signo de la enfermedad. De este modo, es suficiente con muestrear entre 5 a 10 cerdos por punto, evitándose tomar un número de muestras dependiente de la prevalencia del plantel. Se realizarán al menos 3 puntos por edad y por lugar. La cinética se realizará cada 7 días durante al menos 6 o 7 semanas y en 2 o 3 planteles que resulten positivos. Este tipo de muestreo fue analizado con el Médico Veterinario Dr. José Naranjo, epidemiólogo y encargado de protección pecuaria del SAG.

Con estos resultados se podrá tener conocimiento de los puntos críticos del proceso de producción, lo que permitirá tomar las medidas de control adecuadas. Además, del comportamiento del virus en el huésped, lo que permitirá conocer el mejor momento de muestreo ya sea para ELISA como para RT-PCR.



10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual)

AÑO 2003

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
2	2.3	Implementación de los métodos de RT-PCR desarrollados en cerdos faenados en el equipo automatizado	2-Ene-03	28-Mar-03
3	3.1	Evaluación de distintos métodos de extracción (Análisis de Fase Pre-PCR) a partir de muestras de cerdos vivos infectados.	3-Mar-03	28-Abr-03
	3.2	Estudio de sensibilidad y reproducibilidad de los métodos de RT-PCR desarrollados en cerdos vivos.	28-Abr -03	25-Jun-03
	3.3	Implementación de los métodos de RT-PCR desarrollados en cerdos vivos en el equipo automatizado	26-Jun-03	27-Ago-03
4	4.1	Diagnosticar la presencia de PRRSV mediante los métodos de RT- PCR desarrollados (tradicional y automatizado), en cerdos faenados	27-Ago-03	25-Oct-03
	4.2	Evaluar la edad más susceptible de infección por PRRSV, realizando muestreos dirigidos en un plantel, mediante los métodos de RT- PCR desarrollados (tradicional y automatizado) y la técnica de ELISA, en cerdos vivos	26-Oct-03	25-Dic-03
	4.3	Evaluar el lugar en el plantel más susceptible de infección por PRRSV, mediante los métodos de RT- PCR desarrollados (tradicional y automatizado) y la técnica de ELISA, en cerdos vivos	26-Dic-03	25-Feb-04
	4.4	Estudio de la cinética de infección y respuesta inmune en cerdos provenientes de planteles naturalmente infectados mediante los métodos de PCR desarrollados (tradicional y automatizado) y ELISA	26-Oct-03	1-Jun-04

PROGRAMA DE EJECUCION

	Meses	Años																		
		2002				2003				2004										
		e	f	m	a	m	a	m	j	j	a	s	o	d	c	f	m	a	m	j
1	Adquisición de equipos y montaje del laboratorio																			
2	Obtención ácidos nucleicos no infecciosos control de PRRSV																			
3	Obtención de patidores para PRRSV																			
4	Optimización PCR protocolo patrón para PRRSV																			
5	Sensibilidad y reproducibilidad PCR patrón																			
6	Adaptación a equipo automatizado																			
7	Desarrollo métodos extracción para muestras de cerdos faenados																			
8	Sensibilidad y reproducibilidad de PCR en muestras de cerdos faenados																			
9	Detección mediante PCR automatizado en muestras de cerdos faenados																			
10	Desarrollo métodos extracción para muestras de cerdos vivos																			
11	Sensibilidad y reproducibilidad de PCR en muestras de cerdos vivos																			
12	Detección mediante PCR automatizado en muestras de cerdos vivos																			
13	Determinación de planteles positivos a PRRSV por PCR y ELISA																			
14	Detección de PRRSV en cerdos de distinta edad																			
15	Detección de PRRSV en cerdos de distintos lugares																			
16	Estudios de cinética de infección																			
17	Comparación de resultados entre PCR y ELISA																			
18	Informe Final																			



11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1 Resultados esperados por objetivo

Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1	Disponer de un método de PCR patrón que sea capaz de detectar el ácido nucleico extraído de cepas control de PRRSV para ser utilizado como referencia para los métodos a desarrollar posteriormente.	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico para cada cepa	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado con al menos 3 sets de partidores	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado con 1 set de partidores	16-Jul - 2002
				Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado con 2 sets de partidores	16-Sep-2002
				Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado con 3 o más sets de partidores	18-Dic-2002
2	Disponer de un método de PCR que sea capaz de detectar PRRSV a partir de muestras provenientes de cerdos faenados.	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de tejido	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado, específico y sensible directo desde tejido	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de una gran cantidad de tejido con un set de partidores	16-Oct-2002
				Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de poco tejido con 2 sets de	1-Ene-2003



				partidores Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de poco tejido y con 3 o más sets de partidores	28-Mar-2003
3	Disponer de un método de PCR que sea capaz de detectar PRRSV a partir de muestras provenientes de cerdos vivos.	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de suero, sangre o plasma	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de suero, sangre o plasma con 3 o más sets de partidores	Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de suero, sangre o plasma con 1 set de partidores	28-Abr-2003
				Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de suero, sangre o plasma con 2 sets de partidores	25-Jun-2003
				Obtención de un producto de amplificación del tamaño esperado y específico a partir de suero, sangre o plasma con 3 o más sets de partidores	27-Ago-2003
4	Disponer de un estudio de campo que demuestre las ventajas y desventajas de los	Obtener resultados del diagnóstico por ambas	Comparación de datos registrados y	Comparación de los datos registrados en cerdos	25-Oct-2003





	métodos de RT-PCR respecto a la técnica de ELISA	técnicas en los mismos cerdos	analizados	faenados	
				Comparación de los datos registrados en cerdos de distinta edad	26-Dic-2003
				Comparación de los datos registrados en cerdos de distinto lugar en el plantel	25-Feb-2004
				Comparación de los datos registrados en la cinética	17-Jun-2004
				Comparación del 100% de los datos registrados y analizados	20-Jul-2004

11.2 Resultados esperados por actividad

Obj. Esp. N°	Activid. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
1	1.1	Tener equipamiento, personal y material requerido	Laboratorio funcionando	Tener el 100% del equipamiento, personal y material	Tener el 50% del equipamiento, personal y material	16-Feb-2002
					Tener el 100% del equipamiento, personal y material	30-Mar-2002
	1.2	Disponer del ácido nucleico no infeccioso extraído de varias cepas control de PRRSV	Acido nucleico no infeccioso de algunas Cepas de virus PRRS disponible en el laboratorio.	100% del ácido nucleico viral requerido (cepa americana, chilena i europea) disponible en el laboratorio.	Acido nucleico de Cepa americana y chilena del PRRSV disponible en el laboratorio	16-Feb-2002
					Acido nucleico de Cepa europea de virus PRRS disponible en el laboratorio	30-Mar-2002
	1.3	Recepción de partidores específicos para la detección de PRRSV	Tener varios sets de partidores específicos para la detección de PRRSV en el Laboratorio	Tener al menos 3 sets de partidores específicos para la detección de PRRSV en el Laboratorio	Tener 1 set de partidores específicos para la detección de PRRSV en el Laboratorio	2-Feb-2002
					Tener al menos 2 sets de partidores específicos para la detección de PRRSV en el Laboratorio	16-Feb-2002
					Tener al menos 3 sets de partidores específicos para la detección de	2-Mar-2002

					PRRSV en el Laboratorio	
	1.4	Obtención del Protocolo patrón y/o estándar de RT-PCR para la detección de PRRSV	Diagnóstico de PRRSV a partir del ácido nucleico control por RT-PCR	Diagnóstico de las 3 cepas control de PRRSV por RT-PCR	Diagnóstico de 2 de las cepas (americana y chilena) de PRRSV por RT-PCR	3-Abr-2002
					Diagnóstico de las 3 cepas control de PRRSV por RT-PCR	30-Abr-2002
	1.5	Sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR determinada	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV reproducible y sensible	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV 100% reproducible y con una sensibilidad del orden de los picogramos	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV 50% reproducible y con una sensibilidad del orden de los nanogramos	16-May-2002
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV 100% reproducible y con una sensibilidad del orden de los picogramos	16-Jun-2002
	1.6	Adaptación de los protocolos a termociclador automatizado	Diagnóstico por RT-PCR a partir del ácido nucleico control de PRRSV en light cycler	Diagnóstico por RT-PCR a partir del ácido nucleico control de PRRSV en light cycler sensible y reproducible	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler 50% reproducible y con una sensibilidad del orden de los nanogramos	17-Ago-2002
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler 100% reproducible y con una sensibilidad del orden de los picogramos	18-Oct-2002



2	2.1	Diagnóstico de PRRSV por RT-PCR desarrollado a partir de tejidos de cerdos faenados	Detección de PRRSV específica, sensible y reproducible en tejidos de cerdos faenados	Detección por RT-PCR de PRRSV directamente en tejidos de cerdos faenados con 3 o más sets de partidores y en forma reproducible	Detección por RT-PCR de PRRSV directamente en tejidos de cerdos faenados con 1 set de partidores y en forma reproducible	4-Sep-2002
					Detección por RT-PCR de PRRSV directamente en tejidos de cerdos faenados con 2 sets de partidores y en forma reproducible	25-Sep-2002
					Detección por RT-PCR de PRRSV directamente en tejidos de cerdos faenados con 3 o más sets de partidores y en forma reproducible	16-Oct-2002
	2.2	Sensibilidad determinada en cerdos faenados	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV sensible	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV sensible	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV directamente de tejido con una sensibilidad del orden de los nanogramos	1-Dic-2002
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV directamente de tejido con una sensibilidad del orden de los picogramos	1-Ene-2003



	2.3	Adaptación del diagnóstico en cerdos faenados a termociclador automatizado	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler Específica sensible y reproducible	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler con 3 o más sets de partidores	29-Ene-2003
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler reproducible	28-Feb-2003
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler del orden de los picogramos	28-Mar-2003
3	3.1	Método de RT-PCR desarrollado para la detección de PRRSV a partir de cerdos vivos	Detección de PRRSV por RT-PCR específica y reproducible, en cerdos vivos	Detección por RT-PCR de PRRSV reproducible con 3 o más sets de partidores en suero, plasma o sangre	Detección por RT-PCR de PRRSV reproducible con 1 set de partidores en suero, plasma o sangre	24-Mar-2003
					Detección por RT-PCR de PRRSV reproducible con 2 sets de partidores en suero, plasma o sangre	14-Abr-2003
					Detección por RT-PCR de PRRSV reproducible con 3 o más sets de partidores en suero, plasma o sangre	28-Abr-2003
	3.2	Sensibilidad del RT-PCR determinada en cerdos vivos	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV sensible en cerdos vivos	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV del orden de los picogramos en cerdos vivos	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV del orden de los nanogramos en suero plasma o sangre	28-May-2003



					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV del orden de los picogramos en suero plasma o sangre	25-Jun-2003
	3.3	Adaptación del diagnostico en cerdos vivos a termociclador automatizado	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler en cerdos vivos	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler específico, reproducible y sensible a partir de suero, plasma o sangre	Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler con 1 set de partidores y reproducible a partir de suero, plasma o sangre	18-Jul-2003
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler con 3 o mas sets de partidores y reproducible a partir de suero, plasma o sangre	13.-Ago-2003
					Diagnóstico por RT-PCR de PRRSV en light cycler del orden de los picogramos	27-Ago-2003
4	4.1	Planteles infectados con PRRSV chequeados por RT-PCR y ELISA	Diagnóstico de PRRSV en muestras de los mismos cerdos con ambas técnicas	Comparación de los resultados del diagnóstico con ambas técnicas	Análisis del 50% de las muestras recolectadas	25-Sep-2003
					Análisis del 100% de las muestras recolectadas	25-Oct-2003
	4.2	Detección de PRRSV por RT-PCR y Elisa en cerdos de distinta edad	Diagnóstico de PRRSV en muestras de cerdos de distinta edad	Comparación de los resultados de las muestras de los cerdos con edades diferentes.	Análisis del 50% de las muestras de los cerdos de diferentes edades	23-Nov-2003



					Análisis del 100% de las muestras de los cerdos de diferentes edades	30-Dic-2003
	4.3	Detección de PRRSV por RT-PCR y Elisa en cerdos de distintos lugares en el plantel	Diagnóstico de PRRSV en muestras de cerdos distintos lugares dentro del plantel	Comparación de los resultados de las muestras de los cerdos ubicados en distintos lugares en el plantel	Análisis del 50% de las muestras de los cerdos de distintos lugares en el plantel	25-Ene - 2003
					Análisis del 100% de las muestras de los cerdos ubicados en distintos lugares en el plantel	25-Feb - 2003
	4.4	Detección de PRRSV por RT-PCR y Elisa en los mismos cerdos en el tiempo (cinética de infección)	Diagnóstico de PRRSV en muestras de los mismos cerdos en el tiempo	Conocer la cinética de la infección tanto de la viremia como de la respuesta inmune	Análisis del 50% de los puntos de curva (esto corresponde a 4 puntos, 1 punto por semana)	25-Abr - 2004
					Análisis del 100% de los puntos de la curva (es decir 8 puntos)	30-May - 2003
	4.5	Disponer de un estudio integral a nivel de campo que demuestre las ventajas y desventajas del método de RT-PCR y ELISA como test rutinarios de diagnóstico para PRRSV	Comparación de los resultados obtenidos del diagnóstico de PRRSV por RT-PCR y ELISA	Comprender las fortalezas y debilidades de los distintos métodos para una utilización eficiente de estos	20% de los datos analizados	15-Jun 2004





					40% de los datos analizados	30-Jun-2004
					100% de los datos analizados	15-Jul-2004
	4.6	Información relevante y actualizada del PRRSV y sus alternativas de detección dentro del país	Informe final	Informe final terminado	50% del Informe final	31-Jun - 2004
					100% del Informe Final	20 - Jul-2004



IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

El impacto económico del proyecto recaerá sobre todos los productores porcinos tanto pequeños, medianos como grandes de nuestro país. El contar con este tipo de herramienta diagnóstica de última generación permitirá realizar un estudio epidemiológico más certero y en consecuencia, permitirá diseñar las estrategias más adecuadas para el control. En definitiva, será una herramienta fundamental en los planes de erradicación de este virus que pretende llevar a cabo el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG). Además, abre paso al ingreso de la biotecnología dentro del sector pecuario como una alternativa concreta y accesible, lo que incentivaría a continuar el desarrollo dentro del área para lograr mejorar las condiciones actuales lo que se traduce finalmente en mayores rentabilidades del sector.

12.2. Social

El impacto social del proyecto se relaciona con la posibilidad de incluir dentro del marco agropecuario una nueva actividad, la biotecnología aplicada al diagnóstico, la que en la medida del desarrollo y los resultados logrados, incentiva a la generación de este nuevo tipo de empresas prestadoras de servicios "tecnológicos". Por otro lado, en la medida que los productores logren buenos resultados con la utilización del diagnóstico molecular podrán ser más eficientes en el control de las enfermedades, virales especialmente, lo que les permitirá seguir creciendo o aumentar su tasa de crecimiento, lo que implica aumentar su masa de trabajadores traduciendo finalmente en la generación de nuevos empleos tanto dentro del sector biotecnológico como dentro del sector porcino.

12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

El desarrollo de un método de diagnóstico molecular para el virus PRRS en Chile, inexistente en este momento y fundamental para el estudio epidemiológico de la enfermedad, permitirá llevar a cabo el plan de erradicación del virus propuesto por el SAG, por lo tanto tendrá un impacto fundamental a nivel de país.



13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

Actualmente se cuenta sólo con el test de ELISA para la detección de los títulos anticuerpos contra el PRRSV como diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, al igual que en otras partes del mundo en Chile el ELISA no da resultados certeros lo que impide tomar las medidas de control adecuadas para evitar la diseminación del virus. Por este motivo, y a modo de complemento fundamental se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular en otras partes del mundo. El uso de ambas técnicas permite el control más eficiente de la enfermedad, con lo que se evita la diseminación del virus y su consiguiente daño ambiental. El hecho de realizar un diagnóstico certero de un virus también permite evitar que se realicen tratamientos indiscriminados con antibióticos asumiendo la presencia de una bacteria. Una exposición innecesaria a los antibióticos puede generar resistencias, lo que a largo plazo genera la pérdida de efectividad del antibiótico y selección de bacterias más patógenas.

Por esta razón, el efecto ambiental de disponer de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de PRRSV en porcinos es positivo, ya que permite un diagnóstico precoz del virus lo que permite tomar las medidas sanitarias adecuadas para evitar su diseminación en el ambiente y permite disminuir la exposición innecesaria a los antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias reduciendo el riesgo a generar resistencia.

Cabe destacar que una de las grandes ventajas que posee la técnica de PCR es que no requiere trabajar con el agente patógeno infeccioso, es más, la fase inicial del proceso (Pre-PCR) del método requiere de la separación de las moléculas de modo de dejar al ácido nucleico disponible (el cual no es infeccioso), por ello es que las cepas control utilizadas no requieren ser cultivadas, lo que no implica riesgo alguno para el medio ambiente. En relación a las muestras naturales, una vez que ingresan al laboratorio, son en su totalidad procesadas, por lo que en el caso de que estén infectadas, pierden esta característica por lo anteriormente mencionado. Además, el laboratorio cuenta con rigurosas normas para la eliminación de este tipo de material biológico.



16. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

16.1. Criterios y supuestos utilizados en el análisis

Indicar criterios y supuestos utilizados en el cálculo de ingresos (entradas) y costos (salidas) del proyecto

Supuestos Generales:

- I. Esta evaluación económica tiene por objeto medir la rentabilidad del proyecto del punto de vista privado. Debido a ello se realiza un análisis costo-beneficio "PURO", considerando inversión, ingresos y egresos totales generados por el mismo. Se evaluará la situación con proyecto solamente.

Supuestos Específicos:

1. INVERSION

En etapa productiva del proyecto se estima una inversión de:

Proyecto Sector Porcino	
EQUIPOS	PRECIO (M\$)
Agitador magnético	300
Centrifuga refrigerada	-
Bloque termorregulado	600
Autoclave	600
Incubadora	600
Freezer	300
Refrigerador	300
Fuente poder	500
Cama ra geles	600
Micropipetas	600
Termociclador	5.000
Vortex	100
Computador	500
Impresora	160
Montaje	5.000
TOTAL	15.160

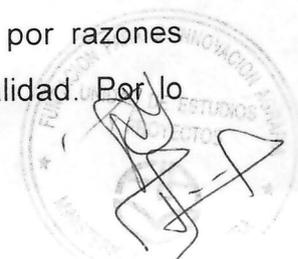


2. INGRESOS

1. El precio cobrado para el Análisis del virus PRRS se estimó en \$11.200, valor semejante al cobrado para este tipo de análisis en el extranjero.
2. La **cantidad de análisis del virus PRRS** fue obtenida a partir de los siguientes supuestos:
 -
 - Se estima que en Chile existen un total de 102 planteles de cerdos, 12 planteles corresponden a grandes productores y los 90 restantes corresponden a medianos y chicos.
 - Durante el año 2000 el SAG realizó un diagnóstico por ELISA y del total de las 135.000 hembras que existen en el país, resultaron 28.000 seropositivas a PRRSV.
 - El 50% de las hembras positivas están distribuidas en los planteles grandes. (14.000 aprox.)
 - Se asumió una tasa de crecimiento anual de la industria de 7,3 %, a partir del año 6 se asumió constante.
 - A continuación se presenta la proyección de crecimiento de los planteles positivos:

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6-10
Hembras positivas	28.000	30.038	32.226	34.572	37.088	39.788

- La estrategia a seguir de acuerdo al programa de erradicación que ha planteado el SAG junto con ASPROCER (año 2000), se basa en dos etapas:
 - Etapa 1: **Control y eliminación de los planteles positivos.** (Tiempo estimado: Año 1 a 4). Para ello existen dos estrategias: (a) Test y remoción y (b) Aclimatación. Ambas estrategias requieren el chequeo de todas las hembras positivas, sin embargo se asumió una participación creciente de los planteles, ya que por razones presupuestarias no le es factible realizarlo en su totalidad. Por lo





tanto se asumió mayor posibilidad en los grandes que en los pequeños productores.

- Etapa 2: **Vigilancia de los planteles negativos**: (Tiempo: Desde año 5 en adelante). Esta etapa consiste en mantener los planteles negativos, una vez terminada la etapa 1, para ello se requieren chequear 20 hembras por plantel cada dos meses. Por lo tanto son 120 análisis por plantel al año.

A continuación se presentan las participaciones y cantidad de análisis en las distintas estrategias en el tiempo:

	ETAPA 1				ETAPA 2	
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6-10
Planteles grandes						
Test y remoción	7%	15%	20%	25%		
Aclimatación	10%	20%	25%	30%		
Vigilancia					si	Si
Planteles medianos y chicos						
Test y remoción	3%	4%	5%	6%		
Aclimatación	5%	7%	10%	15%		
Vigilancia					Si	si

	ETAPA 1				ETAPA 2	
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6-10
Planteles grandes	2.380	5.257	7.251	9.507		
Test y remoción	980	2.253	3.223	4.321		
Aclimatación	1.400	3.004	4.028	5.186		
Vigilancia					1.440	1.440
Planteles medianos y chicos	1.120	1.652	2.417	3.630		
Test y remoción	420	601	806	1.037		
Aclimatación	700	1.051	1.611	2.593		
Vigilancia					10.800	10.800
Análisis totales	3.500	6.909	9.668	13.137	12.240	12.240



3. EGRESOS

- Los **costos variables** por Análisis son de \$3.000.
- Los **Gastos Generales** incluye todos los costos de servicios para la producción de análisis y mano de obra indirectas. Se considera gastos generales todos los costos de servicio a producción, mano de obra directa e indirecta y esta en función a la productividad ya que la empresa produce otros servicios. Los gastos generales se proyectan en \$200.000 para 1000 análisis por mes. Se calcula el número de meses para el total de análisis proyectados año y se multiplica por el valor referencial de la experiencia productiva de Diagnotec.

Los **Costos fijos de producción** :

Nuevas contrataciones: Se proyecta en base a la contratación de un jefe de producción con una renta mensual de \$800.000, de un jefe de investigación con una renta mensual de \$800.000 y dos analistas con una renta mensual de \$250.000.

Costo fijo personal contratado: Se asumió que un 12,5% del total de costos de mano de obra iban a dirigirse al área porcina, es decir de un total de \$6.000.000 al mes un 12,5% (\$750.000/mes)

Costo fijo en comunicación: Se cargará a esta nueva actividad el 20% en gastos de comunicación, respecto al costo del personal contratado.

Costo fijo de personal en administración: Se cargará a esta nueva actividad el 20% en gastos de administración, respecto al costo del personal contratado

5. Otros:

Gastos de Comercialización: Los gastos comerciales se proyectan en un 8% del volumen de venta, destinado al marketing en dar a conocer los servicios en revistas del sector, charlas informativas, contacto directo con los clientes, entre otros.



17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. *Técnicos*

Como riesgos técnicos se asocian:

- 1) Incorrecta elección de los partidores utilizados en la reacción de PCR debido a la existencia de reacción cruzada con otros patógenos nacionales. Este riesgo se debe a que esta técnica nunca antes ha sido utilizada en nuestro país.
- 2) Incorrecta selección de los métodos de extracción lo que impide alcanzar la sensibilidad deseada. Este riesgo se genera cada vez que se aplica una técnica descrita en la literatura, a muestras naturales obtenidas en terreno, debido a la gran cantidad de inhibidores que estas poseen.
- 3) Incorrecta selección de la muestra, lo que puede alterar la obtención de la sensibilidad deseada. Este riesgo se genera cada vez que se ajusta una técnica descrita en la literatura a la realidad de muestras naturales obtenidas en cada país.
- 4) Ocurrencia de contaminaciones. Este riesgo se puede generar debido a que el principal problema de la técnica de PCR son las contaminaciones entre muestras debido a su alta sensibilidad.
- 5) Adaptación de protocolos de RT-PCR a equipos automatizados sin éxito. Este riesgo se genera al no existir experiencias previas en el mundo de la utilización de estos equipos en la detección de PRRS.
- 6) No contar con las muestras apropiadas en el momento oportuno. Este riesgo se puede producir, ya que en una primera etapa se seleccionarán los cerdos del estudio, con métodos de menor sensibilidad y especificidad que la técnica de PCR.

17.2. *Económicos*

Como riesgo económico se asocia, que una vez implementada la técnica de RT-PCR falte incentivo inicial para el uso de esta. Esto se genera por la falta de conocimiento por parte de los productores de la utilidad que esta técnica les puede prestar.

17.3. *Gestión*

Como riesgo de gestión se asocia:

- 1) Falta de coordinación entre muestreos y laboratorio que perjudiquen la calidad de las muestras. Este riesgo se genera cada vez que se adapta un protocolo de muestreo teórico a la realidad.
- 2) Retraso de insumos por no estar estos disponibles en plaza, lo que puede implicar un retraso del proceso. Este riesgo se genera al existir reactivos que sólo podrán ser adquiridos en el extranjero.





- 3) Falta de coordinación entre laboratorio productivo y el personal que ejecuta el proyecto. Este riesgo se genera al existir equipamiento que será compartido por ambas áreas de trabajo.
- 4) Imposibilidad climática de realizar muestreo. Este riesgo se genera al existir la necesidad de realizar tomas de muestras en planteles porcinos ubicados en diversas zonas rurales que en invierno pueden ver afectados sus accesos.



17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
Partidores seleccionados no específicos, por presentarse reacciones cruzadas con otros patógenos del país.	bajo	Rediseño de partidores específicos
Método de extracción seleccionado, con baja sensibilidad	Medio-alto	Evaluar y optimizar otros métodos de extracción
Toma muestra poco apropiada afectando negativamente la sensibilidad	Medio-alto	Reevaluar toma de muestra (todas las variables que esto implica)
Ocurrencia de contaminaciones	Medio-alto	Reestudio de la implementación del laboratorio, de los equipos utilizados y de todas las etapas involucradas del proceso
Adaptación de protocolos a equipo automatizado de PCR sin éxito	Alto	Reevaluar y optimizar distintos protocolos hasta encontrar el adecuado
No encontrar muestras adecuadas en el momento oportuno impidiendo la correcta comparación entre los métodos, para obtener resultados concluyentes	Medio-Alto	Reseleccionar los planteles, en busca de planteles positivos a PRRSV
Falta de incentivo inicial para el uso de esta técnica una vez implementada.	alto	Financiar el tiempo necesario en la difusión e introducción de esta tecnología de vanguardia.
Falta de coordinación entre muestreos y laboratorio que perjudiquen la calidad de las muestras	Medio-alto	Ajustar el trabajo de terreno al laboratorio según las necesidades y realidades del momento
Retraso de insumos, no están en plaza, retraso del proceso	Medio-alto	Reorganizar las tareas para ajustarse al momento de llegada de los insumos
Falta de coordinación entre laboratorio productivo y personal que ejecuta el proyecto	Bajo	Planes de trabajo sistemáticos entre área investigación y producción
Imposibilidad climática de realizar muestreo	Bajo	Tener mayor cantidad de planteles, mas fechas de muestreos

18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Los resultados del proyecto serán transferidos mediante las siguientes líneas de acción:

- 1) Capacitación en planteles. Se capacitará directamente a los Médicos Veterinarios de los diferentes planteles porcinos que participen en las actividades del proyecto, respecto a la enfermedad, el agente causal y su diagnóstico mediante la técnica de RT-PCR.
- 2) Eventos de difusión. Estos se realizarán cuando se disponga de resultados concluyentes y se organizarán de tal manera que concurra el mayor número de productores porcinos nacionales. Durante estos se informará acerca de los resultados del proyecto especialmente en lo que se refiere a los puntos críticos del sistema productivo, tales como: la edad y el lugar del plantel de mayor susceptibilidad a la infección, la cinética de la infección, etc; las técnicas diagnósticas disponibles para detectarla y de la técnica de RT-PCR. Además, se mostrará como el uso de esta técnica para el diagnóstico de PRRSV en otros países ha servido para el control de la enfermedad. Se instruirá como utilizar esta técnica diagnóstica como herramienta de control de la enfermedad en Chile.
- 3) Participación en congresos. En cuanto sea posible se participará en congresos donde la difusión de estos resultados sean recibidos por miembros del sector porcino.
- 4) Folletería. Se elaboraran trípticos informativos sobre el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (características y control) así como del diagnóstico de esta enfermedad, utilizando la técnica de RT-PCR. Estos folletos serán distribuidos en las tres instancias antes mencionadas con el objeto de lograr el máximo de cobertura del sector porcino.

19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

(Adjuntar en Anexo B el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)

TRAYECTORIA DE LA EMPRESA :

Chile, hasta hace unos pocos años atrás, contaba a nivel comercial en general con laboratorios que realizaban métodos de diagnóstico tradicionales. Solamente en el área de la salud humana existía un par de laboratorios que habían incursionado en el diagnóstico molecular. Por lo tanto, no era una sorpresa que en el área acuícola los laboratorios de ictiopatología (patología de peces) utilizarán métodos de diagnóstico tradicionales para la detección de patógenos, con los cuales no eran capaces de detectar de modo certero y rápido la presencia de determinados patógenos, de modo de que resultaban poco eficientes para tomar las medidas sanitarias adecuadas para el control de las enfermedades de peces. Por este motivo, hace aproximadamente cuatro años, surgió la necesidad de crear DIAGNOTECH, centro de diagnóstico molecular de patógenos que utiliza tecnología de última generación como es el PCR para la detección de patógenos, cuyos servicios especializados han sido de gran utilidad para las empresas productoras de salmones y los laboratorios ictiopatológicos tradicionales, ya que esta tecnología de punta en tan sólo unas pocas horas obtiene resultados altamente sensibles y específicos superando con creces la calidad de los métodos de diagnóstico tradicionales

La introducción del diagnóstico molecular al mercado de salmones ha provocado un gran impacto a nivel de disminución de costos por muestra analizada, reducción en el tiempo de análisis, disminución de mortalidad, aumento de productividad, optimización del uso de antibióticos, etc. Con lo cual ha quedado claramente demostrado que la necesidad de contar con estos métodos estaba latente, pero la tecnología no estaba disponible en nuestro país. Sin embargo, al disponer de ellos, esta herramienta sanitaria ha sido rápidamente incorporada al proceso productivo especialmente en momentos tan fundamentales como el screening de reproductores, el traslado de smolts, etc.

DIAGNOTECH partió realizando investigación y servicio en el área acuícola, debido a la experiencia que tenían en esta área las gestoras de la empresa. Cabe destacar que el grupo de investigación dirigido por la Dra. Ana María Sandino (socia de la empresa) fue el primero en el mundo en desarrollar un método de diagnóstico para virus de peces mediante la técnica de PCR, por lo cual a la Dra. Sandino, la Fundación Internacional para la Ciencia con sede en Estocolmo, le otorgó el premio Rey Balduino, en reconocimiento al aporte realizado a la acuicultura mundial con el desarrollo de este tipo de métodos de diagnóstico para patógenos de peces. Además el año 1999 la Sra. Geraldine Mlynarz recibió el premio a la Mejor Empresaria Joven del Año, otorgado por el Banco BHIF y la Sección de Economía y Negocios de El Mercurio por los logros alcanzados en DIAGNOTECH.

Luego en nuestro laboratorio se han continuado desarrollando otros métodos para la detección de virus, bacterias y protozoos de peces a partir de tejidos, sangre y ovas de peces. Esto ha permitido consolidar a DIAGNOTECH como centro líder en la detección de patógenos de peces mediante técnicas moleculares de avanzada.

CAPACIDAD EMPRESARIAL





DIAGNOTEC se creó teniendo como objetivo a corto plazo concretizarse como un centro clínico dedicado a prestar servicios especializados de índole sanitario a todas a aquellas empresas relacionadas con el área acuícola. Actualmente hemos logrado por un lado, cumplir con las metas propuestas en la industria salmonera y por otro, la experiencia obtenida en el área del diagnóstico molecular a nivel comercial, nos ha dado las herramientas necesarias para poder continuar desarrollando nuevas áreas de diagnóstico, de modo de poder comenzar con un proceso de expansión y diversificación de la empresa. Además, se han presentado oportunidades muy interesantes para desarrollar nuevas líneas de investigación tanto en el área de la salud pública como en el agropecuaria. En relación al área de la salud pública, se ha implementado la tecnología de PCR desarrollada por Laboratorios Roche, grupo líder en investigación para el mejoramiento de la salud. Se cuenta con métodos de detección y monitoreo del virus del SIDA (HIV), y de infecciones relacionadas tales como, el virus de la Hepatitis A, B y C, Herpes, Citomegalovirus, Clamidas, Neiseria Gonhorrea, Tuberculosis, entre otros. El objetivo del centro es cubrir las necesidades diagnósticas globales de personas infectadas, de personas que deseen saber si presentan el virus HIV u otras infecciones. Además de ser la alternativa más moderna y eficiente de confirmación para los bancos de sangre, los cuales deben confirmar de modo obligatorio que la sangre está libre de HIV y Hepatitis C.

En relación al área agropecuaria, se está en una etapa de estudio e investigación de métodos de diagnóstico para patógenos del sector avícola, bovino y porcino.

Finalmente dado que DIAGNOTEC es una empresa biotecnológica sustentada en la investigación que realiza, ha recibido el apoyo financiero de entidades como CORFO para llevar a cabo algunos de los distintos proyectos de investigación que desarrolla. Para una empresa de este tipo es fundamental recibir ayuda financiera de las entidades pertinentes de modo de ir creando nuevas áreas, ir desarrollando nuevas ideas e ir creciendo como empresa, especialmente debido a que Chile es un país que aún está un poco lejano a la incorporación de herramientas moleculares y biotecnológicas en sus procesos productivos, lo que implica un camino mucho más lento que otros países. En consecuencia, apoyar a las empresas biotecnológicas, tan escasas, pero tan necesarias actualmente en nuestro país nos parece que nos hará ganar tiempo y nos permitirá avanzar con mayor rapidez.



19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

DIAGNOTEC cuenta con sus oficinas y con un laboratorio molecular montado e implementado, por lo que cuenta con una serie de equipos, tanto de laboratorio como de oficina, que van a ser facilitados a parcialidad para la correcta ejecución del proyecto, a continuación se detallan los equipos:

Area 1

Balanza de precisión

Vortex

Agitador magnético

Micropipetas

Refrigerador

Area 2

Baño termostático

Centrifuga ventilada

Centrifuga refrigerada

Vortex

Máquina de hielo

Microscopio Invertido

Multiparamétrico

Freezer

Refrigerador

Micropipetas

Autoclave

Estufa de secado

Termociclador

Lightcycler

Cámara de bioseguridad

Area 3

Fuente de poder

Cámara de gel

Cámara de minigel

Agitador magnético

Balanza

2.2.2. Equipos oficina

oficinas

2. Capacidad de gestión administrativo-contable.

DIAGNOTEC cuenta con personal administrativo (Administradora y contador) para la correcta administración del proyecto, los cuales se dedicarán en forma parcial durante la ejecución del proyecto. Además los coordinadores del proyecto tienen experiencia en proyectos, por lo que conocen las modalidades y las obligaciones relacionadas con la administración de fondos de financiamiento.





20. OBSERVACIÓN SOBRE POSIBLES EVALUADORES

(Identificar a el o los especialistas que estime inconveniente que evalúen la propuesta. Justificar)

Nombre	Institución	Cargo	Observaciones
Directivos y personal de Veterquímica	Veterquímica		Conflicto de intereses
Directivos y personal de BIOS CHILE	BIOS CHILE I.G.S.A.		Conflicto de intereses





ANEXO A

ANTECEDENTES DEL EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO



CURRICULUM VITAE



ANTECEDENTES GENERALES

Nombre : Ana María Sandino García

R.U.T. :

Fecha de Nacimiento : 1 de Noviembre de 1959 ✓

Lugar : Puerto Varas

Nacionalidad : Chilena

Sexo : Femenino

Estado Civil : Casada (un hijo)

Dirección : Av. Américo Vespucio Norte 1570. Dpto. 1203.
Vitacura.

Fono : 2074737

Educación Básica : Colegio Alemán de Puerto Varas (1965 - 1973).

Educación Media : Colegio Alemán de Puerto Montt. (1974 - 1977).

Educación de Pregrado : Licenciatura en Bioquímica y Bioquímica, Facultad de
Química y Farmacia, U. de Chile (1978-1982)

Título : Bioquímico obtenido en 1984.

Educación de Postgrado : Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad
de Ciencias U. de Chile (1986-1990).

Labor de Investigación : Estudio de virus asociados a patologías de peces en cultivo.

Cargo Actual : Profesor Asociado. Departamento de Ciencias
Biológicas. Facultad Química y Biología. Universidad de
Santiago de Chile

: Director científico Laboratorio de Diagnóstico Gam
Ltda.

Idiomas : Alemán e Inglés



ANTECEDENTES ACADEMICOS

PUBLICACIONES

Nacionales:

- Rol de la proteína Vp6 en la transcripción "in vitro" catalizada por la RNA polimerasa de rotavirus humano. Tesis de grado para optar al título de bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 1984.
- Estudio comparativo de dos métodos en el diagnóstico de rotavirus en lactantes con diarrea aguda y asintomáticos. Araya M., Spencer E., Brunser O., Espinoza J., Sandino A.M. Revista Chilena de Pediatría 56:441-444, 1985.
- Función de la cápside interna en la transcripción "in vitro" de rotavirus. Tesis de grado para optar al título de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. 1990.

Internacionales:

- In vitro transcription catalized by human pararotavirus. Jashés M., Sandino A.M., Faundez G., Avendaño L.F., Spencer E. Journal of Virology 57; 183-190, 1986.
- Role of the inner protein capsid on in vitro rotavirus transcription. Sandino A.M., Jashés M., Faúndez G., Spencer E. Journal of Virology 60; 797-802, 1986.
- Faecal excretion of rotavirus and other enteropatogens in newborns of the high and low socioeconomic stratum in Santiago, Chile. Spencer E., Araya M., Sandino A.M., Pacheco I., Brunser O. Epidemiology and Infection 101; 425-436, 1988
- Involvement of structural and nonstructural polypeptides on human rotavirus RNA synthesis. Sandino, A.M., Pizarro, J., Fellay, M.C., Fernández, J., Spencer, E. Arch. Biol. Med. Exp. 21: 381-392, 1988.
- Characterization of rotavirus electrophertotypes excreted by symptomatic and asymptomatic infants. Fernández, J., Sandino, A.M., Avendaño, L.F., Pizarro, J., Pizarro, J.M. Spencer, E. Epidemiology and Infection, 106: 189-198, 1991.
- Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated to polypeptide Vp3. Pizarro, J.L., Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Fernández, J. and Spencer, E. Journal of General Virology, 73: 325-332, 1991.
- Identification of rotavirus RNA polymerase by photoaffinity labeling with 8-azido adenosine triphosphate. Valenzuela, S., Fernández, J., Hernández, O., Pizarro, J., Sandino, A.M., Vásquez, M., Patton, J. and Spencer, E. Journal of Virology 65: 3964-3967, 1991



- Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. Pizarro, J.M., **Sandino, A.M.**, Pizarro, J.L., Fernández, J. and Spencer, E. *Virology* 184: 768-771, 1991.
 - Rotavirus detection by dot-blot hybridization assay using a non-radioactive synthetic oligodeoxynucleotide probe. Fernández, J., **Sandino, A.M.**, Yudelevich, A., Avendaño, L.F., Venegas, A., Hinrichsen, V. and Spencer E. *Epidemiology and Infection* 108: 175 - 184, 1992.
 - Respiratory Syncytial virus detection by dot blot hybridization with a nonradioactive synthetic oligodeoxynucleotide probe. Hernández, O., Fernández, J., Valenzuela, S., **Sandino, A.M.**, Pizarro, J., Vásquez, M., Yudelevich, A., and Spencer, E. *Journal of Medical Virology*. 37: 165 - 169, 1992.
 - Studies on the function of the rotavirus SA-11 VP3 Polypeptide on the viral morphogenesis using a thermosensitive mutant tsB. Vásquez M., **Sandino A.M.**, Pizarro J.M., Fernández J., Valenzuela S. and Spencer E. *Journal of General Virology* 74: 937-941, 1993.
 - In vitro reconstitution of rotavirus transcriptional activity using viral cores and recombinant baculovirus expressed Vp6. Kohli E., Pothier P., Labbe M., Cohen J., **Sandino A.M.** and Spencer E. *Archives of Virology* 133: 451-458, 1993.
 - Structure of rotavirus particle: Interaction of the inner capsid protein VP6 with the core polypeptide VP3. **Sandino A.M.**, Pizarro J., Pizarro J.M., Fernández J. and Spencer E.. *Biological Research*, 27:(1), 1994.
 - Inhibition of "in vitro" reconstitution of rotavirus transcriptionally active particles by anti-VP6 monoclonal antibodies. Kohli E., Pothier P., Tosser G., Cohen J., **Sandino A.M.** and Spencer E. *Archives of Virology* 135: 193-200, 1994.
 - Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) Detection Method based on reverse transcription (RT)-Polymerase chain reaction (PCR). López-Lastra M., González M., Jashés M. and **Sandino A.M.** *Journal of Fish Diseases* 17, 269-282, 1994.
 - Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the viral Genomic RNA as a Diagnostic method for Infectious Pancreatic Necrosis Virus Detection. Ganga M.A, González M., López-Lastra M. and **Sandino A.M.**, *Journal of Virological Methods* 50, 227-236, 1994.
 - First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) and Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry. Gaggero A., Castro H. and **Sandino A.M.** *Journal of Fish Diseases* 18, 277-279, 1995.
- Inhibitors of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication. Jashés M., González M., López Lastra M., de Clercq E. and **Sandino A.M.** *Antiviral Research* 29,309-312, 1996.
- Detection of infectious hematopoietic necrosis virus directly from infected fish tissue by dot blot hybridization with a non radioactive probe. González, M.P., Sánchez, X., Ganga, M.A.,



López-Lastra, M., Jashés M. and Sandino A.M.. Journal of Virological Methods 65,273-279, 1997

- Inhibitory effects of EICAR on infectious pancreatic necrosis virus replication. Jashés M., Mlynarz G., De Clercq E and Sandino A.M. Antiviral Research 2000.

-In vivo effect of EICAR on experimental infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*) fry with infectious pancreatic necrosis virus. Moya J., Pizarro H., Jashés M., De Clercq E and Sandino A.M. Antiviral Research 2000.

t-RNA genes were found in *Piscirickettsia salmonis* 16S-23S rDNA spacer region (ITS)
A. Casanova, J. Obreque, A.M. Sandino and M. Jashés
En prensa en FEMS Letters 2001.

- Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus provirions: a model for the morphogenesis of viral particles. Villanueva R., Galaz J., Valdés J.A., Jashés M. and Sandino A.M. En prensa en Journal of Virology 2001.

- Aquatic bacteria diagnosis by PCR from whole blood of infected fishes.
Mlynarz G., Jashés M., Obreque J. and Sandino A.M. Enviado a publicación a Journal of Fish Diseases 2001.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Congresos Nacionales:

a) Comunicaciones Cortas:

- XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Punta de Tralca 1983. Caracterización del genomio de rotavirus humano: Rol de partículas subvirales en la transcripción. Sandino A.M., Jashés M., Faúndez G. y Spencer E.

- VIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia 1984. Estudios del significado de los electroferotipos de rotavirus humano. Faúndez G., Jashés M., Sandino A.M. y Spencer E.

- VIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia 1984. Identificación y análisis estructural de pararotavirus humano. Jashés M., Sandino A.M., Faúndez G., Avendaño L.F. y Spencer E.



- VIII Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia 1984. Rol de la proteína VP6 en la transcripción in vitro de rotavirus humano. Sandino A.M., Jashés M., Faúndez G. y Spencer E.
- XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucón 1985. Regulación de la transcripción por proteínas estructurales en rotavirus humano. Sandino A.M. y Spencer E.
- XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. Santiago 1985. Estudio del significado de las variaciones electroforéticas del genomio de rotavirus humano. Spencer E., Sandino A.M. y Said A.
- IX Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1985. Reconstitución de la transcripción in vitro con diferentes aislados de rotavirus humanos. Sandino A.M. y Spencer E.
- IX Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1985. Excreción de rotavirus en recién nacidos. Spencer E., Sandino A.M., Araya M. y Avendaño L.F.
- XXX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. La Serena 1987. Función de la capsida interna en la transcripción "in vitro" de rotavirus humano. Sandino A.M. y Spencer E.
- XI Congreso Chileno de Microbiología. Concepción 1987. Excreción de rotavirus en lactantes con diarrea aguda y asintomáticos: infecciones nosocomiales. Fernández J., Sandino A.M., Avendaño L., Said A. y Spencer E.
- XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. La Serena 1988. Función de la proteína Vp6 de rotavirus humano como "Binding protein". Sandino, A.M.
- XII Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1988. Actividades asociadas a la proteína Vp6 de rotavirus humano. Sandino, A.M., Fellay, M.C., Pizarro, J.M., Fernández, J., Pizarro, J.L. y Spencer, E.
- XII Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1988. Hidrolisis de ATP durante la transcripción "in vitro" de rotavirus humano. Identificación de la actividad ATPasa. Pizarro, J.M., Fellay, M.C., Sandino, A.M., Fernández, J., Pizarro, J.L. y Spencer, E.
- XII Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1988. Caracterización de partículas subvirales de rotavirus SA-AA como intermediarios en el ciclo infeccioso del virus en células infectadas. Pizarro, J. L., Fernández, J., Fellay C., Pizarro, J.M., Sandino, A.M. y Spencer, E.
- Reunión extraordinaria de la Sociedad de Biología Celular. Santiago 1989. Función de la capsida interna en la transcripción de rotavirus. Sandino, A.M.
- XXXII Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Viña del Mar. 1989. Interacción del core viral con la proteína Vp6 en la transcripción de Rotavirus. Sandino, A.M.



- XIII Congreso de Microbiología. Viña del Mar 1990. Interrelación entre el core viral y la proteína Vp6 en la transcripción de Rotavirus. Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Pizarro, J.L., Fernández, J. y Spencer, E.
- XIII Congreso de Microbiología. Viña del Mar 1990. Inhibición de la transcripción y replicación de Rotavirus. Pizarro, J.M., Sandino, A.M., Pizarro, J.L., Fernández, J. y Spencer, E.
- XIV Congreso de Microbiología. Santiago 1991. Caracterización del polipéptido viral Vp3 de rotavirus como proteína multifuncional. Vásquez, M., Pizarro, J.M. Valenzuela, S., Sandino, A.M., Fernández, J., Hernández, O. y Spencer, E.
- XIV Congreso de Microbiología. Santiago 1991. Desarrollo de sondas para la detección de virus respiratorio sincicial. Hernández, O., Fernández, J., Pizarro, J.M., Sandino, A.M., Fernández, J., Hernández, O. y Spencer, E.
- XIV Congreso de Microbiología. Santiago 1991. Identificación de la RNA polimerasa RNA dependiente de rotavirus. Valenzuela, S., Pizarro, J.M., Vásquez, M., Sandino A.M., Fernández, J., Hernández, O. y Spencer, E.
- XIV Congreso de Microbiología. Santiago 1991. Efecto in vivo de análogos de nucleotidos sobre la transcripción y replicación de rotavirus. Pizarro, J.M., Valenzuela, S., Vásquez, M., Sandino, A.M., Fernández, J., Hernández, O. y Spencer, E.
- XIV Congreso de Microbiología. Santiago 1991. Región de la proteína Vp6 de rotavirus involucrada en la transcripción. Sandino, A.M., Pizarro, J.M., Valenzuela, S., Vásquez, M., Fernández, J., Hernández, O. y Spencer, E.
- XIV Congreso de Microbiología. Santiago 1991. El uso de una sonda oligonucleotídica sintética no radioactiva para la detección de rotavirus por hibridización. Fernández, J., Hernández, O., Pizarro, J.M., Sandino, A.M., Valenzuela, S., Vásquez, M., Yudelevich, A. y Spencer, E.
- XXXIV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1991 Transcripción "in vitro" del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV): Actividades enzimáticas asociadas a la transcripción.
Pizarro, J.M. y Sandino, A.M.
- XXXIV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1991. Desarrollo de un método de diagnóstico para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa.
Sandino A.M.
- XV Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1992. Geles de poliacrilamida: un método de detección para el virus de la necrosis pancreática infecciosa. Ganga, M.A., González, M. y Sandino, A.M.



- XV Congreso Chileno de Microbiología. Santiago 1992. Utilización de una sonda sintética para la detección del virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV). González M., Ganga, M.A. y **Sandino, A.M.**
- XXXV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1992. Detección del virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV) por hibridación de punto con una sonda oligodeoxinucleotídica sintética. González, M., Ganga, M.A., Sánchez, X. y **Sandino, A.M.**
- IX Congreso Científico de Estudiantes de Bioquímica. 1992. Identificación, Aislamiento y caracterización del virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV: Desarrollo de un método de diagnóstico. Ganga, M.A., González, M., Pizarro, J. y **Sandino, A.M.**
- IX Congreso Científico de Estudiantes de Bioquímica. 1992. Desarrollo de un método de diagnóstico para la detección del virus de la necrosis hematopoiética infecciosa en peces enfermos: Aislamiento e identificación del virus. González, M., Ganga, M.A., Pizarro, J. y **Sandino, A.M.**
- XXXVI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1993. Desarrollo de método diagnóstico para el virus de la necrosis hematopoiética infecciosa en peces infectados. González M., Sánchez X., y **Sandino, A.M.**
- XXXVI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1993. Método de detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa basado en la transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena. López-Lastra, M. y **Sandino, A.M.**
- XVI Congreso Chileno de Microbiología. 1994. Aplicación de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de virus asociados a enfermedades de peces. González M.P., López-Lastra M., Jashés M. y **Sandino A.M.**
- XXXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1994. Efecto de antivirales sobre la replicación del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Jashés, M. y González, M.P. Patrocinio: **Sandino, A.M.**
- XXXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1994. Estudio de la síntesis de RNA del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) in vitro. Guacucano, M. y **Sandino, A.M.**
- XXXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1994. Aplicación de RT-PCR en la detección del virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV): Comparación con la hibridación en punto. López-Lastra, M., González, M., Sánchez, X. y **Sandino, A.M.**
- XVII Congreso Chileno de Microbiología. 1995. Identificación de la RNA polimerasa dependiente del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Guacucano M. and **Sandino A.M.**



- XXXVIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1995. Efecto del antiviral 5-Etinitil-1-B-D-Ribofuranosilimidazol-4-carboxamida (EICAR) sobre la replicación del virus de la necrosis pancreática infecciosa, en cultivo celular. Jashés, M. Patrocinio: **Sandino, A.M.**
- XXXVIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1995. Identificación de subpartículas virales en células CHSE-214 infectadas con el virus de la necrosis pancreática infecciosa. Villanueva R. y **Sandino, A.M.**
- XVIII Congreso Chileno de Microbiología. 1996. Método de detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa mediante la técnica de RT-PCR a partir de sangre de pez infectado. Mlynarz G. y **Sandino A.M.**
- XVIII Congreso Chileno de Microbiología. 1996. Uso de antivirales para el estudio de la replicación del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Jashés M. y **Sandino A.M.**
- XVIII Congreso Chileno de Microbiología. 1996. Aislamiento y caracterización de las partículas del virus de la necrosis pancreática infecciosa en células CHSE-214. Villanueva R. y **Sandino A.M.**
- XXXIX Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile 1996. Estudio de la transcripción "in vitro" del virus de la necrosis pancreática infecciosa. González M. y **Sandino, A.M.**
- XXXIX Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. 1996. Estudio "in vitro" de antivirales que inhiban la multiplicación del virus de la necrosis pancreática infecciosa en células CHSE-214. Hueche A., Zuñiga G., Villanueva R. y **Sandino, A.M.**
- XIX Congreso Chileno de Microbiología. 1997. **Sandino A.M.**
- XXXX Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile 1997 **Sandino, A.M.**
- XX Congreso Chileno de Microbiología. 1998. **Sandino A.M.**
- XXXXI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile 1998 **Sandino, A.M.**
- XXI Congreso Chileno de Microbiología. 1999. **Sandino A.M.**
- XXXXII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile 1999 **Sandino, A.M.**
- XXII Congreso Chileno de Microbiología. 2000. **Sandino A.M.**
- XXXXIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile 2000 **Sandino, A.M.**



b) Simposios:

- "Microbiología y Acuicultura" Asociación Chilena de Microbiología de Chile, Santiago 1992. Patógenos virales en Salmones y Truchas. Sandino, A.M.
- Ciclo de Conferencias, Biotecnología una realidad del presente ANEB, Santiago 1992. Desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección de virus asociados a enfermedades de peces en cultivo. Sandino, A.M., Ganga, M.A., Gonzalez, M.P.
- Simposio ANEB, Perspectivas de la Bioquímica para el desarrollo nacional, Santiago 1994. Diagnóstico y Control de Enfermedades Asociadas a peces de Cultivo. Sandino, A.M.
- XX Congreso Chileno de Microbiología. Viña del Mar 1998. Utilización de técnicas moleculares para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Sandino A.M.
- Congreso Chileno de Química Clínica La Serena 1999. Aplicación de Técnicas de Diagnóstico molecular a la detección de patógenos de peces. Sandino A.M.
- Simposio ANEB, Valparaíso 2000. Prevención y Control del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Sandino, A.M.

Congresos Internacionales

a) Comunicaciones cortas

- International Symposium on double stranded RNA viruses. Oxford, Inglaterra 1986. The role of VP6 on human rotavirus transcription. Sandino A.M. and Spencer E.
- International Symposium on double stranded RNA viruses. Oxford, Inglaterra 1986. In vitro pararotavirus transcription Jashés M., Sandino A.M. and Spencer E.
- XXIV Reunión Anual de la Sociedad Latinoamericana de Investigaciones Pediátricas. Angra Dos Reis - Rio de Janeiro, Brasil 1986. Contamination of newborns with enteropatogens. Araya M., Sandino A.M., Figueroa G., Espinoza J., Brunser O. y Spencer E.
- I Taller Latinoamericano de Virología Molecular. Santiago, Enero 1987. Control de transcripción in vitro por proteínas estructurales en rotavirus humano. Sandino A.M., Pizarro J. y Spencer E.
- IUB International Symposium: Informational Macromolecular Interaction. Santiago 1988. Involvement of structural and nonstructural polipeptides on human rotavirus RNA synthesis. Sandino, A.M., Pizarro, J.L., Fellay, M.C., Fernández, J. and Spencer, E.



- V Congreso PAABS Cono Sur. Córdoba, Argentina 1988. Identificación del genomio de rotavirus como método de diagnóstico. **Sandino, A.M.**, Fellay, M.C., Pizarro, J.M., Fernández, J., Pizarro, J.L. y Spencer, E.
- International Meeting on Molecular Genetics of the Rotaviruses. Jouy-en-Josas, Francia 1989. Transcription of Rotaviruses. Spencer, E., **Sandino, A.M.**, Fernández, J., Pizarro, J.L., Pizarro, J.M., y Fellay, M.C..
- IXth International Congress of Virology, Glasgow, UK 1993. Function of rotavirus VP3 and Vp6 polypeptides on viral morphogenesis. Vásquez, M., **Sandino, A.M.**, Fernández, J., Ríos, M. and Spencer, E.
- IXth International Congress of Virology, Glasgow, UK 1993. Polimerase chain reaction (PCR) amplification of a mayor capsid gene sequence of infectious pancreatic necrosis virus. López M., Ganga M.A., Sánchez X., González M. and **Sandino A.M.**,
- II Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Ecuador 1993. The application of molecular biological techniques in the diagnosis of IPN and IHN viruses. **Sandino A.M.**, Invitada por IFS.
- Seventh International Conference of comparative and applied Virology. Montreal, Quebec, Canada, 1994. Detection of infectious hematopoietic necrosis virus directly from infected fish tissue by dot blot hybridization with a non radioactive probe. González M., Sánchez M., López-Lastra M., Jashés M., Spencer E. and **Sandino A.M.**
- Eighth International Conference on Antiviral Research. Santa Fé New México, USA, 1995. Antiviral effect on infectious necrosis pancreatic virus replication. Jashés M. and **Sandino A.M.**
- Xth International Congress of Virology, Jerusalem, Israel 1996. Effect of the antiviral EICAR on the infectious pancreatic necrosis virus replication in cell culture. Jashés M. and **Sandino A.M.**
- Xth International Congress of Virology, Jerusalem, Israel 1996. Isolation and characterization of the infectious pancreatic necrosis virus obtained during the infective cycle in CHSE-214 cells . Villanueva R. and **Sandino A.M.**
- IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Coquimbo, Chile. 1996. diagnóstico del virus IPN mediante la técnica de RT-PCR a partir de sangre de pez infectado. Mlynarz G. y **Sandino A.M.**. Invitada por IFS
- VIII PABMB Congress. Pucón, Chile 1996. Infectious necrosis pancreatic virus morphogenesis in CHSE-214 cells. Villanueva R. and **Sandino A.M.**



- XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia 1999. Antiviral effect of natural extract on the infectious pancreatic necrosis virus replication. Jashés M, Zuñiga G. and **Sandino A.M.**
- XIth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish". Isla Rodas, Grecia 1999. Electrophoretic analysis of *Piscirickettsia salmonis* 16S-23S rDNA spacer region (ITS). Jashés M., Casanova A., Obreque J. and **Sandino A.M.**
- International Symposium on double stranded RNA viruses. Aruba 2000. - Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus provirions: a model for the morphogenesis of viral particles. Villanueva R., Galaz J., Valdés J.A., Jashés M. and **Sandino A.M.**

b) Simposios:

- Seventh International Conference "Diseases of Fish and Shellfish". Palmas de Mallorca, España, 1995. The application of PCR and Dot Blot Hybridization for IPNV and IHNV viruses diagnosis. **Sandino A.M.** Invitada por The European Association of Fish Pathologists
- Seminario Internacional "Patologías y Nutrición en el Desarrollo de la Acuicultura: Factores de éxito". Organizado por Fundación Chile, Puerto Montt, Octubre 1994. Actualización en el diagnóstico y control de virosis en salmonídeos: uso de técnicas moleculares y compuestos antivirales. **Sandino A.M.** Invitada por Fundación Chile.

PROYECTOS DE INVESTIGACION

- Proyecto DIB # B 1507-854
Mecanismos de regulación de la transcripción en rotavirus humano: Análisis de la variabilidad genética.
Co-investigador. (1983-1984).
- Proyecto DIB # B 2175-8734
Biología molecular de rota y pararotavirus.
Co-investigador (1985 - 1989)
- Proyecto Fondecyt # 0153
Expresión génica de rotavirus: Caracterización del ciclo infectivo.
Co-investigador (1987-1988)
- Proyecto Fondecyt # 398-88
Desarrollo de sondas moleculares no radiactivas para el diagnóstico rápido de virus y bacterias patogénicas.



Co-investigador. (1988-1990).

- Proyecto Fondecyt # 1017
Estudio de los Mecanismos de Replicación, Transcripción y Expresión del Genomio de Rotavirus.
Co-investigador. (1989-1991).
- Proyecto del Fondo de Estudios Avanzados de la U. de Chile.
Programa de Desarrollo de la Virología asociada a Patologías de Peces de Cultivo.
Co-investigador. (1990-1992).
- Proyecto de la Fundación Andes C-11001
Identificación y diagnóstico de patógenos bacterianos y virales en salmones y truchas en cultivo.
Investigador responsable de la sección virología. (1991-1992)
- Proyecto de International Foundation for Science A/1844-1
Isolation and characterization of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Chilean hatcheries: Development of an ELISA assay.
Investigador responsable. (1992-1993)
- Proyecto Fondecyt 92-1065
Desarrollo de Métodos de diagnóstico para la detección de virus asociados a enfermedades de peces en cultivo
Investigador responsable. (1992 - 1994).
- Proyecto de International Foundation for Science. A/1844-2
Development of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) detection method by polymerase chain reaction.
Investigador responsable. (1993 - 1994)
- Proyecto FONDECYT 2940006 para estudiantes de Doctorado.
Estudio del ciclo infectivo del virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV, mediante la utilización de antivirales.
Director de tesis. (1994-1995)
- Proyecto de The Third World Academy of Sciences.
Identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)'S RNA dependent RNA polymerase (RdRp).
Investigador responsable. (1994 - 1995).
- Proyecto de Capacitación 102-95-002 USACH
Capacitación de Ictiopatólogos para el diagnóstico viral.
Investigador responsable. (1995-1996)



- Proyecto FONDECYT 1950257
Estudio de la transcripción y replicación del virus de la necrosis pancreatica infecciosa (IPNV).
Investigador responsable. (1995-1997)
- Proyecto DICYT 02-9643SG
Aislamiento y caracterización de subpartículas del virus de la necrosis pancreatica infecciosa (IPNV) obtenidas en células CHSE-214.
Investigador responsable (1996-1998)
- Proyecto FONTEC
Desarrollo e implementación de un método de diagnóstico mediante PCR para el virus de la necrosis pancreatica infecciosa en sangre y ovas infectadas.
Investigador responsable (1996-1998)
- Proyecto FONDECYT 1980634
Análisis de la región espaciadora 16-23S del locus *rrn* de distintos aislados de *Piscirickettsia salmonis* y su correlación con la patogenicidad
Investigador alterno (1998-1999)
- Proyecto FONDAP Oceanografía y Biología Marina
Estudios básicos y aplicación de biotecnología para el control de enfermedades y manejo reproductivo-genético de peces.
Investigador Responsable (1997-2000)
- Proyecto FONDEF
Desarrollo de compuestos con actividad antibacteriana y/o antiviral para el tratamiento y control de *Psirickettsia salmonis* y virus IPN en salmónidos.
Investigador alterno (1998-2000)
- Proyecto DICYT
Estudio de la replicación y morfogenesis del virus de la necrosis pancreatica infecciosa (IPNV) en células CHSE-214.
Investigador responsable (1999-2001)
- Proyecto FONTEC
Implementación y Validación de la tecnología de diagnóstico del Laboratorio ROCHE para la detección por PCR del virus HIV y Hepatitis C.
Investigador responsable (2000-2001)
- Proyecto FONDECYT 1010024
Estudio de la replicación del genoma y su relación con la morfogenesis del virus de la necrosis pancreatica infecciosa (IPNV).
Investigador responsable (2001-2003)



DOCENCIA

Pre-grado

- Curso de Microbiología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1989 2 clases de Biología Molecular de Virus Animales.
- Curso de Microbiología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1990. 2 clases de Biología Molecular de Virus Animales.
- Profesor Encargado del curso electivo de Biología Molecular de Virus Animales para estudiantes de Bioquímica de la Universidad de Santiago. Primer Semestre 1990, 2 horas semanales.
- Profesor encargado del curso electivo de Biología Molecular de Virus Animales para estudiantes de Bioquímica de la Universidad de Santiago. Segundo Semestre 1991. 2 horas semanales.
- Profesor encargado del curso electivo de Biología Molecular de Virus Animales para estudiantes de Bioquímica de la Universidad de Santiago. Segundo Semestre 1992. 2 horas semanales.
- Curso de Microbiología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1992. 2 clases de Biología Molecular de Virus Animales.
- Profesor encargado del curso electivo de Biología Molecular de Virus Animales para estudiantes de Bioquímica de la Universidad de Santiago. Segundo Semestre 1993. 2 horas semanales.
- Profesor encargado del curso de Patología de organismos acuáticos para estudiantes de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Andrés Bello, 1 Semestre 1994. 4 horas semanales.
- Profesor encargado del curso electivo de Biología Molecular de Virus Animales para estudiantes de Bioquímica de la Universidad de Santiago. Segundo Semestre 1994. 2 horas semanales.
- Profesor encargado del curso de Patología de peces para estudiantes de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Andrés Bello, 2 Semestre 1994. 4 horas semanales.
- Profesor encargado del curso de Patología de organismos acuáticos para estudiantes de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Andrés Bello, Primer Semestre 1995. 4 horas semanales.
- Profesor encargado de los Seminarios del curso de Bioquímica para estudiantes de Medicina de la U. de Santiago de Chile. Primer Semestre 1995. 4 horas semanales.



- Profesor encargado de los Seminarios y Trabajos prácticos del curso de Bioquímica para estudiantes de Medicina de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1995. 6 horas semanales.
- Curso de Microbiología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1995 2 clases de Biología Molecular de Virus Animales.
- Taller de Biotecnología II: Biotecnología en Acuicultura para estudiantes de la carrera de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile. 1 clase de Detección de patógenos de peces. Segundo semestre 1995.
- Profesor Encargado del curso electivo de Biología Molecular de Virus Animales para estudiantes de Bioquímica de la Universidad de Santiago. Primer Semestre 1996, 2 horas semanales.
- Curso de Bioquímica III para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 1996. 4 trabajos prácticos de Biología molecular de 4 horas cada uno.
- Profesor encargado del curso de Patología de organismos acuáticos para estudiantes de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Andrés Bello, Primer Semestre 1996.
- Curso de Medicina Molecular para estudiantes de Medicina de la Universidad de Santiago de Chile. Primer semestre 1996. 4 clases de agentes infecciosos, diagnóstico molecular y quimioterapia.
- Profesor encargado del curso de Bioquímica para estudiantes de Obstetricia de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1996. 4 horas semanales.
- Curso de Medicina Molecular para estudiantes de Medicina de la Universidad de Santiago de Chile. Segundo semestre 1996. 4 clases de agentes infecciosos, diagnóstico molecular y quimioterapia.
- Curso de Bioquímica III para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 1996. 3 trabajos prácticos de Biología molecular de 4 horas cada uno.
- Taller de Biotecnología II: Biotecnología en Acuicultura para estudiantes de la carrera de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile. 1 clase de Detección de patógenos de peces. Segundo semestre 1996.
- Curso de Medicina Molecular para estudiantes de Medicina de la Universidad de Santiago de Chile. Primer semestre 1997. 4 clases de agentes infecciosos, diagnóstico molecular y quimioterapia.
- Profesor encargado del Curso de Bioquímica III para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre 1997. 4 horas semanales.



- Taller de DNA recombinante para estudiantes de la carrera de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile. 1 clase de Biotecnología en patología de peces. Primer semestre 1997.
- Trabajos prácticos del curso de Bioquímica para estudiantes de Bachillerato y Medicina de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1997. 4 horas semanales.
- Profesor encargado del Curso de Bioquímica III para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre 1998. 4 horas semanales
- Trabajos prácticos del curso de Bioquímica para estudiantes de Bachillerato y Medicina de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1998. 4 horas semanales.
- Taller de Biotecnología II: Biotecnología en Acuicultura para estudiantes de la carrera de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile. 1 clase de Detección y control de patógenos de peces. Segundo semestre 1998.
- Curso de Bioquímica III y Biología Molecular II para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 1999. 3 trabajos prácticos de Biología molecular de 4 horas cada uno.
- Profesor encargado del Curso de Biología Celular II para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 1999. 1/3 del curso, 6 horas de clases semanales.
- Trabajos prácticos del curso de Bioquímica para estudiantes de Bachillerato y Medicina de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1999. 4 horas semanales.
- Profesor encargado del curso de Virología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1999. 2 horas semanales.
- Taller de Biotecnología II: Biotecnología en Acuicultura para estudiantes de la carrera de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile. 1 clase de control de patógenos de peces. Segundo semestre 1999.
- Curso de Microbiología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 1999 2 clases de Biología Molecular de Virus Animales.
- Profesor encargado del Curso de Biología Celular II para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 2000. 1/3 del curso, 6 horas de clases semanales.
- Curso de Biología Molecular II para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 2000. 3 trabajos prácticos de Biología molecular de 4 horas cada uno.
- Trabajos prácticos del curso de Bioquímica para estudiantes de Bachillerato y Medicina de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 2000. 4 horas semanales.



- Profesor encargado del curso de Virología para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Segundo Semestre 2000. 2 horas semanales.

- Curso de Biología Molecular II para estudiantes de Bioquímica de la U. de Santiago de Chile. Primer semestre de 2001. 6 horas semanales.

Dirección Tutorial :

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia de la U. de Chile. Alumno: Altamiro Piña. Segundo Semestre 1986.

- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación de Plan de Estudios de Licenciatura en Biología de la Universidad de Talca. Alumno: Jorge Fernández. Primer Semestre 1987.

- Dirección Tutorial de la Práctica de Investigación de la carrera de Bioquímica de la Facultad de Química y Farmacia de la U. de Chile. Alumna: Nora Morgado, Primer semestre 1992.

- Dirección Tutorial de la práctica de investigación de la Carrera de Bioquímica de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumna: Nora Vergara, 1 mes 1993.

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumna: Laura Salas, Segundo Semestre 1993.

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumna: Alejandra Loyola, Segundo Semestre 1993.

- Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumno: Claudio Brain, Primer Semestre 1994.

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumno: Rodrigo Villanueva, Segundo Semestre 1994.

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumna: Lorena Marchant. Segundo Semestre 1995.

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumna: Andrea Hueche. Segundo Semestre 1995.

- Dirección Tutorial del trabajo práctico del curso de Microbiología II de la Facultad de Química y Farmacia, U. de Chile. Alumno: José Galaz. Segundo Semestre 1996.



Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumno: Javier Moya. Segundo Semestre 1996.

- Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumno: Hernán Pizarro. Segundo Semestre 1996.

- Dirección Tutorial de la Práctica de Investigación de la carrera de Biología Marina de la Universidad Arturo Prat de Iquique. Alumno: Cristian Galaz. Primer semestre 1997.

- Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumno: Boris Steidle. Segundo Semestre 1998.

- Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumno: Mauricio López. Primer Semestre 1999.

- Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumna: Cecilia Hevia. Primer Semestre 1999.

- Dirección Tutorial de la práctica de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello, Alumno: Daniel Pollak. Segundo Semestre 1999.

Tesis de Pre-Grado

- Director de la Tesis: Desarrollo de un método de diagnóstico para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas Universidad de Santiago.
Alumno: María Angélica Ganga.
Fecha de inicio : Agosto de 1991.
Fecha de término: Enero de 1993.

- Director de la Tesis: Caracterización del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa: desarrollo de un método de diagnóstico. Para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Químicas Universidad de Santiago.
Alumno: Marcela González.
Fecha de inicio : Agosto de 1991.
Fecha de término: Octubre 1993.



- Director de la Tesis: Desarrollo de un método de diagnóstico directo para la detección de IPNV. Para optar al título de Bioquímico. Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
Alumno: Marcelo López
Fecha de Inicio : Julio 1992
Fecha de Término: Abril 1994
- Director de la Tesis: Estudio de la síntesis de RNA del virus IPN "in vitro". Para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad de Santiago.
Alumno: Maritza Guacucano
Fecha de Inicio : Enero 1994
Fecha de Término: Enero 1995
- Director de la Tesis: Método de detección de IPNV mediante la técnica de RT-PCR a partir de sangre de pez infectado. Para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Fac. de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile,
Alumno: Geraldine Mlynarz
Fecha de Inicio : Marzo 1995
Fecha de Término: Abril 1996
- Director de la Tesis: Caracterización molecular de subpartículas del virus IPN obtenidas en células CHSE-214. Para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
Alumno: Rodrigo Villanueva
Fecha de Inicio : Marzo 1994
Fecha de Término: Noviembre 1996
- Director de la Tesis: Estudio del efecto del antiviral EICAR en salmones, truchas y turbot infectados con el virus IPN. Para optar al título de Ingeniero en Acuicultura de la Universidad Nacional Andres Bello.
Alumnos: Javier Moya y Hernán Pizarro
Fecha de Inicio : Septiembre 1996
Fecha de Término: Octubre 1997
- Director de la Tesis: Estudio in vitro de antivirales que inhiban la replicación del virus IPN en células CHSE-214. Para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
Alumno: Andrea Hueche
Fecha de Inicio : Marzo 1996
Fecha de Término: Diciembre 1998
- Director de la Tesis: Estudio del efecto de los antivirales EICAR, Acivicin y compuestos naturales en truchas naturalmente infectadas con el virus IPN. Para optar al título de Ingeniero en Acuicultura de la Universidad Nacional Andres Bello.
Alumnos: Jorge Torres y Boris Steidle



Fecha de Inicio : Abril 1998
Fecha de Término: Enero 1999

- Director de la Tesis: Estudio de la dependencia de la replicación y morfogenesis del virus IPN mediante el uso de inhibidores. Para optar al título de Bioquímico, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.
Alumno: Juan Antonio Valdés
Fecha de Inicio : Agosto 1998
Fecha de Término: Enero 2000

- Director de la Tesis: Estudio de la morfogenesis del virus IPN en células CHSE-214. Para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
Alumno: José Galaz
Fecha de Inicio : Abril 1997
Fecha de Término: Marzo 2000

- Director de la Tesis: Estudio in vivo del efecto del compuesto antiviral Acivicin en alevines de salmón del atlántico infectados experimentalmente con el virus IPN. Para optar al título de Ingeniero en Acuicultura de la Universidad Nacional Andres Bello.
Alumnos: Cecilia Hevia y Daniel Pollak
Fecha de Inicio : Agosto 1999
Fecha de Término: Julio 2000

- Director de la Tesis: Implementación de técnicas de cultivo celular y de PCR para el diagnóstico del virus ISA. Para optar al título de Ingeniero en Acuicultura de la Universidad Nacional Andres Bello.
Alumna: Rocío Torres
Fecha de Inicio : Enero 2000
Fecha de Término: -----

- Director de la Tesis: Estudio de la respuesta inmune de truchas arcoiris vacunadas con capsides vacías o proviriones del virus IPN. Para optar al título de Bioquímico, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.
Alumna: Andrea Rivas
Fecha de Inicio : Enero 2000
Fecha de Término: -----



Post-grado:

- Curso Técnicas de Laboratorio Bioquímico. (MN 102). Programa de magister en Nutrición Humana. INTA U. de Chile. (1987).
Trabajo práctico de Técnicas de Diagnóstico de Rotavirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1988. Clases y Seminario de Reo y Rotavirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1989. Clases y Seminario de Reo y Rotavirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1990. Clases y Seminario de Reo y Rotavirus.
- Seminarios de Bioquímica. Magister en Ciencias de la Nutrición. Mención Nutrición Humana. Segundo Semestre 1990. Seminarios de Ingeniería Genética; Transcripción y Replicación del DNA. (2 horas cada uno).
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1991. Clases y Seminario de Reo y Rotavirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1992. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.
- Seminarios de Bioquímica. Magister en Ciencias de la Nutrición. Mención Nutrición Humana. Segundo Semestre 1990. Seminarios de Ingeniería Genética; Transcripción y Replicación del DNA. (2 horas cada uno).
- Curso Internacional de Técnicas modernas en Biotecnología Acuática. 6 al 22 de Enero de 1992. Docente de Trabajo Práctico.
- Profesor encargado de los Seminarios del Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología área Microbiología Patologías de peces, 3 horas semanales, 2 Semestre 1992.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1994. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.



- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1995. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1996. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1997. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1998. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 1999. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.
- Curso Biología Molecular de Virus Animales. Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, U. de Chile. Segundo Semestre 2000. Clases y Seminario de Birna y Rhabdovirus.

Dirección Tutorial:

- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación "Establecimiento de las condiciones de cultivo de las células CHSE-214 y propagación del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa" del programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias U. de Chile. Alumna: Maritza Rios. Primer Semestre 1991.
- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación " Estudio de la transcripción y replicación del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa" del programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias U. de Chile. Alumna: Jacqueline Pizarro. Segundo semestre 1991.
- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación "Desarrollo de un método de diagnóstico para la Piscirickettsia salmonis" del programa de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias U. de Chile. Alumna: Marcela Paz González Toro. Segundo semestre 1994.
- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación " Diagnóstico por RT-PCR del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa a partir de sangre de peces infectados experimentalmente" del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas con mención en Zoología. Universidad de Concepción. Alumna: Maritza Leonardi Primer semestre 1999.



- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación "Infecciones experimentales de alevines de trucha arcoiris diploides y triploides con virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa." del programa de Magister en Acuicultura de la U. de Chile. Alumna: Geraldine Larroquette Primer semestre 1999.

- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación " Optimización del diagnóstico por RT-PCR del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en ovas" del programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias U. de Chile. Alumno: Jaime Romero. Segundo semestre 1999.

- Dirección Tutorial de la Unidad de Investigación " Evaluación del efecto antiviral de extractos de plantas naturales sobre la replicación del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa" del programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias U. de Chile. Alumna: Johanna Obreque. Primer semestre 2000.

Tesis de Doctorado

- Director de la Tesis: Estudio del ciclo infectivo del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) mediante la utilización de antivirales. Doctorado en Ciencias Mención Biología, Facultad de Ciencias. U. de Chile.
Alumna : Matilde Jashés
Fecha de Inicio : Abril 1993
Fecha de Término: Noviembre 1996

- Director de la Tesis: Estudio de secuencias IRES en el genoma del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). Doctorado en Ciencias Mención Biología, Facultad de Ciencias. U. de Chile.
Alumna : Geraldine Mlynarz
Fecha de Inicio : Agosto 2000
Fecha de Término: -----



EXTENSION

-Seminario Teórico Práctico sobre las bases Genéticas Asociadas a la Virulencia de Enteropatógenos. IV Escuela de Invierno del INTA U. de Chile. (1986).

-Artículo: Virus Animales. Sandino, A.M. Cuadernos de Ciencias, Revista Creces 1990; Vol. 11 N 8.

-Curso Detección de agentes bacterianos y virales asociados a Patologías de peces. 26 Octubre al 20 de Noviembre 1992.

- Curso de Perfeccionamiento: Bioquímica Celular y Molecular y Fisiología Celular. INTA, U. de Chile, 11 al 23 de Enero 1993 Clases de Síntesis de Proteínas

- Primeros Coloquios de patología de peces. Métodos diagnósticos para el virus de la Necrosis pancreática infecciosa (IPNV), Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Enero 27, 1993.

-Seminario "Detección del virus IPN mediante PAGE"., BIOS CHILE IGSA, Junio 1993.

- Seminario "Diagnóstico de IPNV en salmón., Fundación Empresarial Comunidad Europea Chile, EUROCHILE 1993.

-Curso Detección de Agentes virales asociados a patologías de peces. Enero 1994.

- Seminario "Biología Molecular de virus asociados a patologías de peces". Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias y Biología Molecular, U. de Chile. Julio 1994

- Seminario "Desarrollo de métodos de diagnóstico para la detección de los virus IPN e IHN", BIOS CHILE IGSA, 1994

-Curso Detección de Agentes virales asociados a patologías de peces. Agosto 1995.

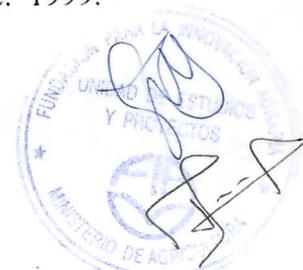
- Seminario "Diagnóstico y Control de enfermedades virales de peces". Departamento de Biología, facultad de Química y Biología, U. de Santiago de Chile. Julio 1995

-VI Coloquios de Microbiología 1996 "Diagnóstico Molecular y Utilización de Antivirales para el control de enfermedades de peces".

-Artículo en Chile Pesquero, 1998. Realidad del virus IPN en Chile.

- Seminario "Estudio del ciclo infectivo del virus de la necrosis pancreática infecciosa". Departamento de Biología, facultad de Química y Biología, U. de Santiago de Chile. 1999.

-Artículo en la segunda revista Bioplanet, 2000. Biotecnología en salmones.



-Jornadas de la Asociación de Productores de Salmones y Truchas A.G. Situación actual del virus IPN en Chile. 2000. Diagnóstico del virus IPN mediante la técnica de PCR.

-Artículo en Salmonoticias, 2000. Implicancias del conocimiento del genoma de los organismos.

-Artículo en la revista Bioplanet: Avances en los métodos de diagnóstico molecular.

PERFECCIONAMIENTO

- Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias U.de Chile. (1986 - 1990).

CURSOS DE POST-GRADO REALIZADOS

- Curso Internacional: Hibridomas en Biología Celular y Biotecnología (Anticuerpos Monoclonales). Facultad de Ciencias Biológicas Pontificia U. Católica de Chile. 1985.
Profesor: Dr. Alfredo de Ioanes.

- Biología Celular Avanzada. Facultad de Ciencias U. de Chile 1986.
Profesor: Dr. Juan Fernández.

- Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias U. de Chile 1986
Profesor: Dr. Luis Izquierdo

- Genética Molecular. Facultad de Ciencias U. de Chile 1986.
Profesores: Dra. Rosalba Lagos y Dr. Eugenio Spencer.

- Matriz Extracelular. Facultad de Ciencias U. de Chile 1986.
Profesor: Dr. José Minguell.

- Inmunología Avanzada. Facultad de Ciencias U. de Chile 1987.
Profesor: Dr. Mario Rosenblatt.

- Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias U. de Chile 1987.
Profesor: Dr. Carlos Doggenweiler.

- Genética del Desarrollo. Facultad de Ciencias U. de Chile 1987.
Profesor: Dr. Luis Izquierdo y Madelein Lamborot.

- Genética Fisiológica. Facultad de Ciencias U. de Chile 1987.
Profesor: Dr. Guido Pincheira.

- Seminarios de Biología Celular. Facultad de Ciencias U. de
Profesor: Dr. Luis Izquierdo

Chile 1988.



- Seminarios de Parasitología. Facultad de Ciencias U. de Chile 1989.
Profesor: Dr. Aldo Solari y Dr. Arturo Ferreira.
- 1er. Jornada Internacional de post-grado sobre nutrición y alimentación de peces.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias 1991.

ESTADIAS DE PERFECCIONAMIENTO ✓

- Laboratorio del Dr. Danny Reinberg.
Departamento de Bioquímica, Universidad de Medicina y Dentística de New Yersey.
New Yersey EE.UU. Mayo 1989.
- Laboratorio del Dr. John Patton.
Departamento de Microbiología e Inmunología. Universidad de Miami. Miami
EE.UU. Junio y Julio 1989.
- Laboratorio del Dr. Pierre Pothier
Laboratorio de Virología. Centre Hospitalier Regional et Universitaire de Dijon. Hospital
du Bocage. Dijon. Francia. Mayo y Junio 1992.

OTROS ANTECEDENTES Y/O ACTIVIDADES

Miembro de Sociedades Científicas:

- Sociedad de Biología de Chile desde 1987.
- Asociación Chilena de Microbiología A.G. desde 1990
- The European Association of Fish Pathologists desde 1994.
- Miembro del Scientific Advisory Committee de la International Foundation of Science
- Miembro del Programa de Doctorado en Ciencias del subcomité de Microbiología, programa conjunto de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile y de la Facultad de Química y Biología de la U. de Santiago de Chile.
- Miembro del comité de acreditación del Ministerio de Educación de Chile para los programas de Bioquímica. (Representante de la U. de Santiago de Chile)
- Miembro del Programa de Doctorado en Química de la Facultad de Química y Biología de la U. de Santiago de Chile.



- Miembro del Comité de Biología, Química y Medicina del Departamento de Investigación científica y Tecnológica de la U. de Santiago de Chile (DICYT).
- Miembro de la comisión de investigación del Departamento de Biología y de la Facultad de Química y Biología de la U. de Santiago de Chile.
- Miembro de la comisión de apelación de la Facultad de Química y Biología de la U. de Santiago de Chile.
- Miembro del Comité Editorial de la Revista Acta Microbiológica, publicación de la Asociación Chilena de Microbiología.
- Miembro del Directorio del Laboratorio de Diagnóstico Gam Ltda.

Asesorías a:

- Fundación Chile
- Empresa Pesquera Isla Grande S.A.

BECAS Y PREMIOS ✓

Beca Fundación Andes para estudiantes de Doctorado (1987 - 1990).

- Premio Rey Balduino otorgado en Noviembre de 1995 por la International Foundation of Science, por realizar investigación de calidad en países subdesarrollados.



CURRICULUM VITAE

I.- Antecedentes Generales:

a) Antecedentes personales:

Nombre : Geraldine Mlynarz Zylberberg.
Fecha de nacimiento : 9 de junio de 1972.
Lugar de nacimiento : Santiago.
Rut :
Nacionalidad : Chilena.
Estado civil : Casada.
Hijos : 1
Domicilio : Contralmirante Fernandez Vial 10.741 C-3. Lo Barnechea.
Ciudad : Santiago.
Teléfono : 2496800



b) Antecedentes académicos:

(1978 - 1989)

Educación Básica y Media : Instituto Hebreo Comprensivo Jaim Weitzman ORT.

(1990 - 1994)

Grado Académico : Licenciada en Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile.

(1995 - 1996)

Tesis de pre-grado. : Laboratorio de Virología. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

(1996)

Título Universitario : Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile.

(1998-a la fecha)

Estudios de Postgrado : Candidata a Doctor en Biología, mención Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Idiomas

: Inglés y Hebreo.



II.- Experiencia Docente :

-2° Semestre 1992.

Ayudante de la Práctica Básica I dirigida por el profesor titular de Zootecnia, Prof. Peter Hirsch, en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

-1° Semestre 1993.

Ayudante de la cátedra de Alimentación Animal, dirigida por el Dr. Raúl Cañas, en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

-1° Semestre 1994.

Ayudante de la cátedra de Alimentación Animal, dirigida por el Dr. Raúl Cañas, en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

-1° Semestre 1995.

Ayudante de la cátedra de Alimentación Animal, dirigida por el Dr. Raúl Cañas, en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

-1° Semestre 1994.

Ayudante de la cátedra de Forrajeras y Manejo de Praderas, dirigida por el profesor titular, Dr. Gastón Pichard, en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

-2° Semestre 1995.

Ayudante de la cátedra de Bioquímica General, dirigida por el Dr. Eugenio Spencer O., en la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago (USACH).



-2º Semestre 1996.

Ayudante de la cátedra de Bioquímica General, dirigida por el Dr. Eugenio Spencer O., en la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago (USACH).

-2º Semestre 1997.

Ayudante de la cátedra de Bioquímica General, dirigida por el Dr. Eugenio Spencer O., en la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago (USACH).

III.- Experiencia laboral:

-1992.

Práctica Profesional: Caracterización y evaluación técnica-económica de lechería de vacas de producción intensiva de la zona central. Fundo "El Retiro", Melipilla.

-1996- 1998

Ayudante de investigación en estudios moleculares de patógenos virales en peces. Laboratorio de virología. Departamento de biología. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

-1º semestre 1998

Unidad de investigación. Laboratorio de Inmunología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

-1997-a la fecha

Socia de DIAGNOTECH Ltda.



Publicaciones:

- Método de detección de IPNV mediante la técnica RT-PCR a partir de sangre de pez infectado. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Fac. de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. 1996.
- The inhibitory mechanism of EICAR on the infectious necrosis pancreatic virus (IPNV) Jashés M., Mlynarz G., De Clerq and Sandino A. M.
- Aquatic bacteria diagnosis by PCR from whole blood of infected fishes.
- Mlynarz G., Jashés M., Obreque J. And Sandino A. M. Enviado a publicación a Journal of Fish Diseases 2000

Presentación a Congresos:

Congresos Nacionales

a) Comunicaciones cortas

- 1996. XVII Congreso Chileno de Microbiología. Santiago. Método de detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) mediante RT-PCR a partir de sangre de pez. **Mlynarz G.** y Sandino A.M. Laboratorio de Virología. Departamento de Biología. Facultad de Química y Biología. USACH.
- 1997. XXXX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Viña del Mar. Estudio de la morfogénesis del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en células CHSE-214. Galaz J., Villanueva R., Valdés J., Hueche A., González M., **Mlynarz G.** & Sandino A.M. Laboratorio de Virología. Departamento de Biología. Facultad de Química y Biología. USACH.

b) Simposios

- 1997. XVII Congreso Chileno de Microbiología. Viña del Mar. Aplicación de técnicas moleculares para la detección de patógenos de peces. Sandino A. M. y col. Laboratorio de Virología. Departamento de Biología. Facultad de Química y Biología. USACH.
- 1998. XVIII Congreso Chileno de Microbiología. Santiago. Taller de PCR. Laboratorio de Virología. Departamento de Biología. Facultad de Química y Biología. USACH.
- 2000 XXII Congreso Chileno de Microbiología. Desafíos Biotecnológicos el siglo 21. DIAGNOTEC

Congresos Internacionales

a) Comunicaciones cortas

- 1996. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2º simposio " Avance y Perspectivas de la Acuicultura en Chile". Coquimbo. Diagnóstico de IPNV mediante la técnica RT-PCR a partir de sangre de pez infectado. **Mlynarz G.** y Sandino A.M. Laboratorio de Virología. Departamento de Biología. Facultad de Química y Biología. USACH.

b) Simposios

- 1995. European Association of fish pathologists. Seventh international conference " Diseases of fish & shellfish. Palmas de Mallorca. 1995. The application of PCR and Dot Blot Hybridization for IPN and IHN viruses diagnosis. Sandino A. M. y col. Laboratorio de Virología. Departamento de Biología. Facultad de Química y Biología. USACH.



Participación en proyectos de investigación:

DICYT 02-964 3SG

Aislamiento y caracterización de subpartículas del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) obtenidas en células CHSE-214.

Ayudante de investigación (1996-1998)

-Proyecto FONTEC

Desarrollo e implementación de un método diagnóstico mediante PCR para el virus IPN en sangre y ovas infectadas.

Investigador Alterno (1996-1998)

-Proyecto FONTEC

Implementación y Validación de la tecnología de diagnóstico del laboratorio ROCHE para la detección por PCR del virus HIV y Hepatitis C

Investigador Alterno(2000-2001)

IV. Becas y Reconocimiento:

Beca para participar en el Programa de Doctorado en Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, otorgado por CONICYT. Marzo 1998.

Premio a la Mejor Empresaria Joven 1999 otorgado por el banco BHIF, Sección Economía y Negocios del diario "El Mercurio" y Fundación Educación Empresa. Enero 2000.

V. Extensión:

- Foro-Panel "Empresarios Jóvenes" organizado por IRADE Concepción: 2000.
- Foro 100 Líderes del 2000 organizado por EL Mercurio. 2000.
- Foro-Panel "Empresarios Jóvenes" organizado por el Colegio de Ingenieros de Chile. Univ. De Concepción. 2000.
- Artículo en la revista Caras Julio. 2000. Mujeres Destacadas Helena Rubinstein
- Artículo en la segunda revista Bioplanet, 2000. Biotecnología en Salmones
- Artículo en la revista Capital Septiembre.2000 Biológicamente empresaria.
- Artículo Alternativas Académicas, 2001. El Mercurio.



Antecedentes Resumidos del Equipo de Trabajo

Andrea Verónica Hueche Kähs, es Bioquímico de la Universidad de Chile. Realizó su tesis de pregrado en el Laboratorio de Virología de la Dra. Ana María Sandino, Universidad de Santiago. Durante su tesis estudió la efectividad in vitro de antivirales para inhibir la replicación del virus IPN de salmones. En 1996 realizó su práctica profesional en el Laboratorio Central del Hospital Clínico de la Universidad de Chile específicamente en los Laboratorios de Química Clínica, Hematología y Bacteriología. En el año 1997 realizó su segunda practica profesional en el Laboratorio de Ictiopatología y control de calidad de la empresa Marine Harvest Chile, Puerto Montt. Durante esta se familiarizó con las técnicas de diagnóstico de enfermedades de peces tales como cultivo e inmunológicas (ELISA e IFAT). Ha participado en cursos de Post-grado de Biología Molecular, Virología Animal y Biotecnología de la Universidad de Chile. En el área de biología molecular desde el año 1998 trabaja en DIAGNOTEC primero como Laboratorista y luego al crearse el área Pecuaria en DIAGNOTEC como Jefe de investigación de esta área. En este cargo se ha preocupado principalmente de actualizar e innovar en los protocolos de diagnóstico utilizados en el laboratorio así como de evaluar la factibilidad de implementar la técnica de PCR para el diagnóstico de nuevos patógenos.

Claudio Garrido Olave, Técnico de Laboratorio, adquirió su experiencia de trabajo bajo la dirección de la Dra. Ana María Sandino, en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Santiago. Desde el año 1999 se desempeña en DIAGNOTEC como técnico de laboratorio responsable del procesamiento de muestras y preparación del material de trabajo.

María Teresa Castillo es Microbiologa de Alimentos del INACAP. Profesionalmente se ha desempeñado en el área cultivo celular y biología molecular. Entre los años 1991 y 1995 se desempeño en la Unidad de Virología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile y desde el año 1996 trabaja en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Santiago.



Violeta Alvear Ceballos, auxiliar de laboratorio, adquirió su experiencia de trabajo en el laboratorio de Virología de la Universidad de Santiago, bajo la dirección de la Dra. Ana María Sandino. Actualmente, en Diagnotec, tiene a su cargo la preparación del material estéril y la desinfección de las distintas áreas de trabajo.

Cristián Sánchez Cabello, técnico en administración de empresas con especialidad en finanzas, trabaja desde el 2000 en Diagnotec teniendo a su cargo el Área de administración.

