

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	5/5/03
Hora	13:52
Nº Ingreso	361

INFORME TECNICO Y DE GESTION

I. ANTECEDENTES GENERALES

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 planteles porcinos.

CODIGO: BIOT-01-P-024

EJECUTOR:

Laboratorio de Diagnóstico GAM S.A. o Diagnetec S.A.

INFORME FINAL

Costo Total del Proyecto (sin bienes, según contrato):

Aporte del FIA (no incluye bienes):

PERIODO DE EJECUCION: desde 20/01/2002 hasta 20/07/2004

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO:

Geraldine Mlynarz

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCION	

2 RESUMEN EJECUTIVO

La industria porcina nacional se ha caracterizado por mantener un estándar sanitario privilegiado, sin embargo, a pesar de los resguardos, en el año 2000 se notificó oficialmente la presencia del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad de carácter exótico que causa grandes estragos en otros países. Dado la introducción del virus al país se propuso implementar, optimizar y desarrollar técnicas de diagnóstico molecular necesarias para realizar una detección precoz, específica y rápida de este patógeno. Específicamente, como apoyo al plan de erradicación del virus PRRS que está llevando a cabo la Asociación de Productores de Cerdo (ASPROCER) en conjunto con el SAG.

En Chile sólo se disponía del método de ELISA para la detección de anticuerpos contra el PRRSV, el cual presenta una serie de limitaciones que impiden el diagnóstico certero de la infección. Es por esto que en otras partes del mundo, cuentan también con el diagnóstico molecular del virus mediante la técnica de RT-PCR, como un complemento fundamental para el diagnóstico inmunológico. Además, del aislamiento viral mediante cultivo celular y la genotipificación viral.

Con el propósito de implementar la técnica de RT-PCR en el país, primero se desarrolló un método de diagnóstico utilizando material no infeccioso, como es el ácido nucleico extraído de cepas controles de PRRSV (cepa americana y europea), obteniéndose un protocolo de PCR tradicional. Posteriormente se optimizó este método para muestras provenientes tanto de cerdos vivos como faenados (muestras de sangre, suero y tejidos: amígdalas, pulmón, nódulo bronquial, etc). Una vez montada la técnica de PCR tradicional se adaptaron los protocolos al equipo de PCR automatizado Light Cycler.

Se utilizó en forma conjunta el diagnóstico por ELISA y RT-PCR para determinar las ventajas y desventajas de ambas técnicas.

En el curso del proyecto también se implementaron cultivos celulares para el aislamiento viral. Se desarrolló la metodología para realizar genotipificaciones de los aislados virales, con el fin de llevar a cabo estudios epidemiológicos del virus en Chile. Además, se implementaron métodos de diagnóstico molecular para la detección de PRRSV en semen, moscas, heces y alimento, con el fin de controlar todos los focos de posibles contaminaciones.

El resultado final de este trabajo es que actualmente los productores cuentan con las distintas herramientas de diagnóstico necesarias 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 y la mantención de ello en el tiempo. Además, con la aplicación de estas técnicas pueden obtener una visión real del curso de esta enfermedad en sus plantales, de modo de, optimizar las medidas de control hasta ahora utilizadas.

3 TEXTO PRINCIPAL

(Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.)

En los últimos años ha ocurrido un aumento de los parámetros productivos en el sector porcino nacional, 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. Más aún, el SAG en el año 2000 reportó que se encontró de un total de 135.000 madres analizadas por ELISA, aproximadamente 28.000 cerdas reproductoras seropositivas para el virus PRRS. Esta situación implicaba que en los dos años siguientes se verían afectados los parámetros de producción con una disminución constante de éstos en un 3% anual, si no se tomaban las medidas adecuadas. Por ello, era 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 requerían herramientas tecnológicas inexistentes hasta ese momento en nuestro país. Por este motivo, DIAGNOTEC S.A., laboratorio que posee experiencia en la detección molecular de patógenos en acuicultura, propuso desarrollar, optimizar e implementar el diagnóstico molecular del PRRSV mediante la técnica de RT-PCR, ya que la aplicación de esta técnica sería una herramienta fundamental para adoptar las medidas de control pertinentes, ya sea basadas en estrategias de control o medidas de reemplazo de modo de conseguir plantales libres de PRRSV. Se propuso cumplir con los siguientes objetivos:

1. Optimizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de cepas controles, basándose en los métodos descritos previamente.
2. Desarrollar la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de muestras provenientes de cerdos faenados (muestras de tejidos).
3. Desarrollar la técnica de RT-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.

Durante los dos años y medio de proyecto se realizaron las actividades programadas para cumplir con estos objetivos, sin mayores dificultades. De este modo, se obtuvo como resultado un método de diagnóstico molecular para la detección del PRRSV en tejido, sangre y suero del cerdo, el cual fue adaptado al equipo automatizado Light Cycler y fue comparado con el método de ELISA. Además, se realizaron una serie de actividades que no estaban programadas en el proyecto original, tales como: el desarrollo de un método de detección molecular en semen, moscas, heces y alimento, con el fin de monitorear la presencia del virus desde todas las posibles fuentes de contaminación. La implementación de sistemas de cultivo en células MARC-145 para el aislamiento viral y los estudios de la variabilidad del virus mediante la genotipificación de todos los aislados obtenidos desde los plantales positivos.

En resumen, actualmente el país dispone de distintas herramientas para detectar precozmente al PRRSV, beneficiando 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. 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 ASPROCER y el SAG de erradicar este virus es un desafío enorme, pero certificar cerdos libres de PRRSV abre paso a la comercialización de cerdos con el consiguiente valor agregado, motivando la aparición de nuevos negocios en el sector.

3.1 Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

(descripción breve de los resultados obtenidos, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias, descripción breve de los impactos obtenidos)

3.1.1 Objetivos y resultados:

1. Optimizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de cepas controles, basándose en los métodos descritos previamente.

Se desarrolló un protocolo estándar de diagnóstico para el virus PRRS mediante RT-PCR utilizando como cepas controles la cepa americana y la cepa europea.

2. Desarrollar la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de muestras provenientes de cerdos faenados (muestras de tejidos).

Se desarrolló la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de amígdala, pulmón, nódulo bronquial o tórula nasal.

3. Desarrollar la técnica de RT-PCR para detección del virus a partir de muestras provenientes de cerdos vivos (muestras de sangre, suero o plasma).

Se desarrolló la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de sangre y suero.

4. Comparar y evaluar a nivel de campo el uso de análisis inmunológicos y moleculares para el diagnóstico del virus PRRS.

Se comparó los resultados de la detección de PRRSV obtenidos por ELISA y RT-PCR, dando como resultado de la evaluación que ambos corresponden a diagnósticos complementarios, sin ser excluyentes.

No hubo discrepancias entre los objetivos planteados y los realizados. Aunque, cabe destacar, que se cumplieron con objetivos que no se plantearon originalmente en el proyecto, los que fueron surgiendo como necesidades de los productores durante su curso. Como resultado se obtuvo el diagnóstico de PRRSV en semen, moscas, heces y alimento. El aislamiento del virus en cultivo celular y la genotipificación de los aislados virales.

Bajo nuestro punto de vista el impacto principal de este proyecto es haber tenido la capacidad de plantear y llevar a cabo en nuestro país, el desarrollo tecnológico requerido para enfrentar un problema del sector productivo de gran relevancia nacional. Con los resultados de este proyecto, los productores de cerdo cuentan con todas las herramientas necesarias para mantener la vigilancia epidemiológica contra el virus PRRS. Además, saben que cuentan con el apoyo tecnológico para enfrentar cualquier otro problema sanitario que pueda surgir a futuro.

3.2 Aspectos metodológicos del proyecto:

(descripción de la metodología efectivamente utilizada, principales problemas metodológicos enfrentados, adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta, descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.)

3.2.1 Metodología de RT-PCR para la detección del virus PRRSV:

Para implementar la técnica de PCR propiamente tal se diseñaron secuencias partidoras específicas para las dos principales cepas virales. Se seleccionaron por literatura partidores que hubiesen demostrado ser específicos para la detección de PRRSV y mediante alineamientos computacionales se confirmó 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 evaluó además la calidad del partidador para la correcta realización del ensayo. Un partidador apropiado es aquel que no presenta secuencias complementarias con su partidador pareja o con si mismo, posee una temperatura de melting similar a su partidador pareja, el porcentaje de GC que posee fluctúa entre 40 y 60% y no presenta dominios ricos en GC o AT. Una vez seleccionado el partidador este se envió a sintetizar a laboratorios externos.

Una vez recibidos los partidores se ensayó la amplificación del genoma de las cepas controles de PRRSV probando los distintos protocolos de tiempo y temperatura. En base a estos resultados se definió un protocolo patrón y/o estándar que sirva como control para enfrentar la optimización y desarrollo de los protocolos posteriores. Para ello se extrajo el ácido nucleico de los virus controles, se cuantificó por espectrofotometría y se determinó 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.

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: (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 es la más crítica., por lo tanto, se probaron distintos protocolos de extracción del ácido nucleico viral para los distintos tipos de tejidos. La fase de RT y la de PCR es común para todos los tipos de muestra. Mientras que la detección del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior tinción con nitrato de plata para el caso del RT-PCR tradicional y en el caso del Light cycler se detecta mediante un peak característico producido por la fluorescencia emitida por el producto amplificado.

En general no nos enfrentamos a mayores problemas en la metodología desarrollada, por lo que no hubo discrepancias metodológicas con lo propuesto originalmente.

3.2.1.1 Protocolos de extracción del ácido nucleico desde muestras de sangre, suero y tejido para la detección de PRRSV

3.2.1.1.1 Preparación de las muestras para la extracción de ácido nucleico:

3.2.1.1.1.1 Preparación de muestras de sangre

Las muestras de sangre cerdo fueron tratadas antes de la extracción del ácido nucleico, para lisar los glóbulos rojos, de la siguiente manera:

Se mezcló suavemente la muestra de sangre (1mL) y se centrifugó a 350g por 3 minutos. El sobrenadante (plasma) se recolecta para otros propósitos.

Se mezcló nuevamente la sangre y se tomó 500 μ L. Se le agregó 500 μ L de NH₄Cl 0.83% y se dejó en hielo por 20-30 minutos Se centrifugó a 350g por 10 minutos Se resuspendió el pellet en 200 μ L de NH₄Cl 0.83% y se volvió a centrifugar en un tubo eppendorf por 5 minutos a 350g. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 200 μ L de H₂O estéril. La extracción de RNA se realizó posteriormente a partir de las células.

3.2.1.1.2 Preparación de muestra de suero

La extracción de ácido nucleico desde el suero se realiza directamente.

3.2.1.1.3 Preparación de muestras de tejido:

Para la extracción de ácido nucleico a partir de tejidos, se utilizó como muestras amígdalas, pulmón, nódulos linfáticos u otro órgano blanco. Se homogenizó y se diluyó en un volumen de agua destilada. Luego se centrifugó a 13.000g por 3 minutos y se tomó 200 µl de sobrenadante para ser sometido a la extracción de RNA viral.

3.2.1.1.2 Extracción del ácido nucleico

3.2.1.1.2.1 Desde muestras de sangre, suero o tejido.

La extracción en estos casos se basó principalmente en el uso de silica o fibra de vidrio para retener el ácido nucleico. Para ello se puede utilizar una extracción artesanal o kits comerciales. Nosotros hemos utilizado los Kits de Roche (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) o el de Ezna (RNA Eazy). Se han obtenido mejores resultados con el kit de Roche, siendo el protocolo el siguiente:

Se mezcló 200 µl de la muestra con 200 µL de buffer de unión (6M guanidina-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % Tritón X-100 pH 4,4 a 25°C) y 40 µl de proteinasa K 20 mg/ml. Se agitó y se incubó por 10 minutos a 72 °C. Se agregó 100 µl de isopropanol y se armó el sistema de tubo colector más el tubo filtro, para agregar la mezcla de reacción. Luego se centrifugó por 1 minutos a 8000xg, se eliminó el tubo colector y se colocó al tubo filtro en un nuevo tubo colector. Se agregó 500µl de buffer removedor de inhibidores (5M guanidina-HCl, 20mM Tris-HCl, pH 6,6 a 25°C), se centrifugó por 1 minutos a 8000xg, se eliminó el tubo colector y se colocó un tubo filtro en un nuevo colector. Se agregó 450 µl buffer de lavado (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7,5 a 25°C) al tubo filtro y se centrifugó por 1 minutos a 8000xg. Se volvió a eliminar el tubo colector y se colocó el tubo filtro en un nuevo colector. Se agregó 450 µl de buffer de lavado al tubo filtro y se centrifugó 1 minuto a 8000xg. Finalmente se volvió a centrifugar por 10 segundos a 13000xg para remover el buffer residual. A continuación se insertó el tubo filtro a un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril y se agregó 50 µl de buffer de elución (Tris 10mM pH 8,5) previamente incubado a 70 °C al tubo filtro. Se dejó eluir durante 5 minutos y se centrifugó por 1 minutos a 8000xg. El RNA se recolectó desde el tubo eppendorf y se mantuvo en hielo hasta su uso posterior en la reacción de RT.

3.2.1.1.2.2 Desde muestras de semen

Se realizaron pooles de semen de hasta de 4 cerdos. Se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Al pellet se le agregó 500 µL de buffer Chomzynski (sin 2-mercaptoetanol), se agitó y se centrifugó a 3.000 xg por 3 minutos. A continuación se agregó el sobrenadante a 500 µl de buffer Chomzynski (con 8 µl 2-mercaptoetanol), con agitación. Luego se realizó una extracción con 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo-isoamílico (24:1). Se vortexeó y centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos. Se retiró la fase acuosa y se realizó una nueva extracción. Se retiró la fase acuosa y se realizó una extracción con 500 µl de cloroformo-isoamílico (24:1), vortexeando y centrifugando a 8000 xg por 5 minutos. Se tomó la fase acuosa y se precipitó en Etanol durante toda la noche. A continuación se centrifugó a 13.000 xg por 30 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en H₂O estéril.

3.2.1.1.2.3 Desde muestras de heces, moscas y alimento

Para realizar la extracción de ácido nucleico de heces, moscas y alimento se utilizó un protocolo similar al aplicado para la extracción de RNA desde semen. Este consiste específicamente en lo siguiente:

Se homogenizó, ya sea las heces, moscas o alimento con buffer Chomzynski (sin 2-mercaptoetanol) con agitación y se centrifugó a 10.000 xg por 5 minutos. A continuación, se agregó al sobrenadante 500 µl de buffer Chomzynski (con 2-mercaptoetanol) y 200 µg/ml de proteinasa K. Se incubó a 55°C por 40 minutos. Luego se realizó una extracción con 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo-isoamílico (24:1). Se vortexeó y centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos. Se retiró la fase acuosa y se realizó una segunda extracción fenol:cloroformo-isoamílico. Se retiró la fase acuosa y se precipitó en Etanol durante toda la noche. A continuación se centrifugó a 13.000 rpm por 30 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en H₂O estéril para su uso posterior.

3.2.1.1.3 Preparación de las muestras para la detección de PRRSV en Light Cycler

La extracción de ácido nucleico desde sangre, suero, tejido y semen para la detección de PRRSV en light cycler se realiza como primer paso tal como se describió anteriormente. Sin embargo, luego de llevar a cabo la reacción de transcripción reversa, el cDNA obtenido se purificó antes de realizar la reacción de PCR en el Light Cycler, de modo de, entregar un producto más puro al equipo dado su sensibilidad. Para ello se ha utilizado un kit de Roche denominado High Pure Product Purification kit. El procedimiento consiste en lo siguiente:

Se agregó 500 µL de buffer de unión (3M guanidina-HCl, 10 mM tris-HCl, 5 % etanol pH 6,6 a 25°C) a 100 µl de reacción de RT y se mezcló bien. Se combinó el tubo filtro con el tubo colector, se pipeteó la muestra a la parte superior y se centrifugó por 30 segundos a 13.000xg. Se descartó el volumen obtenido en el tubo colector y se combinó con el tubo filtro nuevamente. Se agregó 500 µl de buffer de lavado (20 mM

NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7,5 a 25°C) a la parte superior y se centrifugó 30 segundos a 13.000xg. Se volvió a descartar el volumen del tubo colector y se combinó con el tubo filtro nuevamente. Se agregó 200 µl de buffer de lavado a la parte superior y se centrifugó a 30 segundos 13.000xg. Se descartó el tubo colector y el tubo filtro se combinó con un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se eluyó con 50 µL de buffer de elución (1 mM tris-HCl pH 8,5) durante 5 minutos y se centrifugó por 30 segundos a 13.000xg. El DNA se recolectó desde el tubo eppendorf y se mantuvo en hielo hasta su uso posterior en la reacción de PCR en el lightcycler.

3.2.1.1.4 Reacción de transcripción reversa

La reacción de transcripción reversa se realiza utilizando “random primers” ya que el cDNA obtenido de esta reacción puede ser utilizado posteriormente para cualquiera de las reacciones de PCR que se requiera realizar.

3.2.1.1.5 Reacción de PCR termociclador tradicional

En general, para la reacción de PCR se ha preferido utilizar una primera y segunda ronda de amplificación, ya que esto aumenta la sensibilidad de la reacción. Más aún pensamos que lo ideal para el diagnóstico es utilizar el par de partidores universal y luego hacer el nested PCR o segunda ronda de amplificación con uno de los dos pares de partidores que se han diseñado para la detección de la cepa americana o para la cepa europea.

La temperatura óptima de “annealing” resultó de 47° C y 49° C, para la primera y segunda ronda de amplificación, respectivamente. Por otro lado, la concentración óptima de partidores resultó ser 0,3 uM.

La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% teñido con nitrato de plata.

El producto del tamaño esperado obtenido en la primera ronda de amplificación corresponde a 255 pares de bases. El producto del tamaño esperado para la cepa americana obtenido en la segunda ronda de amplificación corresponde a 107 pares de bases.

3.2.1.1.6 Reacción de PCR para light cycler

Una vez implementado el método de RT-PCR para la detección de PRRSV utilizando un termociclador convencional, éste se adaptó al equipo Lightcycler.

Esta tecnología permite aplicaciones rápidas, pues los tiempos de transferencia de calor son breves, así un programa de PCR realizado en el Lightcycler puede ser completado en sólo 1 hora. La detección de los productos de PCR se realiza a través de una detección independiente de la secuencia con un sustrato que se une a DNA de doble hebra denominado Syber green I. Ante la emisión de la señal luminosa, que es detectada por el equipo, se procede al análisis final por medio de las curvas de melting.

El protocolo patrón básicamente consiste en utilizar una concentración de partidores de 0,3 μ M y de 3 mM de Magnesio en un volumen final de reacción de 20 μ L, para 2 μ L del cDNA.

El análisis de las curvas de melting para las cepas controles mostró un pico de fluorescencia de 90,8°C aproximadamente

3.2.2 Metodología de implementación de sistemas de cultivo en células MARC-145 para el aislamiento viral

Se propagaron células MARC-145 hasta alcanzar confluencia. Luego de 24 horas post confluencia estas fueron utilizadas para su infección, inoculando Con muestras de suero, tejidos (pulmón y amígdala) y semen, según los protocolos que se describen a continuación.

3.2.2.1 Infección con Suero

-Se utilizó 1 ml de suero para infectar placas de 6 pocillos y se realizó la adsorción por 30 minutos a 37°C. Luego se agregó medio fresco suplementado con 5% de suero y se incubó a 37°C durante 72 horas en incubador con CO₂.

3.2.2.2 Infección con Tejido (pulmón y amígdala)

-Se homogenizó aproximadamente 1g. de tejido con medio DMEM y a continuación se centrifugó a 3.0000xg durante 15 minutos y se tomó 1 ml de sobrenadante para infectar placas de 6 pocillos (no hay incubación con Antibióticos). Se realizó la adsorción por 2 horas a 37°C. Luego se agregó medio fresco suplementado con 5% de suero y se incubó a 37°C durante 48 a 72 horas en incubador con CO₂.

3.2.2.3 Infección con semen

-Se tomó 2 ml de semen total y se agregó 20 ml de solución balanceada de Hanks, se centrifugó a 40.0000xg por 1 hora y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 1 ml de MEM que contiene 2 % de suero, utilizando vortex. Luego se infectaron monocapas de células MARC-145 con 1 ml de diluciones 1:2 hasta 1:40 del resuspendido en MEM al 2% de suero. Se realizó la adsorción por 2 horas a 37°C. Luego se agregó medio fresco suplementado con 2% de suero y se incubó a 37°C durante 40 a 48 horas en incubador con CO₂.

3.3 Actividades y Tareas ejecutadas

(Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.)

Se adquirió equipos y materiales.

Se seleccionó como cepas control las cepas americana y europea, además, de la primera cepa chilena aislada. De éstas, se obtuvo el ácido nucleico no infeccioso extraído de las cepas americana y chilena, faltando aún la cepa europea.

Se seleccionó y obtuvo partidores específicos para PRRSV descritos en literatura

Se realizó implementación de las técnicas de RT-PCR descritas para la detección de PRRSV utilizando las cepas control y optimización de los protocolos con el fin de diseñar un protocolo patrón y/o estándar.

Se realizó el estudio de sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR patrón y/o estándar

Se modificó el protocolo de RT-PCR patrón con el fin de implementarlo al equipo Light Cycler.

Se desarrollaron distintos protocolos de extracción del ácido nucleico del virus dependiendo si la muestra de cerdo vivo era sangre, suero o semen.

Se realizó estudios de sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR en muestras de cerdos vivos.

Se modificó y optimizó el protocolo de RT-PCR para cerdos vivos (muestras de suero, sangre y semen), con el fin de implementarlo al equipo Light Cycler.

Se desarrollaron distintos protocolos de extracción del ácido nucleico del virus desde tejidos de cerdos faenados, dependiendo si la muestra de cerdo faenado correspondía a amígdala, pulmón, nódulo bronquial o tórula nasal.

Se realizó estudios de sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR en muestras de cerdos faenados (muestras de amígdalas, pulmón, nódulo bronquial o tórula nasal) y para muestras de semen.

Se implementó y optimizó el protocolo de RT-PCR para cerdos faenados en el equipo Light Cycler.

Se utilizaron los partidores específicos para la identificación de la cepa Americana o Lelystad en un RT-PCR múltiple.

Se desarrollaron distintos protocolos de extracción del ácido nucleico del virus desde muestras de heces, moscas o alimento.

Se realizaron muestreos dirigidos en varios plantales, especialmente aquellos que tenían sospecha de infección por PRRSV y se detectó el virus mediante los métodos de RT-PCR desarrollados (tradicional y automatizado) y la técnica de ELISA, en muestras de sangre y suero, con el fin de evaluar la edad más susceptible de infección por PRRSV.

También se intentó 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.

Se realizó estudio de la cinética de infección y respuesta inmune en cerdos provenientes de plantales naturalmente infectados mediante los métodos de RT-PCR desarrollados (tradicional y automatizado) y ELISA.

Se chequeó la presencia de PRRSV en el semen de reproductores de distintos plantales una vez al mes durante este periodo.

Se realizaron genotipificaciones de todos los aislados de PRRSV chilenos.

3.3.1 Actividades programadas (Según carta Gantt)

- 1) Adquisición de equipos y montaje del laboratorio.
- 2) Obtención de ácidos nucleicos no infecciosos extraídos desde las cepas controles.
- 3) Selección y obtención de partidores específicos para PRRSV descritos en literatura
- 4) Implementación de las técnicas de RT-PCR descritas para la detección de PRRSV utilizando las cepas control y optimización de los protocolos con el fin de diseñar un protocolo patrón y/o estándar.
- 5) Sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR patrón .
- 6) Implementación del RT-PCR patrón al equipo Light Cycler
- 7) Desarrollo de métodos de extracción (fase pre-PCR) en muestras de cerdos vivos
- 8) Sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR en muestras de cerdos vivos
- 9) Implementación del RT-PCR para cerdos vivos al equipo Light Cycler
- 10) Desarrollo de métodos de extracción (fase pre-PCR) en muestras de cerdos faenados
- 11) Sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR en muestras de cerdos faenados
- 12) Implementación de los métodos de RT-PCR desarrollados en cerdos faenados en el equipo automatizado.
- 13) Diagnosticar la presencia de PRRSV mediante los métodos de RT-PCR desarrollados (tradicional y automatizado), en cerdos faenados.
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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.

3.3.2 Actividades efectivamente realizadas

- 1) Se realizó la adquisición de equipos y materiales, aunque tardíamente debido al retraso de la entrega del financiamiento.
- 2) Obtención de ácido nucleico no infeccioso extraído de cepas controles, se realizó para dos de las tres cepas elegidas, debido a la imposibilidad de conseguir autorización del SAG para ingresar el ácido nucleico de la cepa europea.
- 3) La selección y obtención de partidores específicos para PRRSV descritos en literatura se realizó tal como se propuso.
- 4) La implementación y optimización de las técnicas de RT-PCR descritas para la detección de las cepas control de PRRSV se realizó de acuerdo a lo propuesto originalmente.
- 5) Estudio de sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR patrón y/o estándar tal como se señaló en el proyecto.
- 6) Implementación del RT-PCR patrón al equipo Light Cycler
- 7) Desarrollo de métodos de extracción (fase pre-PCR) en muestras de cerdos vivos
- 8) Sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR en muestras de cerdos vivos.
- 9) Implementación del RT-PCR para cerdos vivos al equipo Light Cycler
- 10) Desarrollo de métodos de extracción (fase pre-PCR) en muestras de cerdos faenados y en semen
- 11) Sensibilidad y reproducibilidad del RT-PCR en muestras de cerdos faenados y en semen.
- 12) Implementación y optimización del RT-PCR para cerdos faenados al equipo Light Cycler.
- 13) Diagnóstico de la presencia de PRRSV mediante los métodos de RT-PCR desarrollados (tradicional y automatizado), en cerdos faenados.
- 14) Desarrollo de métodos de extracción en muestras de heces, moscas y alimento de cerdos.
- 15) Desarrollo de RT-PCR múltiple con las cepas control Americana y Lelystad.
- 16) Evaluación 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.
- 17) Evaluación 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.
- 18) 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.
- 19) Monitoreo de reproductores de distintos planteles mediante la detección de PRRSV en semen durante varios meses.
- 20) Genotipificación de aislados chilenos de PRRSV.

3.4 Resultados del proyecto

(Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.)

3.4.1 Resultado 1.

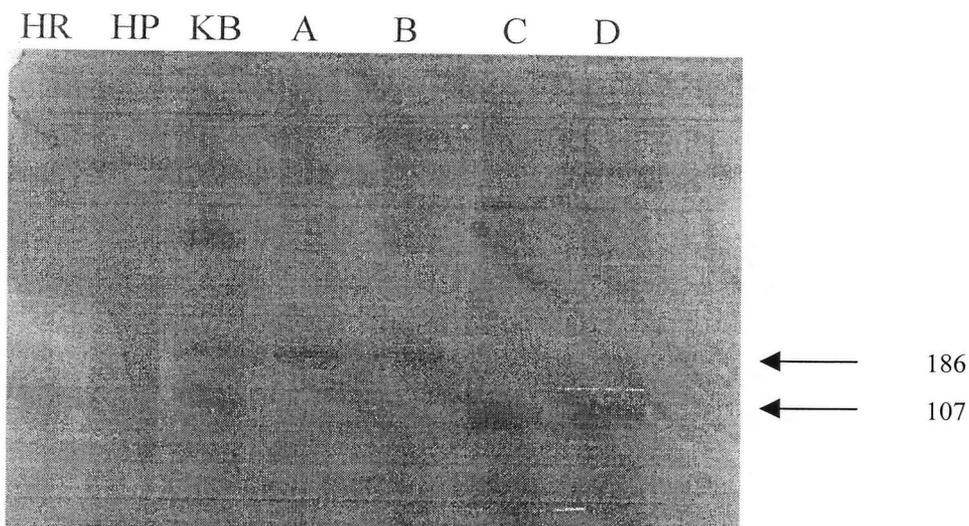
En cumplimiento con el primer objetivo correspondiente a:

1. Optimizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de cepas controles, basándose en los métodos descritos previamente.

Se desarrolló un protocolo estándar de diagnóstico para el virus PRRS mediante RT-PCR utilizando como cepas controles la cepa americana y la cepa europea. Para ello se utilizó un set de partidores universales que amplifican una región del gen que codifica para la polimerasa viral de ambas cepas, dando un producto de 255 pb en la primera amplificación. Luego, en una segunda amplificación, se utilizan dos pares de partidores, uno para cada una de las cepas específicamente, que dan un producto de 107 pb y 186 pb para la cepa americana y europea, respectivamente.

En la figura 1 se observan los productos de amplificación obtenidos con ambos pares de partidores presencia de la cepa europea (carriles a y b) y de la cepa americana (carriles c y d).

FIGURA 1



3.4.2 Resultado 2

Para cumplir con el segundo objetivo correspondiente a:

2. Desarrollar la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de muestras provenientes de cerdos faenados (muestras de tejidos).

Se desarrolló la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de amígdala, pulmón, nódulo bronquial o tórula nasal, utilizando los mismos partidores descritos en el punto anterior. Además, se propagó el virus en cultivo de células MARC-145.

Se compararon los resultados obtenidos de tres cerdos, a los que se les tomaron muestras de suero, sangre, amígdalas, pulmón, nódulo bronquial y tórula nasal. Los resultados tanto del RT-PCR directo como del sobrenadante de cultivo se muestran en la tabla 1.(ver archivo adjunto: TABLA 1) Para el caso de RT-PCR directo de la muestra, con el tejido que se obtuvo mayor sensibilidad fue la amígdala, ya que se obtuvo producto en los 3 cerdos analizados. Luego le sigue la muestra de sangre. Para el caso de RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivo, aparentemente el suero es tan buena muestra como cualquier otro tejido. En los cultivos de suero, amígdala y pulmón se observan efectos citopáticos más evidentes que en los cultivos de nódulo bronquial y tórula nasal.

TABLA 1

Cerdo	muestra	PCR directo		Cultivo I		Cultivo II		Cultivo III		PCR sobrenadante		
		Protocolo 1	Protocolo 2	MARC-145	MA-104	MARC-145	MA-104	MARC-145	MA-104	I cultivo	II cultivo	Cultivo III
1	suero	-	-	-	-	-	-	-	-	N.A.	++	+
	sangre	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	tórula nasal	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	pulmón	-	inosp.	CPE	CPE	-	CPE	s/mc	CPE	++	-	-
	amígdala	+	inosp.	-	-	-	-	CPE	CPE	-	-	+
2	nodulo bronquial	+	inosp.	-	-	CPE	CPE	s/mc	-	-	-	+
	suero	+	inosp.	CPE	-	CPE	CPE	s/mc	s/mc	N.A.	++	++
	sangre	++	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	tórula nasal	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	pulmón	+	-	-	CPE	-	-	-	-	++	++	++
3	amígdala	+	inosp.	CPE	-	CPE	CPE	s/mc	CPE	++	++	+
	nodulo bronquial	-	inosp.	CPE	CPE	-	CPE	CPE	-	-	++	++
	suero	-	-	-	-	-	-	s/mc	-	N.A.	-	-
	sangre	+++	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	tórula nasal	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	pulmón	-	inosp.	-	CPE	-	CPE	s/mc	CPE	++	-	-
	amígdala	+	-	CPE	CPE	CPE	CPE	s/mc	CPE	-	++	-
	nodulo bronquial	-	-	-	-	CPE	-	-	-	-	-	-

inosp.: inespecificidad

N.A.: No analizado

CPE: Efecto citopático

s/mc: sin monocapa (destrucción monocapa)

3.4.3 Resultado 3

En cuanto al tercer objetivo, el cual consistía en:

3. Desarrollar la técnica de RT-PCR para detección del virus a partir de muestras provenientes de cerdos vivos (muestras de sangre, suero o plasma).

Se desarrolló la técnica de RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de sangre y suero.

La evaluación de la sensibilidad del método de diagnóstico desarrollado para cada una de las tres muestras mediante la realización de pooles de dos, tres, cuatro y cinco individuos se observa en las figuras 2, 3 y 4. Esto es, se junta un individuo positivo con uno, dos, tres o cuatro individuos negativos.

En la tabla 2, correspondiente a una muestra individual y pooles se observa que en el caso de una muestra de sangre, se obtiene producto de amplificación con la muestra individual y pooles de 2, 3, 4 y 5 individuos. Mientras que tanto en muestras de suero como de semen se observa que se obtiene producto de amplificación con la muestra individual y los pooles de 2, 3 y 4 individuos.

TABLA 2

Pooles	Sangre	suero	Semen
1 (1+)	+	+	+
2 (1+/1-)	+	+	+
3 (1+/2-)	+	+	+
4 (1+/3-)	+	+	+
5 (1+/4-)	+	-	-

3.4.4 Resultado 4

Finalmente, respecto a los resultados del cuarto objetivo correspondiente a:

4. Comparar y evaluar a nivel de campo el uso de análisis inmunológicos y moleculares para el diagnóstico del virus PRRS.

Se comparó los resultados de la detección de PRRSV obtenidos por ELISA y RT-PCR, dando como resultado de la evaluación que ambos corresponden a diagnósticos complementarios, sin ser excluyentes.

Con el fin de evaluar la edad más susceptible de infección por PRRSV, se realizaron muestreos dirigidos en varios planteles. Como se muestra en la tabla 3 se tomaron muestras de cerdos sospechosos de estar infectados por PRRSV desde 1 día de edad hasta 189 días. Los resultados del diagnóstico del virus en cerdos vivos mediante los métodos de RT-PCR desarrollados (tradicional y automatizado) y la técnica de ELISA muestran que existen cerdos positivos de todas las edades. En el caso de los lechones el virus sería transmitido desde la madre. En el caso de la recria existen algunos cerdos que son negativos al ELISA, pero positivos al PCR, esto se puede deber a que está recién iniciándose la respuesta inmunológica contra el virus. Sin embargo, en la mayoría de los casos ocurre al revés, es decir, el ELISA es positivo y el PCR negativo, lo que indica que probablemente la respuesta inmune haya llegado a su máximo o ya esté empezando a declinar para estabilizarse, luego de que ha ocurrido la infección viral. En este caso, el virus fue combatido durante el máximo de la respuesta inmunológica desapareciendo de la circulación prácticamente. Cabe destacar que tampoco se puede descartar la posibilidad de tener falsos positivos al ELISA, especialmente cuando las

diferencias entre el ELISA y el PCR se obtienen con resultados del ELISA correspondientes a positivos muy débiles, los cuales generalmente tampoco son confirmados por IFAT, obteniéndose resultados negativos igual que en RT-PCR. Estos resultados coinciden con los resultados descritos previamente y actualmente en la literatura, lo que vuelve a dejar de manifiesto que ni el ELISA, ni el RT-PCR por si solos son métodos de diagnóstico certero, ya que dependen del curso de la infección. Por lo tanto, es fundamental utilizar ambos métodos en forma rutinaria y complementaria.

De estos resultados también se desprende que el RT-PCR tradicional es más sensible que el automatizado. Esto sucede cuando las muestras tienen una carga viral más baja y ocurre porque el equipo Light Cyler requiere ácido nucleico más puro para tener un resultado óptimo. Cuando se tiene una cantidad límite de ácido nucleico los inhibidores recobran mayor importancia que cuando el ácido nucleico está en exceso cuando se utiliza el equipo automático, por eso se obtiene una menor sensibilidad en el caso de cargas virales bajas. Estos resultados también están de acuerdo con lo que han descrito otros investigadores y es por esto que haciendo una evaluación costo beneficio, DIAGNOTEC S.A. se inclina por recomendar el RT-PCR tradicional por sobre el realizado en el equipo Light Cyler, para el diagnóstico desde muestras naturalmente infectadas, ya que la sensibilidad del método tradicional es mayor y el costo es menor.

Por otro lado, con el fin de evaluar el lugar en el plantel más susceptible de infección por PRRSV, se realizaron muestreos de maternidad (sitio I), recría (sitio II) y engorda (sitio III). Los resultados obtenidos indican que en los sitios de engorda es más frecuente encontrar el virus por RT-PCR. La mayoría de los planteles tienen contaminada solo la engorda. Sin embargo, hay unos pocos planteles que tienen los 3 sitios contaminados y otros recría y engorda, lo que no se esperaba que ocurriera en Chile, dificultando los planes de erradicación.

TABLA 3

ELISA	Light Cyler	RT-PCR	Muestra	Edad (días)	Etapas
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	1	lechones
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	1	lechones
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre	1	lechones
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	21	Recría
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	21	Recría
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	31	Recría
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	31	Recría
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	35	Recría
Negativo	Negativo	Positivo	Sangre	36	Recría
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	41	Recría

Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	41	Recria
Negativo	Positivo	Positivo	Sangre	42	Recria
Negativo	Negativo	Positivo	Sangre	46	Recria
Negativo	Positivo	Positivo	Sangre	46	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	50	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	50	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre y suero	56	Recria
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre y suero	56	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre y suero	56	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	60	Recria
Negativo	Negativo	Negativo	Suero	61	Recria
Negativo	Negativo	Negativo	Sangre	61	Recria
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre y suero	63	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre y suero	63	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre y suero	63	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre y suero	63	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre y suero	63	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	65	Recria
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre	65	Recria
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	65	Recria
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	65	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	66	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	66	Recria
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Negativo	Positivo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	101	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Suero	103	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	103	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Suero	103	Engorda
Positivo	Negativo	Positivo	Suero	103	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Suero	103	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	110	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Suero	110	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Suero	110	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	110	Engorda
Positivo	Positivo	Positivo	Sangre	153	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	153	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	153	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Sangre	153	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	158	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	158	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	159	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	159	Engorda
Positivo	Negativo	Negativo	Suero	189	Engorda

3.4.5 Resultado 5

Finalmente, los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de infección y respuesta inmune en cerdos provenientes de planteles naturalmente infectados mediante los métodos de PCR desarrollados y ELISA, que se resúmen en la tabla4, indican que al inicio de la infección el RT-PCR es más certero como método de diagnóstico, mientras que, al final de la infección el ELISA resulta un mejor indicador de la infección viral. El hecho de detectar PRRSV al inicio de la infección por RT_PCR y no por ELISA, es lógico, puesto que en ese momento de la infección hay gran producción de virus y aún se está iniciado la respuesta inmune. Luego, hay una competencia entre la producción viral y la respuesta inmune que intentará neutralizar el virus, obteniéndose una respuesta positiva con ambos métodos. Finalmente, la respuesta inmune neutraliza el virus, desapareciendo este del torrente sanguíneo y dando RT-PCR negativo. Actualmente, sin embargo, se ha descrito también, que en algunos casos la respuesta inmune de los cerdos que son re infectados con la misma cepa viral no aumenta, dando ELISA negativos, mientras que dan RT-PCR positivos, porque el virus está circulando en la sangre. Esto puede ocurrir precisamente en los cerdos de engorda, los que por su edad tienen mayor probabilidad de re infectarse en el plantel y con el mismo virus. En estos casos ha ocurrido que por ELISA se ha sugerido que el plantel está libre de virus, ocurriendo posteriormente brotes de la enfermedad. Estos hallazgos nuevamente apoyan la sugerencia de utilizar ambas técnicas de diagnóstico como complementarias.

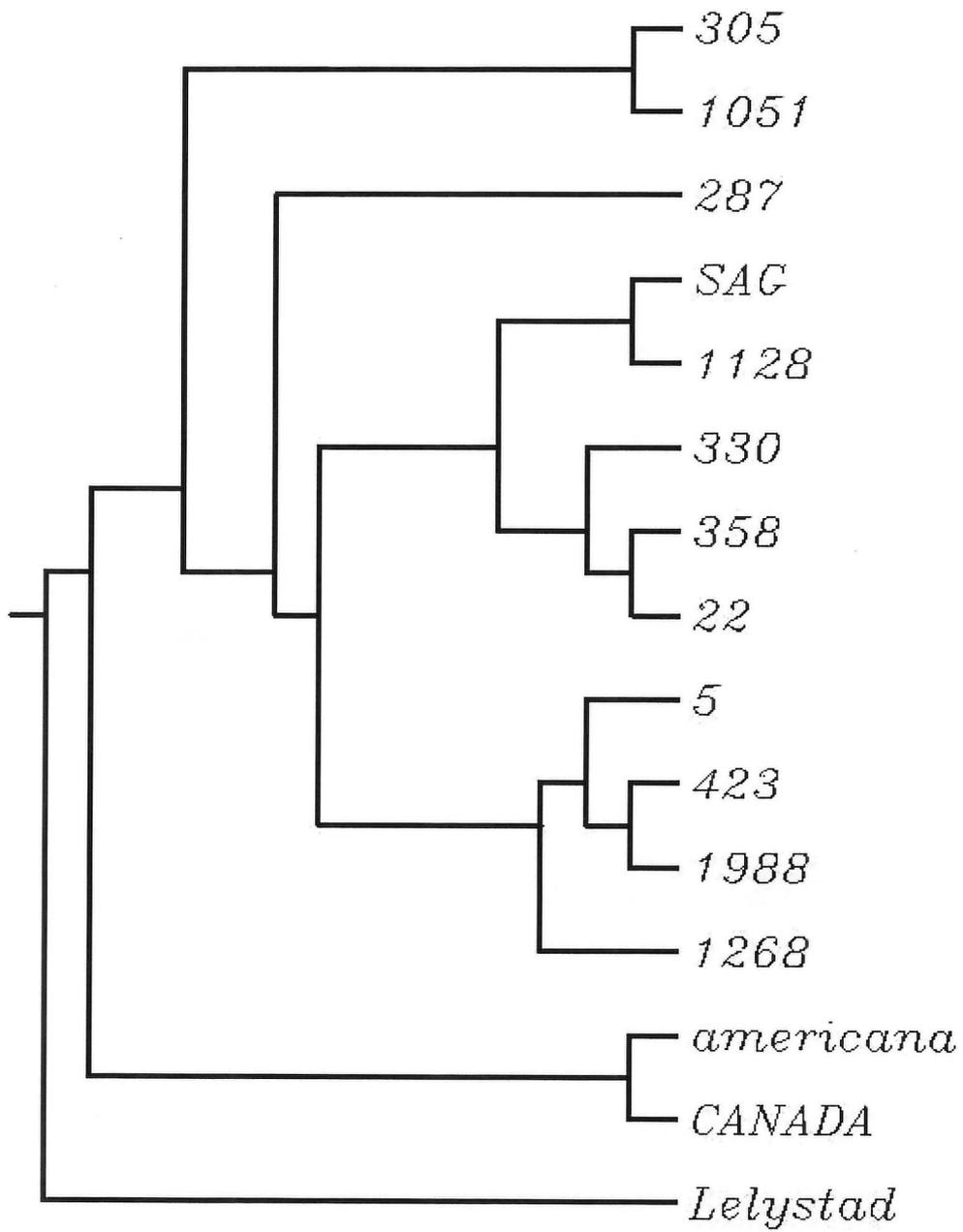
TABLA 4

Día muestreo entrada a engorda	ELISA	RT-PCR
Día 7	2/3 positivos	3/3 positivos
Día 14	3/3 positivos	3/3 positivos
Día 21	3/3 positivos	3/3 positivos
Día 28	3/3 positivos	2/3 positivos
Día 35	3/3 positivos	0/3 positivos

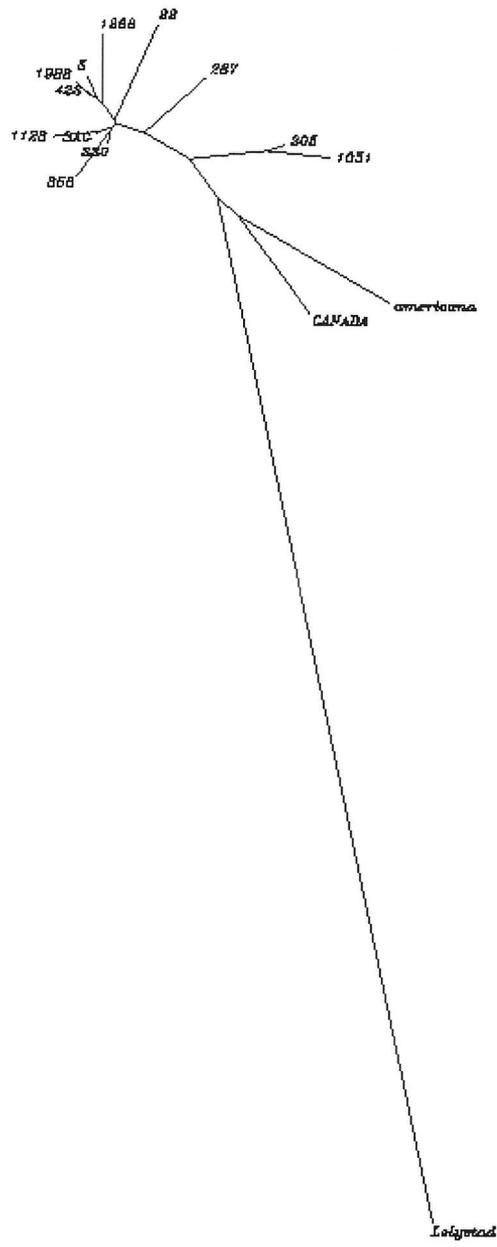
3.4.6 Resultado 6

Genotipificación

Como actividad no contemplada en el proyecto se realizó la genotipificación de todos los aislados obtenidos en los planteles chilenos. En la figura 2 se muestra una comparación entre los aislados chilenos respecto a la cepa americana, canadiense y europea. utilizando las secuencias obtenidas. Se puede observar una gran cercanía entre las cepas chilenas y a su vez, estas cepas chilenas son muy semejantes a la cepa americana y canadiense.



INCRUSTAR



3.4.7 Resultado 7: INCRUSTAR

Además, se desarrollaron métodos de diagnóstico para la detección de PRRSV en moscas, heces y alimento, con el fin de disponer de una herramienta para monitorear posibles fuentes de contaminación. Los resultados mostraron productos positivos en heces y moscas. Anteriormente se había descrito que las heces podía ser una posible fuente de contaminación del virus y recientemente se demostró que las moscas pueden ser un vector importante que transmite el virus desde un plantel a otro.

3.5 Fichas técnicas, análisis económico y análisis de las perspectivas del proyecto.

En este punto podemos comentar que se desarrolló una herramienta molecular que está siendo utilizada en el sistema productivo con fines diagnósticos, que tiene un precio razonable, totalmente competitivo a nivel mundial, incluso de menor costo debido a que se realiza “in house”. Que los productores están obligados a utilizarla en el caso del chequeo del semen, ya que para este tipo de muestras no sirve el ELISA. Esta es una metodología que pretendemos optimizar para dar un servicio más completo a futuro. Además, tenemos la posibilidad de desarrollar y aplicar tecnología molecular al diagnóstico de otros patógenos de importancia productiva en el futuro próximo.

3.6 Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto.

No hubo problemas significativos.

3.7 Difusión de los resultados obtenidos.

(Adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto).

La difusión que se ha realizado de los resultados obtenidos durante el proyecto está relacionada con los datos entregados a la Asociación de Productores de Cerdos (ASPROCER), el SAG y los asesores técnicos (Dr. Fernando Osorio y Dr. Steve Henry) del programa de erradicación de PRRSV, quienes han complementado sus estudios, con la detección molecular del virus mediante la técnica de RT-PCR desarrollada en DIAGNOTEC S.A., tanto en suero, sangre como semen. Además, de los estudios de variabilidad genética de PRRSV llevados a cabo mediante la genotipificación de los distintos aislados, que les han permitido realizar estudios epidemiológicos de este virus. Estos resultados han sido expuestos a los productores de cerdos y al SAG en al menos 3 seminarios realizados por ASPROCER durante el curso del proyecto.

Para finalizar con las actividades de difusión, queda pendiente la realización de una charla que dará a conocer todos los avances y alcances de los resultados obtenidos en este proyecto. Esta tendrá lugar el día 1 de octubre en el hotel Santiago Park Plaza y estará dirigida a los productores de cerdos, veterinarios del área y funcionarios del SAG relacionados con el tema.

3.8 Calendario de ejecución (programado, real) y cuadro resumen de costos (programados, efectivos) del proyecto.

3.8.1 Calendario de ejecución

Ver archivo adjunto : Carta Gantt programada/efectiva

3.8.2 Cuadro resumen de Costos

FIA

INFORMES	FECHAS	APORTES REALIZADOS	GASTOS REALIZADOS	SALDO	SALDO ACUMULADO
1	Enero-Marzo 2002	0	0	0	0
2	Marzo-Junio 2002	16.562.333	13.372.930	3.189.403	3.189.403
3	Julio-Octubre 2002	0	9.354.017	-9.354.017	-6.164.614
4	Noviembre- Abril 2003	18.369.133	12.423.108	5.946.025	-218.589
5	Mayo-Septiembre 2003	9.395.360	11.325.405	-1.930.045	-2.148.634
6	Octubre-Abril 2004	19.103.900	15.279.563	3.824.337	1.675.703
7	Mayo-Julio 2004	2.442.794	8.108.423	-5.665.629	-3.989.926
TOTAL		65.873.520	69.863.446	-3.989.926	
APORTE SOLICITADO (*)	69.944.842				
SALDO (Solicitado - Realizado)	81.395				
SALDO (Aportes - Gastos)	-3.989.926				

* No considera equipos

DIAGNOTEC

INFORMES	FECHAS	APORTES REALIZADOS	GASTOS REALIZADOS	SALDO	SALDO ACUMULADO
1	Enero-Marzo 2002	1.910.773	2.722.983	-812.210	-812.210
2	Marzo-Junio 2002	5.057.561	3.724.692	1.332.869	520.659
3	Julio-Octubre 2002	6.278.991	5.923.995	354.996	875.655
4	Noviembre- Abril 2003	9.606.650	9.746.605	-139.955	735.700
5	Mayo-Septiembre 2003	9.669.805	8.031.798	1.638.007	2.373.707
6	Octubre-Abril 2004	12.369.607	10.746.685	1.622.922	3.996.629
7	Mayo-Julio 2004	3.943.801	7.940.430	-3.996.629	0
TOTAL		48.837.188	48.837.188	0	
APORTE SOLICITADO			51.089.350		
SALDO POR RENDIR (Solicitado - Realizado)(*)			2.252.162		
SALDO (Aportes - Gastos)			0		

* este saldo esta pendiente, es el gasto destinado a la actividad de difusión, la cual se realizará la primera semana de octubre

3.9 Impactos del proyecto.

(Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.)

3.9.1 Impacto económico del proyecto

3.9.1.1 Mercado Objetivo

Diagnotec busca crear valor en la industria porcina, en particular a las empresas productoras de cerdo de consumo a nivel nacional y al sector de compañías proveedoras de genética en cerdos a nivel internacional. El objetivo es incorporar productos de diagnóstico que permitan detectar virus que afectan fuertemente a nivel productivo, de modo de reducir la diseminación y por ende, las tasas de mortalidad y/o efectos a nivel de performance productivo, permitiendo así aumentar la productividad y generar impactos a nivel global.

Chile en los últimos cinco años ha aumentado sus exportaciones de cerdo considerablemente. Actualmente se han constituido como uno de los pocos rubros con una alta dinámica dentro de la actividad agropecuaria del país.. Es importante mencionar, que la industria porcina ha realizado inversiones en los últimos cuatro años por montos superiores a los 250 millones de dólares, logrando así un alto nivel tecnológico y de eficiencia productiva.

Existen tres factores principales que han influido en el incremento de las exportaciones nacionales, los cuales son:

a) Bajos costos de producción.

Chile ha sido capaz de producir cerdo a costos inferiores a la mayoría de sus competidores. Por ejemplo; La Union Europea (EU) y China presentan costos superiores a un dólar por kilo, EEUU alcanza valores de 0,77 dólares por kilo, mientras que Chile ha logrado un costo de 0,7 dólares por kilo. (L.Roppa, Pig Progress 17:2. 2001)

b) Superficie disponible.

Chile presenta grandes extensiones cultivables que le permiten hacer un manejo racional de los desechos, mediante su uso como fertilizante. No obstante países europeos no tienen posibilidad de expansión para aumentar su producción, ya que no cuentan con terrenos suficientes para ello. A modo de ejemplo: En Europa la densidad de cerdos por km² corresponde a 36,8 en tanto que en sudamérica tan sólo llega a 3,4 cerdos por km² (L.Roppa, 2000. Pig Progress 17:2. 2001). Cabe destacar que Dinamarca, uno de los principales productores europeos de cerdos ha presentado un serio problema de manejo ambiental (producto del reducido tamaño de su territorio),

con la disposición final de los residuos provenientes tanto de la producción (purines), como del faenamiento de cerdos (riles y residuos sólidos).

Por este motivo, las políticas gubernamentales se han orientado a desincentivar la producción, con el propósito de reducir la contaminación ambiental, impidiendo aumentar sus niveles actuales de producción.

c) Condición sanitaria.

Chile tiene la fortaleza de que es un país libre de Fiebre Aftosa y en 1998 se declaró también libre de Peste Porcina Clásica, lo que le ha abierto grandes posibilidades de colocar sus productos en mercados importantes. En la actualidad sus condiciones sanitarias lo han ubicado en una situación privilegiada para abrirse camino a Hong Kong, China y Corea además de Japón. En efecto, hasta hace muy poco tiempo prácticamente un 40% del consumo de carne de esos países era importado desde Taiwán y a raíz de un brote de Fiebre Aftosa en ese país, ocurrida a mediados de 1997, se suspendieron las importaciones, lo que ha potenciado el ingreso de carne de cerdo nacional. Además, se debe agregar el efecto adverso que ha producido en la imagen de Europa, la presencia de la Peste Porcina Clásica, que en 1997 y 1998 afectó especialmente a Holanda y España y en menor medida a Alemania, Italia, Bélgica y la República Checa. Los brotes de estas enfermedades que han ocurrido en países productores, han aumentado la demanda por carne de cerdo a otros países productores, lo que favorece notablemente a la industria porcina nacional, especialmente si logra mantener o mejorar su estatus sanitario.

Sin embargo, Chile no ha estado exento del ingreso de enfermedades de relevancia a nivel mundial. El año 2000 el SAG notificó oficialmente la presencia del virus PRRS (De acuerdo a los datos recogidos por el SAG durante el chequeo que realizó durante el año 2000, se señaló que de un total de 135.000 hembras existentes a nivel nacional, 28.000 resultaron seropositivas al virus PRRS, lo que indica que aproximadamente un 21% de los planteles presentaron el problema.), patógeno que era considerado en Chile de carácter exótico, el cual causa graves consecuencias a nivel productivo, pudiendo afectar notoriamente la competitividad de la industria porcina nacional en el mercado de carne de cerdo de exportación. Existen numerosos estudios han llegado a determinar respecto a que el virus PRRS puede ocasionar en un lapso de 12 meses pérdidas entre un 10 a un 15%.

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, el sector productivo, representado por su Asociación (ASPROCER) decidió el año 2001 tomar un rol activo frente este desafío y junto con el SAG, decidieron iniciar un Programa de Erradicación del virus PRRS de modo de erradicar el virus del país, al igual como se logró con la Fiebre Aftosa y la Peste Porcina Clásica, con el fin de mantener el estatus sanitario privilegiado que han tenido hasta el momento.

Diagnotec desde el año 2002 comenzó a apoyar al Programa de Erradicación de PRRSV mediante la incorporación de técnicas moleculares complementarias al diagnóstico de PRRSV. Para nuestro país ha sido fundamental la información que Diagnotec ha logrado recoger, ya que se ha podido determinar mediante genotipificación qué cepa de virus está presente en nuestro país, lo cual anteriormente era una incógnita y así determinar de donde provino el virus. Además se ha podido chequear las muestras de semen, muestras que sólo puede ser chequeada mediante el uso de PCR, esto ha sido de gran utilidad para las empresas productoras, ya que han podido monitorear sus verracos reproductores y tomar las medidas necesarias para

evitar la diseminación en sus planteles, este chequeo es de gran relevancia si se considera que un verraco es cruzado con 20 cerdas por vía natural y alcanza mediante Inseminación Artificial (IA) en promedio a 120 cerdas.

El sector porcino nacional está compuesto por dos grandes categorías de productores: una es de los grandes productores compuesto por seis empresas que constituyen aproximadamente el 65% del sector, liderando AgroSuper con 70.000 hembras y las cinco restantes con planteles entre las 2.500 a 10.000 madres . El 35% restante está compuesto por alrededor de 80 empresas medianas y pequeñas que van desde planteles compuestos por 50 a 2.500 madres, lo cual significan 170.000 hembras en total a nivel nacional.

La implementación de técnicas moleculares de diagnóstico como complemento al Programa de erradicación ha sido fundamental ya que ha permitido complementar la información epidemiológica obtenida con las técnicas serológicas (ELISA) y así las decisiones han sido más acertadas. Este servicio naciente comenzó siendo ofrecido a los productores para monitero a partir de muestras de suero y/o sangre , pero con el correr del tiempo, fue necesario incorporar al monitoreo la detección del virus PRRS en cerdos reproductores a partir de semen. La razón de ello, es que al día de hoy no existen técnicas que permitan la detección del virus desde semen. La implementación de este diagnóstico fue muy eficiente, dado el expertise que se ha ganado en el diagnóstico en salmones. Más aún la experiencia en salmones del “screening de reproductores” nos facilitó la comprensión de que ese punto es igualmente crítico en la producción de cerdos, pero que a diferencia de la producción de salmones, en la industria porcina el material de reproducción no es producido en la misma empresa , sino que existen empresas proveedoras de genética, las cuales poseen incorporado dentro de sus manejos el chequeo de su semen o cerdos para la venta como reproductor. Es así como Diagnotec pudo detectar una necesidad no cubierta completamente en el mercado internacional, a nivel de las empresas dedicadas a proveer genética de cerdos; estas empresas multinacionales venden cerdos reproductores seleccionados y/o semen seleccionado para IA.

A nivel nacional, está desarrollado fundamentalmente el mercado de cerdos para consumo, pero en norteamérica el mercado de cerdos de genética es un mercado muy importante, el cual se le exige vender semen certificado sanitariamente para poder llegar a sus clientes.

Diagnotec pretende alcanzar esos mercados internacionales, no obstante para lograrlo, se hace necesario lograr desarrollar una plataforma tecnológica en formato de KIT, de modo de poder escalar a esos mercados con estos productos de diagnóstico .Para ello, Diagnotec ha tomado contacto con una empresa alemana, con la cual está desarrollando un proyecto colaborativo para poder llevar la tecnología desarrollada en el proyecto a formato de Kit .

Para comprender la magnitud de ese nicho de mercado, es importante mencionar que a nivel americano, las hembras existentes en producción consisten en 5,5 millones, si se considera que Chile cuenta con 170.000 hembras, significa que es un mercado 32 veces mayor. En Chile la introducción de las técnicas moleculares para la detección del virus PRRSV en la industria local ha significado la realización por parte de Diagnotec desde el año 2003 a la fecha de 1.800 análisis de PRRSV ,lo cual ha significado ingresos por \$25.000.000 , estos análisis corresponden a un 1,26% del total de hembras, si consideramos alcanzable este nivel de análisis al comienzo de la introducción del servicio, significaría un total de análisis iniciales de 65.340 en este segmento del mercado. Si se considera que cada análisis cuesta 20 US\$ significaría un ingreso inicial en el mercado de productores de cerdo de consumo de US\$ 1.306.800. No obstante,

este mercado presenta ciertas limitaciones dado que los productores en general no cuentan con instalaciones de laboratorio, por lo que habría que desarrollar el servicio a nivel internacional, punto que no hemos incorporado en la evaluación, ya que hemos dirigido fundamentalmente el negocio a la venta de kit y no del servicio a nivel internacional. Por esto el segmento de mercado que posee instalaciones para utilizar los kits actualmente, es el segmento de las empresas proveedoras de genética. Este sector presenta ventas en norteamérica de 1 bn US\$, estas empresas requieren el chequeo continuo semanalmente de sus cerdos y/o semen. Los chequeos son realizados obligatoriamente para evaluar factores productivos y sanitarios y así poder controlar la calidad del semen y/o los cerdos vendidos. Dentro de este chequeo sanitario, la ausencia de enfermedades de transmisión vertical es un punto fundamental, y dentro de los virus que se transmiten por esta vía, el virus PRRS es uno de los más relevantes, por ende los cerdos son chequeados continuamente mediante técnicas diagnósticas, pero ya que para la muestra de semen, no hay más opción que los métodos moleculares, se hace evidente la necesidad y la existencia de un mercado latente por estos métodos moleculares de diagnóstico.

Estas empresas destinan anualmente aproximadamente un 3,33% de sus ingresos al chequeo del status sanitario de PRRSV de sus cerdos. Considerando que el mercado consiste en 1,1 US\$ billones, el mercado potencial para el diagnóstico de PRRSV es de US\$ 36,667 millones (ver detalle en ev. Económica). Más aún si se considera que el mercado norteamericano de empresa de genéticas de cerdos es un mercado muy consolidado, en donde el 60% está en manos de seis grandes empresas, es un segmento más fácil y accesible de abordar, motivo por el cual se considerará este último segmento para la evaluación económica.

Actualmente, estas empresas derivan sus muestras a centros de diagnóstico asociados a universidades (AMES; Univ. Iowa, Univ. Nebraska) para realizar el diagnóstico de PRRSV a partir de semen. Con este proyecto se pretende que las propias empresas incorporen la detección dentro de sus laboratorios, ya que el kit a desarrollar considera una plataforma simple de uso masivo y a un precio conveniente para poder ser incorporada dentro de sus propias instalaciones de laboratorio de control de calidad.

3.9.1.2 Caracterización del Entorno Competidor.

En relación a los kit a desarrollar, al día de hoy en el mercado del cerdo no hay kit moleculares comercialmente disponibles, sin embargo, en el sector porcino existen esfuerzos en una universidad americana en desarrollar un producto de diagnóstico molecular para la detección del virus PRRSV. Diagnetec tuvo la posibilidad de conocer esta tecnología en el curso del año pasado, lo cual fue de gran utilidad ya que presenta ciertas desventajas frente a la tecnología que estamos proponiendo en nuestro proyecto, tales como el precio al cual ellos tienen estimado alcanzar es aproximadamente 35 US\$, precio muy superior al que nosotros podríamos lograr por patógeno (aprox. 20 US\$), además la plataforma tecnológica en la cual están desarrollando el kit es un sistema muy delicado lo cual hace difícil su operatividad a nivel masivo. El conocimiento de estas características nos ha permitido aventajarnos técnicamente, no obstante es de gran relevancia para efectos de participación de mercado, lograr llegar antes que las tecnologías que estas siendo desarrolladas. Esto permitirá introducir la innovación de manera más expedita y la participación de mercado puede ser mucho mayor. Por lo tanto para Diagnetec es crucial el tiempo que tarde en llegar al mercado porcino, ya que significará mayores participaciones del mercado.

3.9.1.3 Negocios Esperados de los Productos a Desarrollar.

El negocio visualizado en se puede dividir en dos instancias, uno es la entrega del servicio de diagnóstico mediante el uso de la tecnología a desarrollar a nivel local y por otro lado, el negocio a nivel internacional se visualiza mediante la comercialización de los kits al extranjero, ya que dado que el desarrollo propuesto es una necesidad real a nivel de productores de cerdos y empresas proveedoras de genética en cerdos, sería muy bien aceptado por los otros países, principalmente (EEUU y Canadá) para el kit de cerdos.

Es importante destacar que el kit tiene la ventaja de ser fácilmente modificado y/o ajustado de acuerdo a las necesidades puntuales de los potenciales usuarios. En relación a la venta y comercialización hay que definir cual sería la figura comercial más adecuada para ello, en donde esta primera etapa de prospección, debiese finalizar con el tipo de figura comercial requerida para lograr la incorporación de estos kit a nivel internacional (alianza comercial , joint venture, spin off, etc)

Respecto al mercado nacional, se continuará a través de la comercialización de Diagnostec principalmente, ya que se posee know-how del mercado.

En relación al mercado porcino norteamericano se pretende establecer contacto en primer término con las empresas de genética ya que debido a que actualmente requieren este tipo de herramientas diagnósticas para semen hace sentido comenzar con este segmento del mercado y luego una vez penetrado comenzar a nivel del mercado de productores que está bastante atomizado respecto a las empresas de genética. Diagnostec posee contacto con la Gerencia de PIC andina , la empresa líder de genética a nivel mundial (posee el 35% del mercado americano), estos contactos sumado a otros que se están estableciendo en el mercado canadiense nos permitirá poder establecer los contactos requeridos para ofrecer los kit desarrollados.

Se estima que la participación en el mercado americano consistirá en un 1% el año 2007 alcanzando al año 2015 un 10%. (ver detalle en memoria de cálculo)

3.9.1.4 Memoria de Cálculo

Inversiones proyecto productivo

Año	2007	2009
Lector biochip+software	\$ 24.000.000	\$ 24.000.000
Termociclador	\$ 6.000.000	\$ 6.000.000
maquina hielo	\$ -	
camara geles	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000
espectrofotometro	\$ 1.500.000	
computadores	\$ 1.500.000	
centrifuga refrigerada	\$ 3.500.000	
fuelle poder	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000
TOTAL	\$ 38.500.000	\$ 32.000.000

Gastos proyecto productivo

Costo Mano Obra	EL costo mensual de mano obra corresponde a \$2.000.000, se asumió a partir del año 2005 ,un aumento del 10% hasta el año 2009. El detalle de este costo consiste en : 1 Subgerente Comercial \$ 1.400.000 , 4 Tecnicos : \$400.000 c/u, Los tecnicos se dedicaran a esta area en un 50% del tiempo. lo que significa un costo mensual de : 1.200.000+ (400.000*4*0,5): \$ 2.000.000
Costo fijo personal contratado	}
Costo fijos en comunicación	Se cargará a esta nueva actividad el 3 % en gastos de comunicación, respecto al costo de Personal
Costos fijos de personal en adm.	Se cargará a esta nueva actividad el 2% en gastos de comunicación, respecto al costo del personal
Gastos generales de prod. variable	Se considera gastos generales todos los costos de servicio a producción , mano de obra directa e indirecta y esta en funcion a la productividad ya que la empresa produce otros servicios . Los gastos generales se proyectan en \$1.000.000 por cada \$50.000.000 en ventas
Gastos de Comercialización	Los gastos comerciales se proyectan en un 3% del volumen de venta, destinado al marketing y comercialización
Pago Royaltie	Se asumió un pago de Royalty a Roche del 2,5% de las ventas, por usar su tecnología de PCR
Gasto Patente	Se consideró un monto de \$60.000.000 para patentar en los mercados de interés.

3.9.1.4.1 Antecedentes Demanda

3.9.1.4.1.1 Chile

Kit de diagnóstico de PRRSV dirigido a empresas Chilenas de cerdos de consumo

Supuestos	
Número cerdas en producción en Chile	170.000
Número cerdas en producción en USA	5.500.000
Analisis realizados por Diagnostec en año introducción	1.000
% diagnosticos/hembras totales en Chile	0,59%
Precio /analisis (US\$)	20
Tasa crecimiento de la industria	7,30%
Tasa de cambio (US\$ / \$)	600
Aumento participación mercado	20%
Aumento participación mercado considerando % crecimiento de la industria	28,8%

Participación Mercado	Chile	Ingresos (US\$)	Año	Ingresos (\$)
Analisis/año 1		19.615	2004	11.769.231
Analisis/año 2		25.257	2005	15.154.062
Analisis/año 3		32.521	2006	19.512.370
Analisis/año 4		41.874	2007	25.124.127
Analisis/año 5		53.916	2008	32.349.826
Analisis/año 6		69.423	2009	41.653.636
Analisis/año 7		69.423	2010	41.653.636
Analisis/año 8		69.423	2011	41.653.636
Analisis/año 9		69.423	2012	41.653.636
Analisis/año 10		69.423	2013	41.653.636
Analisis/año 11		69.423	2014	41.653.636
Analisis/año 12		69.423	2015	41.653.636

3.9.1.4.1.2 Norteamérica

Kits de diagnóstico de PRRSV dirigido a empresas productoras de cerdos de genética	
Total de reproductores vendidos en Norteamérica*	5.500.000
Total de reproductores vendidos por mayores empresas genética en Norteamérica**	3.300.000
Precio por hembra vendida (parent equivalent) US\$	200
Ingresos por venta de mayores empresas (MUS\$)	660.000
Ingresos por venta Totales (MUS\$)	1.100.000
% Ingreso destinado a diagnóstico enfermedades***	3,3%
Presupuesto estimado para monitoreo sanitario de PRRSV de cerdos por año en Norteamérica (miles US\$)	36.667
Tasa de cambio (US\$ / \$)	600
Costo producción kit****	50% Pcio.Vta.
Precio analisis / cerdo (US\$)	6,67

* reproductores considera hembras y machos

** 6 grandes empresas manejan el 60% del mercado aproximadamente. (PIC, Montsanto, Topics, Genetiporc, Danbreed, Seghers, etc)

***Este dato se obtuvo de la empresa Genetiporc la cual desembolsa 600.000 US\$ al año en análisis sanitario de sus verracos y/o semen , y esa empresa vende anualmente 16 millones de US.

****El costo de cada determinación por kit se estimó a partir de conversaciones con la empresa europea con la que se está realizando la colaboración. El desarrollo propuesto tiene por objeto diseñar un kit que obtenga un costo de 6,7 US\$ para lograr ser competitivo. Se pretende que la empresa extranjera realice parte del kit o su totalidad, este punto no puede definirse por el momento, ya que dependerá de los resultados técnicos para llegar a la definición final.

	Ingresos (MUS\$)	Año	Ingresos (\$)	Año
Participación Mercado para Año 3=0%	0	2.004	0	2.004
Participación Mercado para Año 3=0%	0	2.005	0	2.005
Participación Mercado para Año 3=0%	0	2.006	0	2.006
Participación Mercado para Año 4=1%	220	2.007	132.000.000	2.007
Participación Mercado para Año 5=2%	440	2.008	264.000.000	2.008
Participación Mercado para Año 6=3%	660	2.009	396.000.000	2.009
Participación Mercado para Año 7=4%	880	2.010	528.000.000	2.010
Participación Mercado para Año 8=5%	1.100	2.011	660.000.000	2.011
Participación Mercado para Año 9=7%	1.540	2.012	924.000.000	2.012
Participación Mercado para Año 10 al 15=10%	2.200	2.013	1.320.000.000	2.013

3.9.1.5 Flujo de Caja Proyectado

Ver archivo adjunto. FLUJO DE CAJA BIOT-01-024

3.9.2 Antecedentes sobre el número y tipo de usuarios que actual y periódicamente solicita los servicios de diagnóstico del virus prrs.

Los usuarios que actual y periódicamente solicitan los servicios de diagnóstico del virus PRRS a Diagnotec S.A. corresponden a las empresas productoras de cerdos que han tenido alguna vez un resultado positivo a PRRSV y aquellas empresas que tienen alguna sospecha de la presencia del virus (Son aproximadamente una docena de empresas). En la práctica ellas representan a la totalidad de las empresas productoras de cerdos, ya que es la Asociación de Productores de Cerdos (ASPROCER) la que recoge y envía las muestras según los resultados que obtengan del plan de monitoreo del virus.

El diagnóstico continuo del virus PRRS en cerdos de las distintas áreas de los planteles que han sido positivos al virus y en el semen de los verracos permite tener un control de la presencia, de la reaparición y de la erradicación del virus. Asimismo, la genotipificación permite conocer desde donde proviene la infección. En cuanto al plan de erradicación y según fuentes de Asprocer, dado los resultados alcanzados a la fecha, se espera que éste concluya este año.

3.9.3 Antecedentes sobre las nuevas capacidades científicas, técnicas y profesionales que se han generado gracias al proyecto

Las capacidades científicas, técnicas y profesionales que se han generado gracias al proyecto son: por una parte, el diseño y optimización de un método de diagnóstico para el virus PRRSV mediante la capacitación y colaboración de tres estudiantes en práctica de la carrera de bioquímica y/o de ingeniería en bioquímica por año de proyecto. Por otra parte, se contrató una bioquímica doctor en microbiología y una ingeniero en biotecnología para hacerse cargo de la optimización del nuevo servicio, patentación y la exportación de él. Esto implica un fuerte crecimiento de la empresa no sólo en cuanto al aumento de personal, sino que en la proyección de exportación de un producto que considere el diagnóstico de PRRSV.

Flujo de Caja Proyectado

ITEM (montos en \$)	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Ingresos												
Ingresos x kit diagnóstico cerdo en Chile	11.769.231	15.154.062	19.512.370	157.124.127	296.349.826	437.653.636	569.653.636	701.653.636	965.653.636	1.361.653.636	1.361.653.636	1.361.653.636
Ingresos x kit diagnóstico cerdos genética USA/Canada	11.769.231	15.154.062	19.512.370	25.124.127	32.349.826	41.653.636	41.653.636	41.653.636	41.653.636	41.653.636	41.653.636	41.653.636
Egresos												
Costos Hijos de producción	32.873.077	37.374.734	42.675.803	124.856.670	208.244.644	293.126.964	369.026.964	444.926.964	596.726.964	824.426.964	824.426.964	824.426.964
Costo Personal	24.000.000	26.400.000	29.040.000	31.944.000	35.138.400	38.652.240	38.652.240	38.652.240	38.652.240	38.652.240	38.652.240	38.652.240
Costo fijo personal contratado	1.200.000	1.320.000	1.452.000	1.597.200	1.756.920	1.932.612	1.932.612	1.932.612	1.932.612	1.932.612	1.932.612	1.932.612
Costo fijos en comunicación	720.000	792.000	871.200	958.320	1.054.152	1.159.567	1.159.567	1.159.567	1.159.567	1.159.567	1.159.567	1.159.567
Costo hijos de personal en adm.	480.000	528.000	580.800	638.880	702.768	773.045	773.045	773.045	773.045	773.045	773.045	773.045
Costos Variables												
Insumos												
Costos producción kit cerdos genética USA /Canada	-	-	-	66.000.000	132.000.000	198.000.000	264.000.000	330.000.000	462.000.000	660.000.000	660.000.000	660.000.000
Costos producción servicio cerdos para Chile	5.884.615	7.577.031	9.756.185	12.562.064	16.174.913	20.826.818	20.826.818	20.826.818	20.826.818	20.826.818	20.826.818	20.826.818
Gastos generales de prod. variable	235.385	303.081	390.247	3.142.483	5.926.997	8.753.073	11.393.073	14.033.073	19.313.073	27.233.073	27.233.073	27.233.073
Gastos de Comercialización	353.077	454.622	585.371	4.713.724	8.890.495	13.129.609	17.089.609	21.049.609	28.969.609	40.849.609	40.849.609	40.849.609
Pago licencias PCR	-	-	-	3.300.000	6.600.000	9.900.000	13.200.000	16.500.000	23.100.000	33.000.000	33.000.000	33.000.000
Utilidad antes de impuestos	(21.103.846)	(22.220.672)	(23.163.434)	32.267.457	88.105.182	144.526.672	200.626.672	256.726.672	368.926.672	537.226.672	537.226.672	537.226.672
Impuesto a la Utilidad	-	-	-	5.485.468	14.977.881	24.569.534	34.106.534	43.643.534	62.717.534	91.328.534	91.328.534	91.328.534
Utilidad despues Impuestos	(21.103.846)	(22.220.672)	(23.163.434)	26.781.989	73.127.301	119.957.138	166.520.138	213.083.138	306.209.138	445.898.138	445.898.138	445.898.138
Inversiones												
Costo I&D	-	-	-	58.500.000	20.000.000	52.000.000	-	-	-	-	-	-
Equipos e Infraestructura	-	-	-	38.500.000	-	32.000.000	-	-	-	-	-	-
Capital de Trabajo	-	-	-	20.000.000	20.000.000	20.000.000	-	-	-	-	-	-
Patentes Eur, USA, Chile, Canada, Asia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flujo de Caja Neto	(21.103.846)	(22.220.672)	(23.163.434)	(1.718.011)	53.127.301	67.957.138	166.520.138	213.083.138	306.209.138	445.898.138	445.898.138	445.898.138
Flujo de Caja Neto Acumulado	(21.103.846)	(43.324.518)	(66.487.952)	(98.205.963)	(45.078.662)	22.878.476	189.398.614	402.481.752	708.690.890	1.154.589.028	1.600.487.166	2.046.385.304
Tasa de Descuento				15%								

VAN	\$ 495.980.629
TIR	60%

Las herramientas de diagnóstico molecular desarrolladas en este proyecto para la detección del virus PRRS permiten identificar al virus en cerdos vivos y faenados, en elementos contaminantes como moscas, heces y alimento, es decir, se abarcó una serie de aspectos que no estaban contemplados en el proyecto original, con el propósito de lograr realmente el desarrollo tecnológico requerido para erradicar y mantener monitoreado el virus por siempre. También se realizaron los estudios de genotipificación viral, con el fin de conocer el origen de las cepas chilenas y su variación genética, de modo de, tener también una herramienta de estudio epidemiológico.

Creemos que DIAGNOTEC S.A. demostró que posee la capacidad de entregar el apoyo tecnológico que el sector productivo requiere para realizar un control sanitario eficiente, tanto a través del desarrollo de técnicas como del servicio de diagnóstico.

3.10 Conclusiones y Recomendaciones

1- Se desarrolló y se aplicó en los plantales de cerdos chilenos, un método de diagnóstico molecular basado en RT-PCR para la detección del virus PRRS a partir de muestras de sangre, suero, semen, amígdalas, pulmón, nódulos bronquiales, tórula nasal, moscas, heces y alimento de cerdos. Por lo tanto, en la actualidad se cuenta con las herramientas diagnósticas (ELISA y RT-PCR) que permiten realizar un diagnóstico certero. Herramientas que son complementarias en el caso de utilizar suero como muestra.

2-El diagnóstico de PRRSV en semen de verracos es una herramienta indispensable para mantener estos individuos libres de virus en el tiempo.

3-La detección de PRRSV en moscas, heces y alimento permite identificar vectores y fuentes de contaminación viral.

4-En Chile se encuentran cerdos de todas las edades infectados con virus PRRS, desde 1 día a 189 días de edad y en todos los sitios de los plantales (sitio I o maternidad, II o recría y III o engorda), aunque es más frecuente encontrar los sitios de engorda infectados que los sitios I y II.

5-En algunos cerdos de recría y engorda no se observa respuesta inmune hacia el virus, sin embargo, se detecta el virus en la sangre. Esto se puede deber a que el cerdo aún está iniciando el proceso de generar anticuerpos contra el virus, lo que irá aumentando exponencialmente y como consecuencia de esto el virus irá disminuyendo.

6-Se obtienen resultados que indican cerdos positivos al ELISA, pero negativos al RT-PCR, lo que puede ser producto de la neutralización de la infección viral.. Algunos de estos ELISA positivos corresponden a positivos muy débiles que tampoco fueron confirmados por IFAT, lo que podría indicar que se trata de un falso negativo.

7-De los resultados se desprende que el RT-PCR automatizado es menos sensible que el tradicional. Esto se debe a que el Light Cycler requiere de un ácido nucleico puro para tener un rendimiento óptimo, lo que es difícil de obtener desde muestras naturales, especialmente cuando el virus está en muy pocas copias en el tejido infectado. También el costo del análisis automatizado es mayor , por lo que el diagnóstico molecular tradicional es más asequible al productor.

8-Los estudios de genotipificación indican que los aislados chilenos son semejantes entre sí y con la cepa americana, lo que indica que probablemente el virus se introdujo desde material contaminado que provenía de norteamérica Este estudio ha permitido sugerir también, que dentro de Chile la posible fuente de contaminación viral, en la mayoría de los casos ha estado relacionado con errores en el manejo sanitario del plantel infectado.

3.11 Otros aspectos de interés

Creemos que es importante destacar que la aplicación de los métodos de diagnóstico desarrollados por DIAGNOTECH S.A. durante este proyecto, han permitido realizar con éxito los planes de erradicación de PRRSV propuestos por ASPROCER y el SAG. Los asesores extranjeros han manifestado que el apoyo tecnológico de DIAGNOTECH S.A. ha sido de gran importancia para llevar a cabo los planes de erradicación