

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION CARILLANCA
TEMUCO - IX REGION DE LA ARAUCANIA



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS

FUNDACION PARA LA INNOVACION
AGRARIA

INFORME FINAL

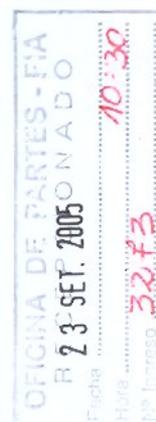
CODIGO BIOT-01-P-35

**“Desarrollo y evaluación
de un sistema para monitoreo
a gran escala de las enfermedades
de la vaca lechera (Brucelosis,
Leucosis, IBR y DBV), basado en la
inmuno detección por ELISA
de anticuerpos específicos
presentes en muestras de leche
recolectadas del tanque predial”**

INIA-CRI Carillanca

Septiembre 2005

TEMUCO-CHILE



INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

Septiembre 2005

I. ANTECEDENTES GENERALES.

Nombre del Proyecto:

Desarrollo y evaluación de un sistema para el monitoreo a gran escala de las enfermedades de la vaca lechera (Brucelosis, Leucosis, IBR y DBV), basado en la inmunodetección por ELISA de anticuerpos específicos presentes en muestras de leche recolectadas del estanque predial.

Código: Proyecto BID-PI-C-2001-1- P-035

Región: IX Región

Fecha de aprobación o adjudicación: 20 de Diciembre de 2001.

Forma de Ingreso al FIA: Concurso

Agente Ejecutor: Unidad de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

Asociados: Soprole, Parlamat, Surlat, SAG IX Región.

Coordinador del Proyecto: Dr. Ricardo Felmer D.

Costo Total:

Aporte del FIA:

Período de Ejecución: Diciembre 2001-Diciembre 2004

II. RESUMEN EJECUTIVO

Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus resultados y los impactos esperados. Debe ser globalizante, incorporando aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando la discusión de detalle en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

Se implementó un laboratorio con moderna tecnología para el diagnóstico serológico y molecular de las principales enfermedades infecciosas del bovino. Esta tecnología, acoplada a la información recolectada directamente desde los productores de la Región y gracias a la colaboración de las empresas lecheras, ha permitido implementar un sistema de vigilancia y monitoreo de las principales enfermedades del bovino, como Brucelosis, Leucosis, IBR y DVB, en base al estudio de la reacción serológica de 317 estanques prediales de la Región. La aplicación de este sistema de vigilancia puede resultar fundamental en los esfuerzos para disminuir la incidencia de las enfermedades a fin de lograr su erradicación. Estos estudios se han complementado con la implementación exitosa de técnicas para el diagnóstico molecular de patógenos bovinos, lo que ha permitido además estudiar la diversidad genética de los mismos y así lograr una mejor comprensión de la epidemiología de estas enfermedades.

Uno de los principales resultados de este proyecto es que se determinó que es factible implementar un sistema de vigilancia epidemiológica basada en el muestreo de la leche del estanque predial, al menos a escala Regional. Para ello es fundamental desarrollar una estrecha colaboración entre el laboratorio, las empresas lecheras, productores y organismos públicos. Con este sistema se pudo establecer por primera vez en la Región, que Leucosis, IBR y DVB se encuentran ampliamente distribuidas en las lecherías de la Región, mientras que Brucelosis se encuentra restringida a unas pocas lecherías. Se logró establecer además, que los métodos moleculares constituyen un excelente complemento al sistema de vigilancia de enfermedades, posibilitando al mismo tiempo realizar estudios adicionales tales como el establecimiento de la epidemiología y distribución de estas enfermedades.

III. TEXTO PRINCIPAL

1. BREVE RESUMEN DE LA PROPUESTA, CON ÉNFASIS EN OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO, METODOLOGÍA Y RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

De acuerdo a datos de ODEPA, Chile cuenta con alrededor de 650.000 vacas lecheras, de las cuales 80.000 se encuentran en la VIII Región, 45.000 en la IX y 350.000 en la X, concentrando juntas más del 73% de las vacas lecheras del país. La producción de leche alcanzó en 2004 a 1.676.000.000 de litros recibidos en 30 plantas lecheras, donde 6 empresas concentraron el 90% de la recepción. Aunque Chile posee una condición sanitaria excepcional entre los países Latinoamericanos, aún persisten en el territorio una serie de enfermedades infecciosas bovinas, tanto zoonóticas como no zoonóticas. Estas enfermedades tienen un impacto directo en la producción de los rebaños lecheros por cuanto disminuyen la fertilidad y la producción, producen pérdidas por aborto, alargan el lapso interparto y constituyen barreras para-arancelarias para la exportación. Los métodos actualmente empleados en nuestro país para el diagnóstico de las enfermedades en bovinos están basados en la detección, en muestras de suero o de leche, de antígenos específicos de los patógenos o en la detección de anticuerpos específicos producidos en respuesta a la infección. Estos métodos corresponden básicamente a seroaglutinación, fijación de complemento, ring test en leche e inmunodifusión en gel de agarosa. Las características operacionales de estos métodos, incluyendo sus costos, impiden aplicarlos en forma masiva a la vigilancia sistemática de un gran número de rebaños. La técnica ELISA permite detectar de manera semi-cuantitativa y con alta sensibilidad la presencia de inmunoglobulinas específicas presentes en la leche, producidas en respuesta a los patógenos causantes de enfermedades. Esto es de gran relevancia ya que el análisis de muestras de leche de estanques prediales permite monitorear a menor costo y con alta eficacia la situación serológica del rebaño y, ante la introducción de un patógeno, se cuenta con la ventaja del diagnóstico precoz. A diferencia de lo que ocurre con los métodos diagnósticos actualmente en uso, esta plataforma ofrece además la posibilidad de sistematizar y escalar fácilmente el sistema de monitoreo de acuerdo a las necesidades, y es posible su plena integración a sistemas de información geográfica para generar herramientas de decisión que apoyen el proceso de erradicación de enfermedades. **En este contexto el proyecto planteó introducir un sistema de vigilancia de amplia cobertura, basado en el uso de la técnica ELISA y el análisis de la leche de estanques prediales, aplicable a las enfermedades de mayor importancia de la IX Región como son la Brucelosis Bovina, Leucosis Enzoótica, IBR y DVB.**

En una primera etapa se establecieron procedimientos para la toma y procesamiento de muestras de leche de estanques prediales, se realizaron estudios tendientes a establecer límites de detección de inmunoglobulinas por efecto de dilución y se comparó la sensibilidad y especificidad de kits ELISA comerciales contra pruebas oficiales. Se recogieron antecedentes en terreno respecto del universo regional de lecherías, así como de sus principales características poblacionales, el uso de vacunas interferentes y posición geográfica a través de geoposicionamiento satelital. Las muestras de leche de estanques prediales se obtuvieron en tres oportunidades gracias a la cooperación de las empresas lecheras Soprole, Surlat y Calán (ex Parmalat). Finalmente se seleccionó un número de lecherías positivas a enfermedades infecciosas específicas, en las que se llevaron a cabo muestreos y análisis de animales individuales con el fin de establecer la relación entre el valor ELISA del estanque y la situación sanitaria de los animales respectivos.

El sistema de vigilancia desarrollado permitió monitorear 337 lecherías de la IX Región, cobertura que representó al 48,8% de aquellas registradas en el SAG, con un total de 20.683 vacas lecheras. Con este sistema se pudo establecer por primera vez en la Región, que Leucosis, IBR y DVB se encuentran ampliamente distribuidas en las lecherías de la Región, mientras que Brucelosis se encuentra restringida a unas pocas lecherías. En suma, el sistema de monitoreo sistemático implementado a escala piloto demostró ser eficaz, confiable, flexible, económico y escalable, lo que avala la factibilidad de establecer dicha plataforma en la región y de proyectarla a nivel nacional. Se logró establecer además, que los métodos moleculares constituyen un excelente complemento al sistema de vigilancia de enfermedades, posibilitando al mismo tiempo realizar estudios adicionales tales como el establecimiento de la epidemiología y distribución de estas enfermedades.

Los principales impactos alcanzados fueron la consolidación de una línea de investigación estratégica en INIA, de alcances nacionales en vista de su escalabilidad y de las oportunidades de negocio asociadas al ámbito productivo pecuario nacional; el inicio del establecimiento en la región de nuevos servicios de monitoreo y diagnóstico en salud animal, el mejoramiento de la sanidad bovina en rebaños directamente involucrados con el desarrollo del proyecto y el acercamiento entre el sector productivo y de investigación y desarrollo regionales.

2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO:

2.1. DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, COMPARACIÓN CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS, Y RAZONES QUE EXPLICAN LAS DISCREPANCIAS.

Nº	Objetivo Especifico	Nº	Resultado Programado	Resultado Obtenido	Diferencias Programado y Obtenido
1	Comparar sensibilidad y especificidad analíticas de kits comerciales, desarrollados para detectar anticuerpos contra <i>Brucella abortus</i> , virus de la leucosis bovina enzoótica, virus causante de IBR o contra el virus de la diarrea bovina viral en muestras de leche.	R1	Técnicas ELISA para los diferentes agentes infecciosos montadas	Se montaron 2 kit por cada enfermedad considerada en el estudio (Brucelosis, Leucosis, IBR y DVB)	Se consideraron solamente 2 kits comerciales debido a que estos correspondían a los de mayor desarrollo y utilización en el mundo.
		R2	Ranking de sensibilidad obtenido	Se estableció el ranking de sensibilidad de las 4 enfermedades con las 2 pruebas evaluadas.	No hay diferencias con lo programado
		R3	Ranking de especificidad obtenido	Se estableció el ranking de especificidad de 3 de las patologías en estudio con las dos pruebas evaluadas.	Debido a la baja prevalencia de brucelosis en la muestra analizada, no se realizó la comparación de Bland-Altman para esta patología.
2	Establecer los límites del sistema de detección de anticuerpos en muestras de tanques prediales en función de títulos de anticuerpos y número de animales por tanque, a través de simulación experimental.	R4	Antecedentes sobre el límite de detección en tanques prediales obtenidos	Se estableció el límite de detección en muestras de leche del estanque predial, para el kit comercial elegido para los posteriores análisis, para cada una de las enfermedades en estudio.	No hay diferencias con lo programado
3	Correlacionar el sistema de detección de anticuerpos en leche de tanque predial, mediante asociación de los resultados ELISA con el estado de salud del rebaño, establecido a través de pruebas respectivas acreditadas por el SAG.	R5	Tanques prediales positivos para anticuerpos determinados	Se analizaron más de 50 estanques prediales, identificando más de un predio positivo para las 4 enfermedades en estudio.	No hay diferencias con lo programado

		R6	Anticuerpos presentes en muestras de suero y leche de animales individuales determinados	Se muestrearon un total de 126 animales para Leucosis, más de 250 animales para Brucelosis y 394 animales para DVB e IBR. Estos animales se seleccionaron desde los predios con estanque positivo identificados previamente.	Se muestrearon finalmente más animales de lo programado originalmente, debido a la necesidad de encontrar animales individuales positivos para cada enfermedad en estudio.
4	Monitorear la presencia de Brucelosis, Leucosis, IBR y DBV en muestras representativas de los tanques prediales de la IX región en función de las capacidades analíticas del sistema y asociar eventuales cambios de reacción a aparición de nuevos contagios o movimientos de animales.	R7	Tanques prediales de la IX Región monitoreados	Se monitorearon 317 estanques de la IX Región a intervalos de 6 meses. Fue posible observar que los cambios de reacción se correspondían con cambios en el número de animales infectados por eliminación o ingreso.	No hay diferencias con lo programado
5	Transferir los resultados de la presente investigación a los productores e industrias del rubro, de manera que puedan conocer y evaluar el potencial de esta nueva tecnología.	R8	Resultados del proyecto difundidos	Se difundieron los resultados del proyecto a través de distintos mecanismos: 6 Artículos Científicos, 4 Presentaciones en Congreso, 3 Posters, 4 Charlas en seminarios o cursos, 3 tesis de pregrado, 7 visitas técnicas y 3 artículos divulgativos (ver detalles en punto 9 del presente Informe).	A medida que el proyecto fue generando resultados en forma satisfactoria, se vio la necesidad de incorporar otras actividades complementarias (análisis mediante PCR) lo que permitió generar nuevos conocimientos que se fueron difundiendo a través de distintas actividades de difusión.

2.2. DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS IMPACTOS OBTENIDOS

2.2.1 Marco Institucional

- a) Gracias a este proyecto, se ha logrado establecer infraestructura y capacidades (*know how*) en el área del diagnóstico en salud animal que no existían previamente en nuestra institución. Estas capacidades desarrolladas son consistentes con los lineamientos y directrices del Ministerio de Agricultura, por lo que esta propuesta también ha contribuido al proceso de modernización e innovación tecnológica del sector pecuario dentro del INIA, necesarios para afrontar los desafíos del proceso exportador que está viviendo nuestro país. Aunque el *know how* adquirido beneficia directamente al rubro lechero, es técnicamente factible derivar de él metodologías aplicables al ámbito de la producción de carne, aumentando así el impacto global del proyecto.
- b) Integración con grupos de investigación en disciplinas relacionadas tanto a nivel nacional como internacional. Esta positiva vinculación permitirá abordar proyectos de investigación en conjunto, potenciando esta línea de investigación y asegurando su continuidad.

2.2.2 Marco Regional

- a) Esta propuesta permitió iniciar el establecimiento de un laboratorio de servicios diagnósticos en la región, con tecnología de vanguardia. Una vez en pleno funcionamiento se habrá puesto a disposición de productores tecnologías y procedimientos de punta para contribuir a mejorar la salud de los rebaños. El laboratorio de servicios diagnósticos servirá también a académicos e investigadores de instituciones públicas y privadas.
- b) El mejoramiento de la sanidad bovina en rebaños directamente involucrados con el desarrollo del proyecto. En el caso específico de brucelosis, un rebaño fue saneado y otros cuatro recibieron diagnóstico precoz que contribuyó al mejoramiento de la condición sanitaria.
- c) Acercamiento entre los sectores productivo y de investigación y desarrollo regionales. Las investigaciones realizadas durante el desarrollo del proyecto recibieron un fuerte apoyo de parte de tres empresas lecheras instaladas en la región asociadas al proyecto, quienes pusieron a disposición de la unidad ejecutora personal, infraestructura y otros recursos que resultaron centrales para el éxito de la propuesta. Lo mismo ocurrió en menor escala con asociaciones de pequeños productores y con productores individuales. De esta forma se generó un estrecho lazo de cooperación que facilitará nuevas iniciativas en materia del mejoramiento de la calidad sanitaria de los bovinos de leche regionales. La experiencia resultante de estas interacciones positivas abre la posibilidad cierta de iniciar con éxito la replicación de esta iniciativa en otras regiones o bien su adaptación y aplicación en el rubro carne.

2.2.3 Marco Nacional

a) En forma muy personal los responsables de este proyecto creen haber contribuido de alguna forma a motivar una mejor actitud de parte de organismos públicos hacia las nuevas tecnologías de diagnóstico. Tal es el caso que algunas de las enfermedades abordadas por el proyecto como leucosis y brucelosis ya están siendo diagnosticadas mediante la tecnología serológica que el proyecto implementó, situación que se veía muy lejana cuando se inició el proyecto en Diciembre del 2001. Así mismo, el Servicio Agrícola y Ganadero está en camino a declarar como prueba oficial el kit ELISA indirecto comercial seleccionado y utilizado en el proyecto para el diagnóstico de Brucelosis. Sin duda este paso facilitará enormemente la creación de servicios diagnósticos en la región y el país.

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO:

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA EFECTIVAMENTE UTILIZADA.

3.1.1 Detección del límite de sensibilidad.

Se obtuvieron muestras de leche de animales positivos para cada una de las enfermedades. En cada caso se evaluaron los títulos de anticuerpos mediante las pruebas ELISA. Las muestras de leche de títulos altos, medios y bajos para los anticuerpos relevantes a cada patología se diluyeron con muestras negativas en diferentes rangos. Las diluciones fueron analizadas mediante la prueba ELISA respectiva, por duplicado o triplicado, incluyendo muestras controles. Esta metodología, permitió conocer los límites de dilución experimental de una muestra positiva que permite detectar el sistema ELISA pertinente.

3.1.2 Correlación del ELISA con las pruebas de referencia.

Básicamente, se asociaron los resultados de los ELISA aplicado en forma individual a muestras de suero o leche con las pruebas de referencia para cada enfermedad. En una primera etapa se recogieron muestras de estanques prediales para seleccionar a aquellos predios positivos para las enfermedades en estudio. Aquellos predios positivos fueron contactados para muestrear en forma individual a los animales de estos predios. Muestras de suero de estos animales se enviaron a los laboratorios del SAG, Santiago para el análisis de IBR, Leucosis y DVB, mientras que una muestra de leche de cada cuarto del animal se destinó al diagnóstico de *Brucella*. Las respectivas muestras de leche y suero de estos animales fueron enviadas al laboratorio de INIA-Carillanca para análisis mediante ELISA. La información generada por todos los análisis se contrastó para establecer la correlación entre las distintas pruebas diagnósticas.

3.1.3 Monitoreo de Brucelosis, Leucosis, IBR y DBV en muestras de estanques prediales de rebaños lechero de las IX Región.

El estudio propuesto se realizó mediante el análisis sistemático de ELISA a las muestras de leche de los estanques prediales de los predios en estudio (326 en total). Este muestreo y análisis se realizó en forma sistemática, cada 6 meses, para evitar la exclusión de animales, que se

encuentren en estado avanzado de gestación (período seco), vaquillas preñadas, etc. Esto permite un diagnóstico seguro y además un mejor control del curso de la infección en el ganado. Este esquema permitió además observar eventuales cambios en las reacciones de los estanques y asociarlos a aparición de nuevos contagios o movimiento de animales. Las muestras de los estanques prediales fueron aportadas por las empresas lecheras participantes en el proyecto (SOPROLE, SURLAT y CALAN (ex - PARMALAT)). La información generada entregó valiosa información de la prevalencia de estas enfermedades en la región, en especial para IBR y DVB, de las cuales existían muy pocos estudios y antecedentes disponibles.

3.1.4 Actividades de transferencia, visitas y reuniones técnicas.

Las actividades de avance y transferencia del proyecto se realizaron a través de distintas presentaciones a Congresos de la especialidad, además de seminarios y charlas técnicas a productores y estudiantes que visitaron nuestras dependencias.

3.1.5 Implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico.

Se utilizó básicamente la técnica PCR para la detección de los ácidos nucleicos de los patógenos causantes de Leucosis y Brucelosis, mientras que para DVB se utilizó RT-PCR. En todos los casos se utilizaron secuencias partidoras que flanqueaban regiones específicas de ácido nucleico de los patógenos que se querían detectar. Las condiciones de reacción fueron ajustadas para cada caso, partiendo con condiciones ya descritas en la literatura hasta encontrar las condiciones que dieron resultados óptimos para nuestras condiciones de ensayo. El resultado se visualizó en sistemas de electroforesis en gel agarosa, cuya concentración dependió del tamaño del fragmento amplificado esperado en cada caso. Finalmente, los geles fueron fotografiados luego de exponerlos a luz ultravioleta, y las imágenes fueron almacenadas como archivos digitales para su posterior tratamiento y registro.

3.2 PRINCIPALES PROBLEMAS METODOLÓGICOS ENFRENTADOS.

Uno de los problemas metodológicos enfrentados tuvo que ver con la disposición de animales positivos para el montaje preliminar de las técnicas tanto para el método ELISA como para las pruebas PCR. Esta situación afectó fundamentalmente las actividades relacionadas con el estudio de sensibilidad de la prueba ELISA y en general afectó directamente el montaje de todas las pruebas PCR, que requieren de animales positivos para el montaje inicial y la optimización. En el caso de Brucelosis, debido a que existe un programa de erradicación de esta enfermedad llevado a cabo por el SAG por muchos años, nos tomó más tiempo de lo presupuestado encontrar animales positivos para esta enfermedad y de esta forma correlacionar el análisis mediante el método de referencia y el ELISA.

3.3 ADAPTACIONES O MODIFICACIONES INTRODUCIDAS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO, Y RAZONES QUE EXPLICAN LAS DISCREPANCIAS CON LA METODOLOGÍA ORIGINALMENTE PROPUESTA.

Durante la ejecución del proyecto, se vio la necesidad de incorporar herramientas moleculares de apoyo al diagnóstico de enfermedades como son las técnicas PCR, RT-PCR y PCR-RFLP. Esta necesidad se basó fundamentalmente en las características de PCR, que al ser una prueba de detección directa del patógeno, permite aplicarse en aquellos casos donde los métodos serológicos como ELISA no tienen aplicación. Uno de estos casos es por ejemplo en aquellos animales vacunados con Triangle 9 y Cattle Master 4, vacunas que dejan huellas de anticuerpos a IBR y DVB. El uso de estas vacunas hace imposible determinar, mediante pruebas serológicas, si estos animales estuvieron efectivamente en contacto con el patógeno, o si la reacción inmunológica se debe a la vacuna. En estos casos, sólo un método de detección directa como puede ser PCR, permite clarificar esta situación. Otra desventaja de los métodos indirectos son su incapacidad para discriminar a aquellos animales que reciben anticuerpos maternos pasivos a través del calostro. En estos casos, los anticuerpos adquiridos por esta vía pueden persistir durante los primeros 6 meses de vida del animal (Burrige y col., 1982). Además, los métodos serológicos no proporcionan evidencia de la infección en su etapa temprana, esto es antes de la seroconversión, que para algunas enfermedades como la leucosis, puede tardar hasta 14 semanas en presentarse. En cambio, PCR permite un diagnóstico confiable en las etapas iniciales de la enfermedad y se puede aplicar a la detección del virus en animales menores de 6 meses, evitando así diagnósticos falsamente positivos causados por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Por otro lado, PCR puede detectar el virus en animales inmunotolerantes, los que no desarrollan una respuesta inmune normal (Fechner y col., 1996). Esto es de particular importancia en el caso de la DVB, enfermedad cuyo principal responsable de la diseminación intra e interpredial, corresponde a aquellos animales persistentemente infectados o PIs. Estos animales se generan en el vientre de una vaca que ha estado expuesta al virus en el primer tercio de la gestación, es decir antes que el animal sea capaz de responder inmunológicamente a un patógeno y por lo tanto al nacer son inmunotolerantes (no producen anticuerpos contra el virus) y sin embargo contienen el virus en todos los fluidos convirtiéndolos en los principales diseminadores de la infección.

3.4 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS PROTOCOLOS Y MÉTODOS UTILIZADOS, DE MANERA QUE SEA FÁCIL SU COMPRENSIÓN Y REPLICABILIDAD.

3.4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

a) Obtención de muestras de leche.

Las muestras de leche de estanque predial se recolectaron directamente en los predios, aprovechando los recorridos que hacen diariamente los camiones de las distintas plantas lecheras. Para este fin, se contó con la estrecha colaboración de las plantas lecheras que participaron en el proyecto SURLAT, SOPROLE y CALAN (ex - PARMALAT). Cuando fue necesario, se obtuvieron además muestras de leche de animales individuales, para lo cual se contactó directamente al dueño del predio para coordinar el muestreo. La recolección de las muestras de leche se realizó mediante ordeña manual en frascos plásticos estériles de 60 ml conteniendo como preservante dicromato de potasio (0.1% p/v). Las muestras fueron tomadas previo a la colocación

de las pezoneras de la ordeña y luego de la higienización de la ubre y eliminación de los primeros chorros de leche. Enseguida, se mantuvieron en neveras portátiles para ser trasladadas al laboratorio ya sea para la posterior extracción de ADN y/o separación de la grasa para utilizarla en el ELISA. En algunos casos se utilizó una porción de estas muestras para analizarla mediante la prueba de referencia que se realizó en un laboratorio acreditado. Todas las muestras se tomaron aplicando medidas de bioseguridad, utilizando guantes de látex y antiparras para minimizar el riesgo de exposición a aerosoles que pudieran contener patógenos.

b) Obtención de muestras de sangre y suero.

Cuando fue necesario se recolectaron muestras de sangre de animales individuales. En este caso, previo a la recolección, se higienizó la zona de la base de la cola con etanol 70%, y se utilizaron tubos Vacutainer de 10 ml sin anticoagulante para la obtención de suero y tubos Vacutainer de 7 ml usando EDTA-potásico (1.5 mg/ml de sangre) como anticoagulante para la obtención de muestras de sangre completa. Las muestras de suero se mantuvieron reposando en gradillas a temperatura ambiente, inclinadas a 45°, mientras que las muestras de sangre se mantuvieron refrigeradas en neveras portátiles, hasta su traslado al laboratorio en el Centro de Investigación de INIA-Carillanca para iniciar su procesamiento. Una vez en el laboratorio se procedió a incubar las muestras a 37°C por aproximadamente 2 horas. El suero se obtuvo mediante aspiración con una micropipeta P1000, cuidando de no perturbar el coágulo y producir hemólisis. Las muestras se centrifugaron 3 minutos a 14.000 r.p.m en una microcentrífuga Eppendorf para remover remanentes de eritrocitos. Finalmente, el suero se guardó congelado a -70°C hasta su utilización. En aquellos casos en que el rendimiento de suero no fue satisfactorio (< 4 ml) se procedió a picar suavemente la muestra con una varilla de vidrio o pipeta pasteur, lo que ayudó a promover la coagulación. Luego de 30 minutos se procedió a centrifugar las muestras a 1000xg por 10 minutos en una centrífuga clínica para separar el coágulo.

3.4.2 IMPLEMENTACIÓN TÉCNICA ELISA.

a) Descremado de muestras de leche.

Para realizar el análisis de ELISA a partir de las muestras de leche, fue necesario realizar una etapa previa de descremado de la leche. El procedimiento consistió en centrifugar las muestras a 2.000xg por 15 minutos en un equipo Sorvall dotado de un rotor de ángulo fijo SS34 (Sorvall, USA). La leche descremada se empleó directamente en los análisis ELISA ó se alicuotó y se congeló a -20°C para análisis posteriores.

b) Análisis ELISA.

El análisis ELISA se realizó de acuerdo a los protocolos y recomendaciones descritos en el manual de cada kit de la empresa SVANOVA y que se detallan a continuación. El procedimiento fue el mismo en cada caso y varió la placa con antígeno específico empleada y el modo de aplicación de la muestra, de acuerdo a las diferencias en los formatos de análisis.

1) Se agregaron 100 µl del control positivo de leche y 100 µl del control negativo de leche a los pocillos correspondientes recubiertos con el antígeno (placas para *Brucella abortus*) y, en el caso

de las placas que constan de él, a los pocillos para antígeno control (placas para BLV, BVDV o IBR).

2) Se agregaron 100 µl de leche descremada a cada pocillo cubierto con el antígeno (*Brucella abortus*) o también a aquellos cubiertos con antígeno control (BLV, BVDV o IBR).

3) Se selló la placa con parafilm y se agitó tres veces por 5 segundos en el módulo de agitación del lector ELISA. Se incubó a 37°C por 1 hora para adsorber el anticuerpo de la muestra al pocillo.

4) Se lavó la placa 3 veces con el tampón de lavado PBS-Tween (180 µl por pocillo cada vez) y se agitó tres veces por cinco segundos. Se vació finalmente el contenido de los pocillos cuidando no dejar ningún remanente de fluido.

5) Se agregaron 100 µl del conjugado (HRP) a cada uno de los pocillos y se incubó a 37°C por 1 hora.

6) Se repitieron los lavados descritos en el punto d.

7) Se agregaron 100 µl de solución sustrato a cada pocillo e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se contó el tiempo al momento de agregar el reactivo al primer pocillo.

8) Se detuvo la reacción agregando 50 µl de Stop Solution a cada uno de los pocillos y mezclando completamente. La solución se agregó en el mismo orden en que se puso la solución de sustrato.

9) Se midió la densidad óptica (DO) de las muestras y controles a 450 nm en el lector ELISA utilizando aire como blanco.

c) Estudios de sensibilidad analítica del ELISA.

La metodología consistió en la dilución de muestras individuales positivas en leche de animales negativos y el análisis en paralelo de las diluciones mediante los kits disponibles. Las diluciones empleadas estuvieron en el rango de 1:50 a 1:250, lo que permite llevar al menos la última dilución al valor del control negativo respectivo. Se comparó entre kits la dilución más alta cuya absorbancia no difería de la del control negativo respectivo.

d) Estudios de especificidad analítica del ELISA.

La metodología consistió en evaluar comparativamente un panel de muestras de animales positivos a distintas condiciones que en nuestro medio se presentan con frecuencia y que, eventualmente, podrían interferir con los análisis serológicos en leche. Muestras de animales positivos a distintas patologías fueron analizadas mediante los kits comerciales disponibles. Se compararon las lecturas entregadas por una u otra marca, buscando discrepancias en la clasificación de las muestras. En algunos casos, también se compararon gráficamente las lecturas respectivas en busca de patrones de concordancia, a través de gráficos de dispersión y gráficos de Bland-Altman. Se recolectaron además muestras individuales de suero de animales infectados

con las distintas patologías, las que fueron remitidas a un laboratorio externo para su posterior análisis mediante las pruebas de referencia respectivas.

3.4.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES MEDIANTE PCR.

3.4.3.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ADN, ARN).

a) Extracción de ADN a partir de muestras de leche.

La extracción de ADN total desde muestras de leche se realizó mediante un método basado en la lisis con el detergente SDS y Proteinasa K. El método consta de cuatro etapas principales que se detallan a continuación:

Procesamiento de las muestras: Se centrifugaron 50 ml de leche a 5.420 r.p.m por 10 minutos a 4°C. El pellet de células somáticas obtenido de esta centrifugación se lavó y resuspendió en 8 ml de tampón Tritón a 4°C. Luego se centrifugó la suspensión a 3.000 r.p.m por 10 minutos a 4°C y se lavó el pellet con 1,5 ml de PBS frío. Esta solución se trasladó a un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml el que se centrifugó a 3.000 r.p.m por 10 minutos a 4°C.

Lisis de membrana nuclear y digestión de proteínas: Se disolvió el pellet en 900 µl de tampón de lisis nuclear y se mezcló vigorosamente para ayudar a su resuspensión. Tan pronto como fue posible se agregó 54 µl de SDS al 20% y 360 µl de una solución de Proteinasa K (1 mg/ml PK, 1% SDS, 2 mM EDTA). Esta solución se dejó incubando durante la noche en un termoblock a 55°C con agitación ocasional a 400 r.p.m.

Extracción salina del ADN: Al día siguiente se agregó 360 µl de NaCl saturado y se agitó vigorosamente por 15 segundos con la ayuda de un vortex. Esta mezcla se centrifugó a temperatura ambiente por 15 minutos a 5.000 r.p.m en una microcentrífuga.

Precipitación de ADN: Se transfirieron 700 µl del sobrenadante de la etapa anterior a dos tubos Eppendorf conteniendo el mismo volumen de isopropanol. El precipitado de ADN, observado como hebras blanquecinas, se dejó reposar por 15 segundos a temperatura ambiente. Para la recuperación del ADN, se centrifugó por 10 minutos a 14.000 r.p.m. y el pellet obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 14.000 r.p.m. por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, dejando los tubos invertidos por 10 minutos para secar el pellet de ADN. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 a 100 µl de tampón TE pH 8.0, mezclándose las dos fracciones correspondientes a una misma muestra. La conservación de las muestras se realizó a -20°C hasta su utilización en el PCR.

b) Extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

El método de extracción de ADN fue básicamente el mismo que para leche, ajustándose los volúmenes de reactivos en forma proporcional al volumen de muestra inicial. La única diferencia consistió en una etapa preliminar de hemólisis de eritrocitos que se aplicó a las muestras de sangre para evitar la presencia de inhibidores del PCR. El detalle de esta etapa se describe a continuación: .

Lisis de glóbulos rojos y obtención de leucocitos: Se mezclaron las muestras de sangre por inversión suave y repetida y se transfirieron 0,6 ml a un tubo de ensayo que contenía 0,75 ml de una solución de NH_4Cl al 0.85 %, mezclando por inversión para producir la lisis de los eritrocitos. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 3.000 r.p.m a 4° C en una centrífuga clínica. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 4 ml de PBS frío. Esta etapa de resuspensión y centrifugación se repitió dos o tres veces hasta que no se observaran restos de hemoglobina en el pellet. Luego de eliminar el último sobrenadante se resuspendió el pellet en 240 μl de tampón de lisis nuclear, continuando el protocolo como se describió anteriormente para las muestras de leche.

c) Extracción de ARN a partir de muestras de sangre y leche.

La extracción de ARN total desde muestras de sangre o leche (pooles e individuales) se realizó mediante preparación de una suspensión celular de la muestra y posterior purificación del RNA mediante un método comercial basado en el uso de minicolumnas (Qiagen) o en el método de Chomczynski.

d) Extracción de RNA mediante el método de Qiagen.

Se extrajo el RNA desde el pellet de células resuspendido en 140 μl de PBS (células somáticas o blancas) preparadas según puntos previos.

Las muestras se equilibraron a temperatura ambiente y se les agregó 560 μl de Buffer AVL conteniendo el RNA "carrier" (AVL/Carrier). Se mezcló cuidadosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se agregó 560 μl de Etanol 100% y se mezcló por 15 segundos. Luego se aplicaron 630 μl de la mezcla a una columna de purificación. Se centrifugó a 8.000 r.p.m en la microcentrifuga por 1', se descartó el filtrado y se puso la columna en un tubo nuevo. Se repitió la carga y centrifugación hasta que toda la mezcla inicial se pasó por la columna. Enseguida, se agregaron 500 μl de buffer AW1, se centrifugó a 8.000 r.p.m en la microcentrifuga por 1' y se descartó el filtrado. Se agregaron 500 μl de buffer AW2 y se centrifugó a 14.000 r.p.m por 3'. Se descartó el filtrado y se volvió a centrifugar por 1 minuto a 14.000 r.p.m., para remover restos de las soluciones de lavado. Para eluir el RNA, se agregaron 60 μl de buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8.000 r.p.m por 1 minuto. El ARN se utilizó inmediatamente y/o se congeló a -70°C .

e) Extracción de RNA mediante método de Chomczynski.

Las células somáticas o blancas se prepararon de acuerdo a lo indicado anteriormente y se lisaron en presencia de 1 ml de Solución de Chomczynski con Fenol mediante pipeteo repetido. Luego de la lisis, las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se añadieron 0.2 ml de Cloroformo por cada ml de Solución de Chomczynski con Fenol usada en la homogenización. Los tubos se agitaron vigorosamente por 15 segundos, y se incubaron 2-3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000xg por 15 minutos a 4°C.

Luego de la centrifugación se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. El RNA se precipitó añadiendo 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Solución de Chomczynski Fenol usada previamente. Se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000xg por 15 minutos a 4°C. El precipitado de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Luego de eliminar el sobrenadante se secó brevemente el precipitado. El RNA se disolvió en 100 µl de agua libre de nucleasas y se guardó a -70°C.

3.4.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

a) Muestras de leche de estanque predial.

Se centrifugaron 50 ml de leche a 3.500 x g por 15' a 4°C. El pellet de células se resuspendió y lavó en 25 ml de PBS frío, tratado con DEPC. La suspensión se centrifugó a 600 x g por 10' a 20°C y el pellet fue nuevamente resuspendido y lavado en 1,5 ml de PBS frío. Este paso se repitió una vez más y el pellet de células se resuspendió en 140 µl de PBS frío.

b) Muestras de pooles de sangre.

Inicialmente se hicieron pooles con 0,5 ml de muestras individuales de sangre de hasta 50 animales (25 ml totales). Debido a la viscosidad excesiva durante la etapa de lisis, se optó por pooles de no más de 10 animales. Estos pooles de sangre se centrifugaron a 600 x g por 10' a temperatura ambiente. El plasma se guardó congelado para medir anticuerpos. Se aspiró ~1 ml de la capa que contiene células blancas y se lavaron con ~4 ml de PBS frío. La suspensión se centrifugó a 600 x g por 15' a 20°C. El pellet se volvió a lavar con 4 ml de PBS frío y se centrifugó a 600 x g por 10' a 20°C. El pellet de células se resuspendió en 140 µl de PBS frío y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5ml libre de RNAsa.

c) Muestras individuales de sangre.

Las muestras de terneros de menos de 3 meses son procesadas individualmente para búsqueda de animales persistentemente infectados (P.I.). Se tomó 1,2 ml de sangre total y se mezcló suavemente por inversión con 1,5 ml de solución de cloruro de amonio al 0,85% (w/v). El lisado se centrifugó a 600x g por 10' a temperatura ambiente. El pellet se lavó dos veces con 4 ml de PBS frío, centrifugando a 600 x g por 10' a temperatura ambiente cada vez. El pellet final se resuspendió en 140 µl de PBS y se transfirió a un tubo Eppendorf libre de RNAsa.

3.4.5 ANÁLISIS MOLECULAR MEDIANTE PCR

3.4.5.1 Lista de partidores utilizados para PCR y RT-PCR.

a) Brucelosis: Bricker y Halling (1994).

PARTIDOR	SECUENCIA
BRU	5' GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC 3'
IS711	5' TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT 3'
RB51/2308	5' CCC CGG AAG ATA TGC TTC GAT CC 3'
eri 1	5' GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA 3'
eri 2	5' CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA 3'

b) Leucosis: Beier et al., (2001).

PARTIDOR SECUENCIA

env5032 FE 5' TCT GTG CCA AGT CTC CCA GAT A 3'
env5099FI 5' CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T 3'
env5521RI 5' GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G 3'
env5608RE 5' AAC AAC AAC CTC TGG GAA GGG T 3'

c) DVB: Drew et al., 1999.

PARTIDOR SECUENCIA

BVD324 5' ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA 3'
BVD326 5' TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC 3'

3.4.5.2 Condiciones de las reacciones PCR.

a) Detección del virus de la Diarrea viral bovina.

1. Incubar 1 hora a 60 °C.
2. Realizar 35 ciclos de: Denaturación: 94°C/30"; Annealing 57°C/1'; Extensión; 72°C/30"
3. Extensión final 72°C/7'.
4. Llevar a 4°C.

b) Detección del virus de la leucosis.

Primer round:

1. Denaturación 94°C/5'.
2. Realizar 40 ciclos de: Denaturación: 94°C/30"; Annealing 59°C/30"; Extensión; 72°C/1'
3. Extensión final 72°C/5'.
4. Llevar a 4°C.

Segundo round:

1. Denaturación 94°C/5'.
2. Realizar 40 ciclos de: Denaturación: 94°C/30"; Annealing 68°C/30"; Extensión; 72°C/1'
3. Extensión final 72°C/5'.
4. Llevar a 4°C.

c) Detección de *Brucella abortus*.

1. Denaturación 94°C/5'.
2. Realizar 35 ciclos de: Denaturación: 94°C/1'; Annealing 57°C/1'; Extensión; 72°C/1'
3. Extensión final 72°C/7'.
4. Llevar a 4°C.

3.4.6 PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA Y SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACION.

Se preparó agarosa a una concentración de 1-2.5% en tampón TAE 1X. La mezcla fue calentada en un horno microondas para lograr su completa fusión. Una vez fundida, la agarosa se enfrió

hasta unos 50°C y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Posteriormente, se vertió la solución en un molde de acrílico con peinetas formadoras de pocillos y se dejó cuajar. El gel así formado se separó del molde, se puso dentro de la cámara de electroforesis y se cubrió con el tampón de corrida TAE 1X.

Los productos de amplificación (10 µl) se mezclaron con 2 µl de Tampón de Carga (0.025 % Azul de Bromofenol, 0.025 % Xilencianol y 40% p/v Sacarosa en Tampón TE pH 8.0) y se cargaron en los pocillos del gel. En cada gel se cargó un pocillo con 1 µg de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, U.S.A.) que sirvió como referencia para la estimación del tamaño molecular de las bandas de ADN. Las separaciones electroforéticas se efectuaron a 100 volt durante una hora. Finalmente, los geles fueron expuestos a luz ultravioleta de onda corta y fotografiados con el sistema fotográfico Kodak Digital Science EDAS 120.

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS PARA LA CONSECUCCIÓN DE LOS OBJETIVOS, COMPARACIÓN CON LAS PROGRAMADAS, Y RAZONES QUE EXPLICAN LAS DISCREPANCIAS.

A continuación se entrega un cuadro que muestra la descripción y resumen de las actividades realizadas programadas y no programadas, de acuerdo a cada objetivo del proyecto, para lo anterior se consideró lo siguiente:

N°	: Indica el número asignado a la actividad inicialmente
P	: Indica que la actividad fue programada inicialmente en el proyecto
NP	: Indica que la actividad no fue programada inicialmente en el proyecto
E	: Indica que la actividad fue ejecutada
NP	: Indica que la actividad no fue ejecutada
OBJ	: Indica el objetivo a cumplir con la actividad realizada
Informe	: Indica el número de informe en cual la actividad fue informada

Nº	P	E	OBJ	DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD	RESUMEN DE LA ACTIVIDAD EJECUTADA	INFORME
1	P	E	1	Aviso a las diferentes partes involucradas de inicio del proyecto.	Para dar inicio al proyecto, se realizó una reunión en nuestro Centro con todos los integrantes del equipo de trabajo, a excepción del Sr. Horacio Miranda. En esta reunión se definieron las actividades del período poniendo énfasis a los posibles problemas como la carencia de información referente al número de productores de la Región, N° de vacas por predio, producción etc, por lo que se acordó consultar las distintas fuentes disponibles para recolectar esta información (plantas lecheras, SAG etc).	1
2	P	E	1	Adquisición de equipos, kits e insumos de laboratorio	Se adquirieron los materiales equipos e insumos necesarios, con lo que se dio inicio a las actividades.	1
3	P	E	1	Contactos con el SAG Santiago para provisión de antígenos y muestras de suero de referencia.	Se visitó el Laboratorio del Complejo de lo Aguirre del SAG, Santiago, para coordinar el envío de las muestras de suero que serían analizadas posteriormente mediante las pruebas de referencia.	1
4	P	E	1	Recepción de equipos y puesta a punto de la técnica de ELISA	Se recibieron los equipos entre Febrero-Marzo del 2002 con los que se comenzó a montar las distintas pruebas de ELISA.	1
	P	E	1	Puesta a punto de la técnica ELISA.	Con los equipos y materiales recibidos, se montaron exitosamente las técnicas de ELISA, para la detección de anticuerpos contra las enfermedades Brucelosis, Leucosis, IBR y DVB.	1
5	P	E	1	Capacitación en los Laboratorios de Svanova Biotech de Suecia.	Esta actividad se realizó satisfactoriamente, aunque en una fecha distinta a la originalmente programada, por haber coincidido la fecha con la realización de una visita que hiciera el consultor Sueco a nuestro país como parte de las actividades de una captura tecnológica también financiada por FIA.	1 y 4
6	P	E	1	Reunión con SAG: Identificación de predios para el estudio de especificidad.	Se contactó al SAG entre otras gestiones, para identificar potenciales predios con animales positivos a las enfermedades en estudio. Debido a la carencia de información confiable, se optó por realizar un pre-screening por ELISA, a las muestras de estanques prediales que llegan al laboratorio de Control lechero de INIA Carillanca, para identificar predios con animales positivos. Los animales negativos para las enfermedades en estudio se obtuvieron del criadero de Carillanca, el cual ha mantenido su status de libre de tuberculosis, brucelosis y leucosis por más de 15 años.	2
7	P	E	1	Muestreo de animales con diagnóstico positivo para tuberculosis, brucelosis, leucosis, IBR, DVB y otras enfermedades infecciosas.	Se identificaron 7 predios en los que se muestrearon aproximadamente 40 animales de cada uno. Algunas muestras individuales (tuberculosis) fueron tomadas y enviadas al laboratorio directamente por veterinarios de terreno de Bioleche.	2

17	8	P	E	1	Estudio de sensibilidad para los diversos kits comerciales.	Se estudió comparativamente la sensibilidad analítica de los kits para la detección de anticuerpos propios de las enfermedades infecciosas. La prueba estaba dirigida a detectar diferencias entre los kits en respuesta a dilución de una misma muestra positiva, siendo aquel kit que detectara reacción a dilución más alta, más sensible en términos analíticos y permitiría, al menos presuntamente, la identificación de animales con títulos más bajos de anticuerpos.	2
18	9	P	E	1	Estudio de especificidad de los diversos kits comerciales.	Se evaluó un panel de muestras de animales positivos a distintas condiciones, que en nuestro medio se presentan con frecuencia y que, eventualmente, podrían interferir con los análisis serológicos en leche.	2
19	10	P	E	2	Análisis y discusión de resultados.	Se analizaron y discutieron los resultados. Al no encontrarse diferencias significativas entre los kits comerciales evaluados, se decidió continuar los trabajos utilizando el Kit de Svanova, por ser más conveniente en términos de precio y para mantener los contactos de colaboración con Suecia, país donde se fabrican estos kits.	3
20	11	P	E	2	Identificación de predios con prevalencia de Brucelosis, Leucosis, IBR y DVB. Estudio tanques prediales. Reunión con SAG IX Región.	La identificación de los predios para los propósitos de esta actividad quedó previamente establecida mediante la actividad N°6. Se realizaron dos reuniones con el SAG Temuco en Octubre del 2002 y recientemente (Marzo del 2003) con los profesionales Waldo Brito y Alfonso Olivares, con quienes se discutió el avance del proyecto. Además, se visitó a las 4 principales empresas lecheras de la Región (Surlat, Parmalat, Loncoleche, y Soprole) para discutir los alcances del proyecto y la importancia de la participación de ellos para el éxito del mismo. Se logró establecer la participación de todas las empresas, a excepción de Loncoleche.	3
21	12	P	E	2	Adquisición de kits e insumos de laboratorio	Se adquirieron los insumos necesarios para las actividades del período.	3
22	13	P	E	2	Salida a terreno y muestreo en predios de animales clínicamente enfermos.	Se visitaron 3 predios localizados en el sector de Freire, para recolectar muestras de 130 animales de rebaños con historial clínico de Leucosis, IBR y DVB. Para Brucelosis fue necesario muestrear un mayor número de predios, 4 (un total de 232) de los cuales se han encontrado hasta el momento 28 seropositivos.	3 y 6
23	14	P	E	2	Screening de anticuerpos en muestras de suero y leche.	Obtenidas las muestras, se procesaron en el laboratorio y se realizaron los análisis por ELISA para las distintas enfermedades.	3 y 6
24	15	P	E	2	Ensayo de simulación de estanque predial.	Se realizaron los ensayos de simulación de estanque predial diluyendo muestras positivas representando a la media de un grupo determinado de animales seropositivos. Estas muestras se diluyeron con leche de animales negativos equivalente a un animal infectado en el rango de 0 a 100 animales no infectados. Las diluciones fueron analizadas por ELISA y se determinó el límite de detección teórico del kit para las enfermedades.	3 y 6
25	16	P	E	2	Análisis de resultados	Realizados los experimentos se analizaron los resultados obtenidos.	4
26							

5. 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.

5.1 RESULTADO N° 1: TÉCNICAS ELISA PARA LOS DIFERENTES AGENTES INFECCIOSOS MONTADAS.

Una vez que se adquirieron los materiales, equipos e insumos necesarios para el proyecto, se procedió a montar las distintas pruebas ELISA, para cada una de las enfermedades en estudio (Brucelosis, Leucosis, IBR y DVB). Se usaron los kits comerciales HerdCheck® (IDEXX, USA) y Svanovir® (Svanova, Suecia), fundamentalmente porque estos dos kits corresponden a los de mayor difusión y utilización en el mundo. Aunque existían otras alternativas, éstas no tenían el respaldo ni el soporte de estas dos marcas, por lo que no se consideró necesario evaluarlas.

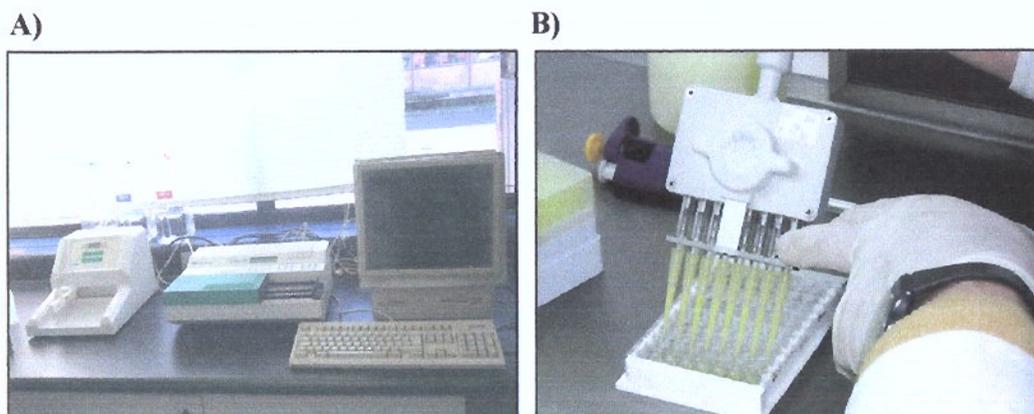


Figura 1. A) Fotografía de los equipos adquiridos: Lavador de microplacas y lector de ELISA. B) Técnico cargando muestras de leche en una placa ELISA.

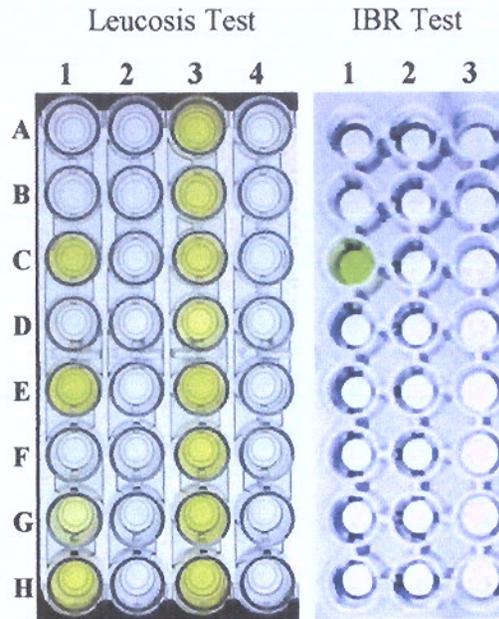


Figura 2. Ejemplo de resultados ELISA para Leucosis e IBR con el kit comercial Svanovir® (Svanova, Suecia).

Leucosis: Pocillos impares (antígeno gp51, de arriba abajo y de izquierda a derecha): A1, blanco; B1, control negativo; C1 control positivo; D1 - H1 y A3 - E3, muestras de las vacas 1 a 10. F3 a H3, pools de las muestras 1 a 3, 4 a 6 y 7 a 10, respectivamente. Pocillos pares (antígeno control, de arriba abajo y de izquierda a derecha): misma carga que en pocillos impares. Resultados similares se obtuvieron con el kit para Brucelosis.

IBR: Test efectuado en animales presuntamente positivos para IBR. Sólo el control positivo dio reacción (C1), mientras que todas las muestras analizadas dieron reacción negativa. Resultados similares se observaron con el kit para DVB.

Tabla 1. Resultados de análisis ELISA para 4 enfermedades a una muestra de vacas provenientes de 8 predios de La Araucanía. (LEU: Leucosis; BRU: Brucelosis; DVB: Diarrea Bovina Viral; IBR: Rinotraqueítis Bovina Infecciosa; Eli: animal eliminado; CAR: Predio Carillanca.)

#	Predio	Vaca	DVB	BRU	IBR	LEU	#	Predio	Vaca	DVB	BRU	IBR	LEU
1	1	2	+	+	+	-	44	3	9831	+	-	-	-
2	1	548	+	-	+	+	45	3	9878	+	-	+	-
3	1	667	+	-	+	+	46	4	7-14	+	-	-	-
4	1	681	+	+	+	+	47	4	7-24	-	-	-	-
5	1	691	-	-	+	-	48	4	7-25	-	-	-	-
6	1	692	-	-	+	+	49	4	7-28	-	-	-	-
7	1	706	-	-	+	+	50	4	8-2	+	-	-	-
8	1	710	+	-	+	-	51	4	8-6	-	-	-	-
9	1	716	+	-	+	+	52	4	8-8	+	-	-	-
10	1	777	+	-	+	-	53	4	8-17	Eli	-	-	-
11	1	780	+	-	+	-	54	4	8-20	+	-	-	-
12	1	788	-	-	+	+	55	4	9-4	+	-	-	-
13	1	797	+	-	+	-	56	4	9-7	+	-	-	-
14	1	798	-	-	-	-	57	4	9-8	+	-	-	-
15	1	801	+	-	+	-	58	4	84	-	-	-	-
16	1	802	+	-	+	-	59	4	92	-	-	-	-
17	1	804	-	-	+	-	60	4	96	-	+	-	-
18	1	831	-	-	-	-	61	4	103	+	+	-	-
19	2	2438	+	-	+	-	62	5	886	+	-	+	+
20	2	2439	+	-	-	+	63	5	1199	+	-	+	+
21	2	2444	+	-	-	-	64	5	1242	+	-	+	+
22	2	2448	+	-	+	-	65	5	1278	+	-	+	+
23	2	2449	+	-	-	-	66	5	1311	-	-	-	+
24	2	2453	+	-	-	-	67	5	1365	+	-	-	+
25	2	2454	+	-	+	-	68	5	1397	+	-	-	+
26	2	2455	+	-	-	-	69	5	1404	+	-	+	-
27	2	2461	+	-	+	-	70	5	1426	+	-	+	+
28	2	2468	+	-	-	-	71	6	11	+	Eli	-	+
29	2	2471	+	-	+	-	72	6	37	+	+	-	+
30	3	0015	+	-	-	-	73	6	119	+	+	-	+
31	3	0027	+	-	+	-	74	6	221	+	-	-	+
32	3	9401	+	-	+	-	75	6	547	+	-	-	+
33	3	9462	+	+	+	-	76	6	558	+	-	-	+
34	3	9632	-	-	+	-	77	6	579	+	-	-	+
35	3	9696	+	-	+	-	78	6	615	-	+	-	+
36	3	9699	+	-	+	-	79	6	638	-	-	-	+
37	3	9755	+	-	-	-	80	6	650	-	-	-	-
38	3	9784	+	-	-	-	81	7	2659	+	-	+	-
39	3	9792	+	-	-	-	82	7	2929	+	-	+	+
40	3	9794	+	-	+	-	83	7	3112	+	-	+	-
41	3	9802	+	-	+	-	84	7	3541	+	-	+	+
42	3	9814	+	-	+	-	85	7	3572	+	-	+	+
43	3	9815	+	-	-	-	86	7	3732	+	-	-	+
44	3	9831	+	-	-	-	87	7	3858	+	-	+	+
45	3	9878	+	-	+	-	88	7	3986	+	-	-	+
46	4	7-14	+	-	-	-	89	7	4047	-	-	-	+
47	4	7-24	-	-	-	-	90	7	4162	+	-	-	+
48	4	7-25	-	-	-	-	91	CAR	2115	-	-	-	-
49	4	7-28	-	-	-	-	92	CAR	2116	-	-	-	-
50	4	8-2	+	-	-	-	93	CAR	2362	-	-	-	-
51	4	8-6	-	-	-	-	94	CAR	2368	-	-	-	-
52	4	8-8	+	-	-	-	95	CAR	2374	-	-	-	-
53	4	8-17	Eli	-	-	-	96	CAR	2378	-	-	-	-
54	4	8-20	+	-	-	-	97	CAR	2379	-	-	-	-
55	4	9-4	+	-	-	-	98	CAR	2381	-	-	-	-
56	4	9-7	+	-	-	-	99	CAR	2382	-	-	-	-
57	4	9-8	+	-	-	-	100	CAR	2391	-	-	-	-
58	4	84	-	-	-	-	101	CAR	2397	-	-	-	-
59	4	92	-	-	-	-	102	CAR	2482	-	-	-	-
60	4	96	-	+	-	-							
61	4	103	+	+	-	-							

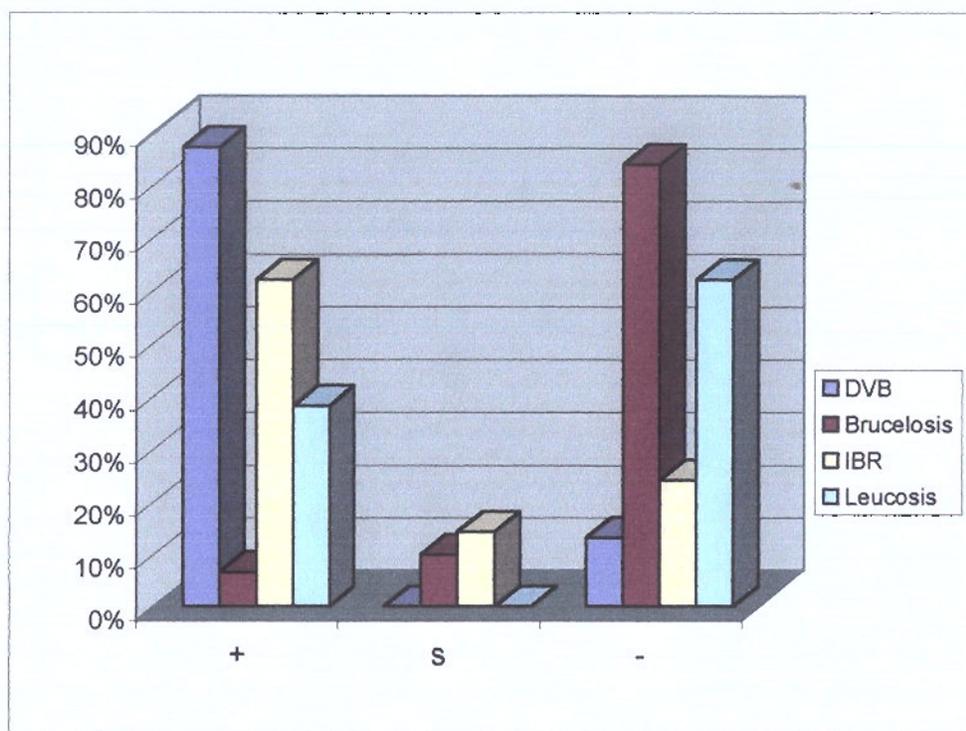


Figura 3. Resultado de análisis ELISA a 70 muestras de estanques prediales y 20 pooles de 10 vacas, representando a 90 predios lecheros de La Araucanía. Las muestras fueron recolectadas a través del laboratorio de Calidad de leche de INIA-Carillanca.

+: muestras positivas; s: muestras sospechosas; -: muestras negativas.

5.2. RESULTADO N° 2: RANKING DE SENSIBILIDAD ANALÍTICA OBTENIDO.

En la Figura 4 se observa una curva de dilución obtenida para una muestra de leche positiva a Leucosis diluida en forma serial en leche de un animal negativo. Estas diluciones fueron analizadas mediante los kits HerdCheck® y Svanovir® y los resultados se expresaron como porcentajes de la reacción obtenida con la muestra sin diluir. En la práctica, los resultados indicaron que no había diferencias entre las marcas probadas, en las condiciones en las que se realizó el ensayo, y que en lo que respecta a esta cualidad cualquiera de las marcas entregará resultados que no diferirán entre sí. Curvas similares se obtuvieron para los kits para Brucelosis, IBR y BVDV.

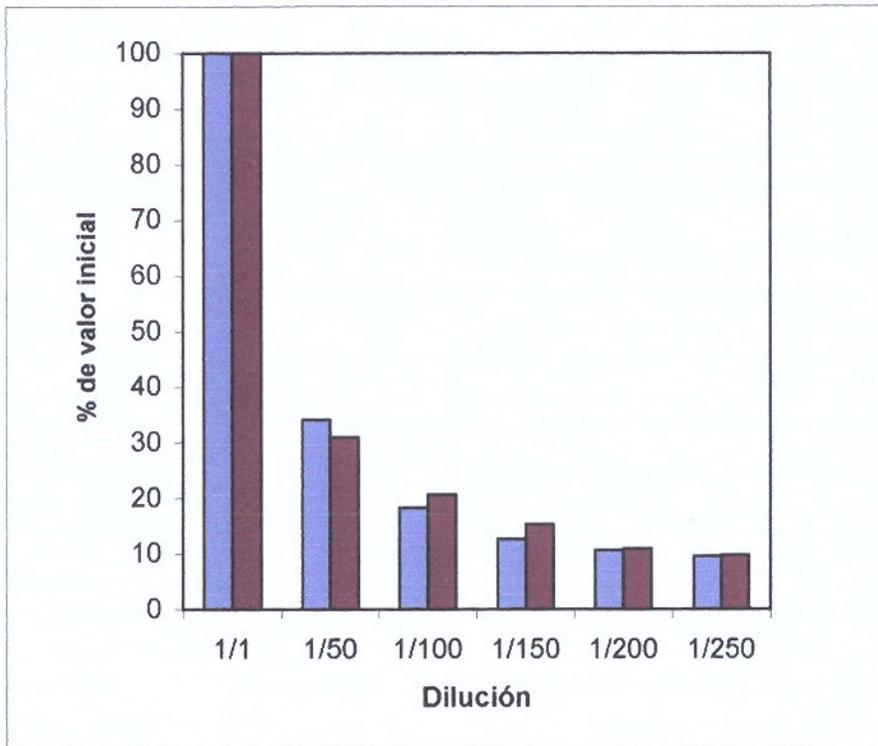


Figura 4. Comparación de curvas de dilución para una muestra positiva a anticuerpos contra virus EBLV en leche, determinadas mediante dos marcas comerciales de kits ELISA (HerdCheck® color claro y Svanovir® color oscuro). Las muestras se analizaron en duplicado y las lecturas se expresaron como porcentaje de la absorbancia de la muestra sin diluir, una vez corregidas en relación a los blancos respectivos.

En las Figuras 5, 6 y 7 se observa los resultados de la comparación de ambos kits comerciales cuando se aplicaron al análisis del mismo grupo muestras. Como se aprecia de los coeficientes de regresión, los resultados son satisfactorios para ambos kits ya sea cuando se utilizaron en muestras individuales de leche (Figura 5) o en muestras de estanques prediales (Figura 6). Sólo en el caso de IBR (Figura 7) y DVB (no mostrado), se apreció una mayor dispersión de los resultados y por ende un menor coeficiente de regresión entre las pruebas. Esta situación, sin embargo, no afectó la identificación de las muestras ya sea como positivas o negativas. La dispersión se debe probablemente a los diferentes antígenos utilizados en cada una de las formulaciones de las placas ELISA de los distintos proveedores. Además, fue posible observar una leve dispersión cuando se utilizó el mismo kit comercial para analizar la repetibilidad del análisis (Figura 8). En este caso, esta leve dispersión de los resultados se debería a errores experimentales que inherentemente se producen al realizar el análisis, aunque nuevamente este efecto no altera el resultado final del análisis. De esta forma, se puede concluir que la performance de ambos kits comerciales evaluados en nuestras condiciones fue similar, no detectándose diferencias entre ambas marcas.

Comparación de kits ELISA SVANOVA e IDEXX para Detección de Anticuerpos a Leucosis en Muestras Individuales (n=126)

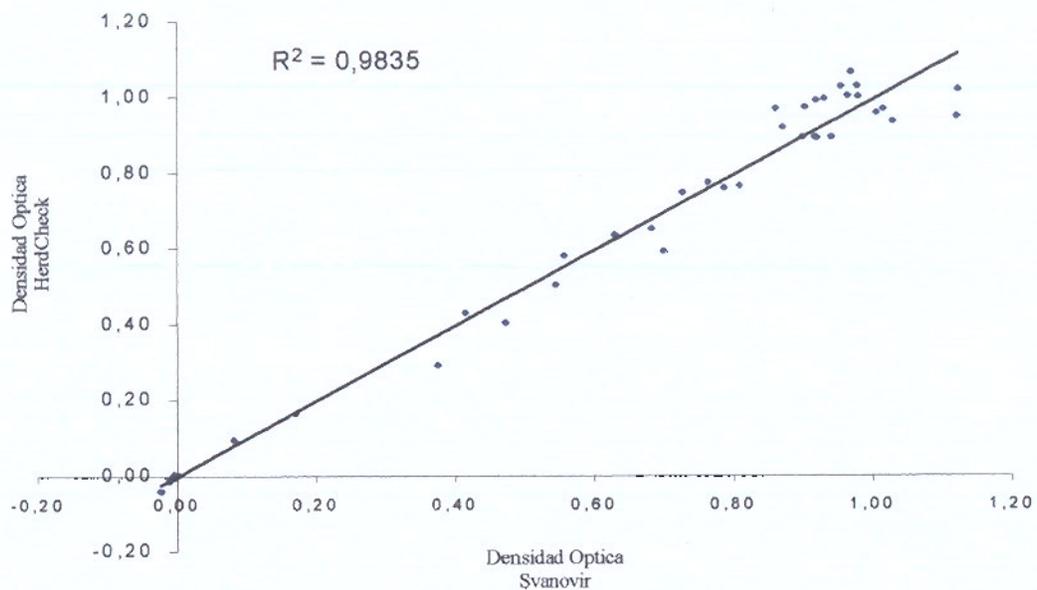


Figura 5

Comparación de kits ELISA SVANOVA e IDEXX para Detección de Anticuerpos a Leucosis en Muestras de Estanques Prediales (n=75)

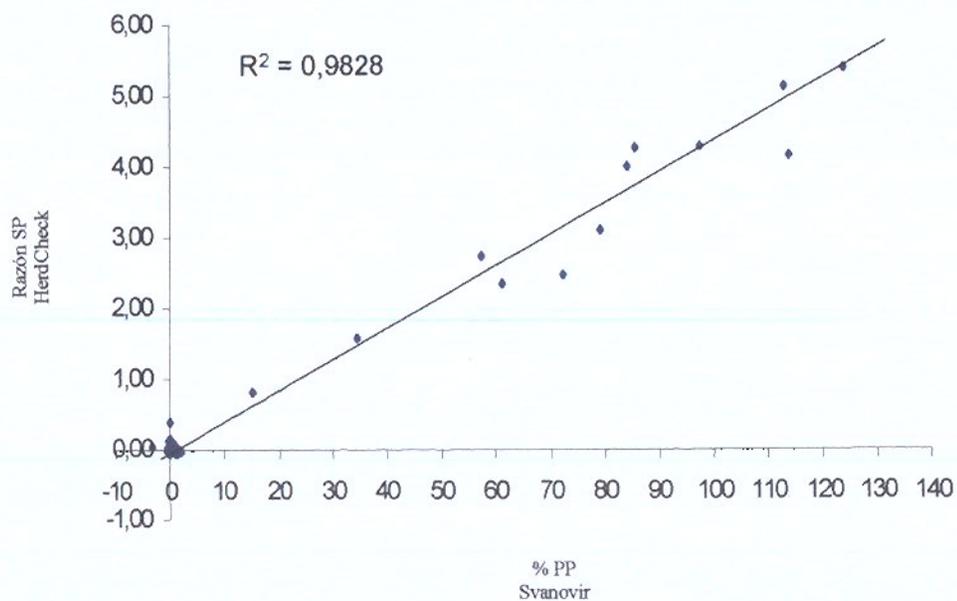


Figura 6

Comparación de kits ELISA SVANOVA e IDEXX para Detección de Anticuerpos a IBR en Muestras de Estanques Prediales (n=75)

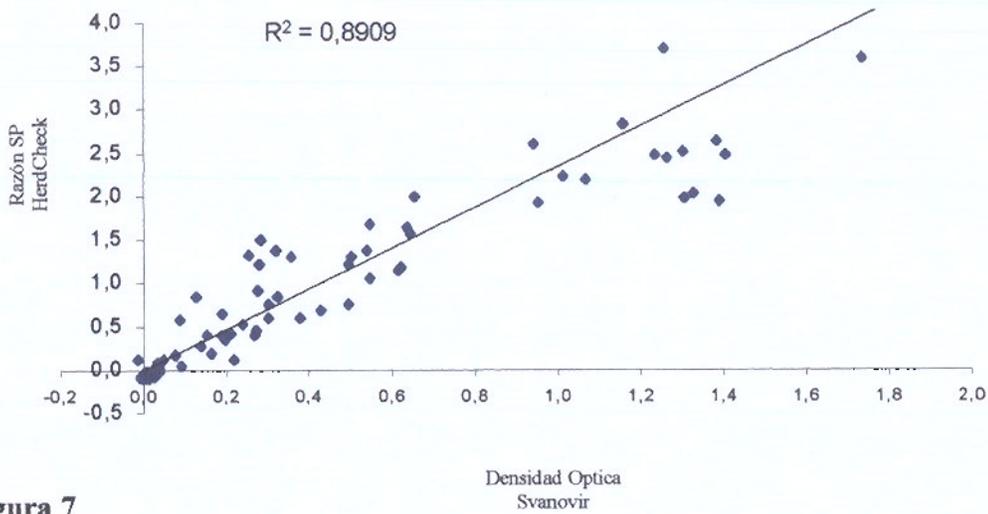


Figura 7

Repetibilidad del kit ELISA SVANOVA para Detección de Anticuerpos a Brucella en Muestras de Estanques Prediales (n=75)

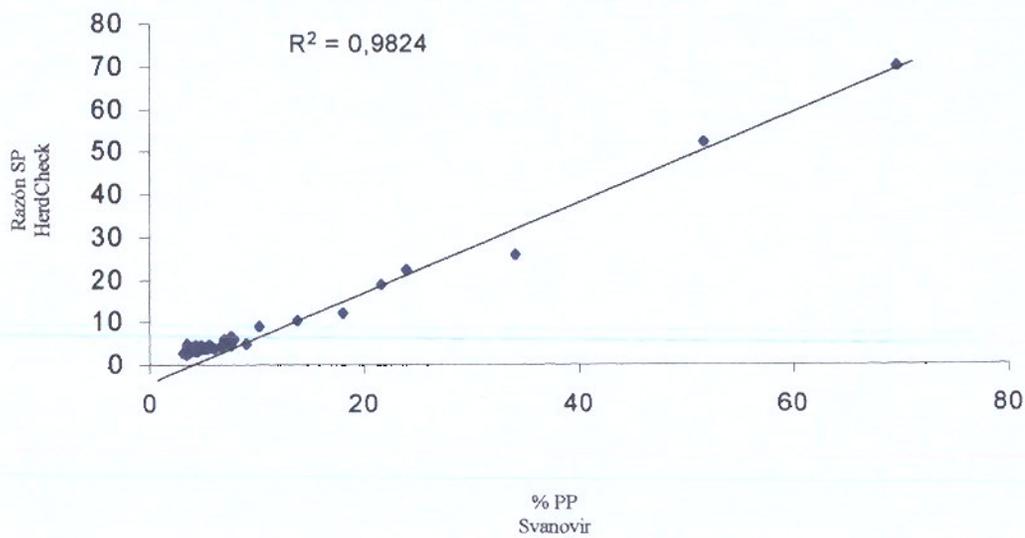


Figura 8

5.3 RESULTADO N° 3: RANKING DE ESPECIFICIDAD OBTENIDO.

Como se apreció en la Figura 3, en la muestra de 70 estanques prediales y 20 pooles de 10 animales evaluada, se observó un alto número de muestras positivas a anticuerpos contra DVB e IBR (87% y 62%, respectivamente), lo que concuerda con los resultados obtenidos posteriormente en un mayor número de estanques prediales de la Región (ver más abajo). A consecuencia de esto, fue difícil encontrar un buen número de animales que mostraran reacción a una sola clase de patología, para poder emplearlos en los experimentos de especificidad. Por esta razón, se establecieron grupos de muestras de animales que fueron analizadas por pruebas de referencia, a fin de clarificar mejor la especificidad de los tests.

Como el screening fue efectuado con las dos marcas comerciales, fue posible comparar el ranking de muestras obtenido con cada uno de ellos a través de gráficos de dispersión para cada patología. En general, se observó que ambas marcas de kits produjeron una clasificación equivalente de las muestras analizadas y que las diferencias se acumularon entre los valores más bajos de las escalas (Figuras 9, 10, 11 y 12). Se observó mayor dispersión de los valores a través de toda la escala en los análisis para BVD e IBR, que podría reflejar el hecho de un mayor número de positivos que en Leucosis y Brucelosis, o bien a que existe menos concordancia entre los kits para estas dos patologías. Sin embargo, los gráficos de Bland-Altman (Figuras 13, 14 y 15) indicarían que, a pesar de la dispersión observada, existe una concordancia aceptable entre las pruebas. Debido a la baja prevalencia de brucelosis en la muestra analizada, no se realizó la comparación de Bland-Altman para esta patología. En conjunto, la información reunida no permitió establecer diferencias significativas entre las marcas comerciales analizadas, concluyéndose que cualquiera de los dos kits comerciales puede ser utilizado sin problemas en un programa de vigilancia de enfermedades como era el objetivo de este proyecto. Cabe destacar que las muestras altas en células somáticas que se analizaron, de hasta de 2.600.000 células/ml (datos no mostrados), fueron negativas para todos los anticuerpos analizados, implicando que no existe interferencia detectable de esa condición con ninguno de los kits analizados.

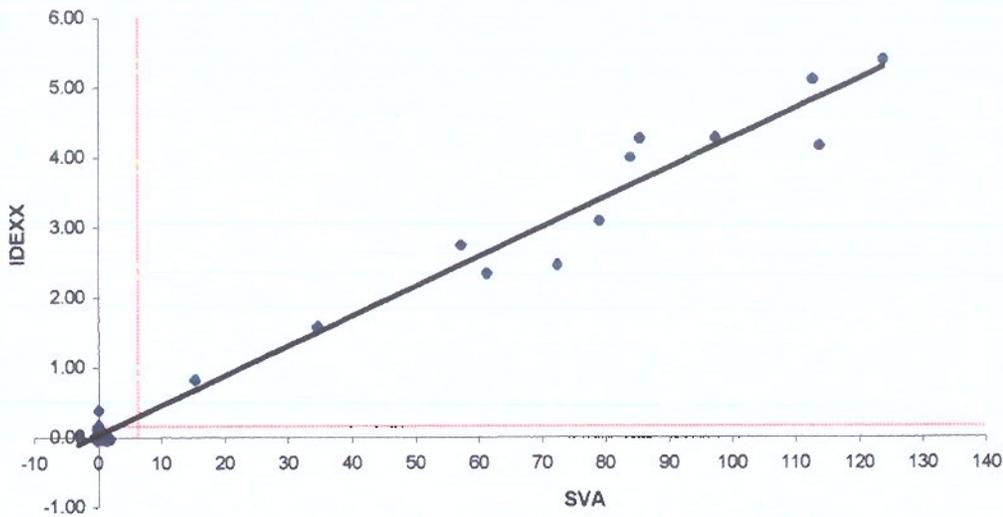


Figura 9. Gráfica de dispersión de los valores obtenidos con dos kits comerciales para el análisis de anticuerpos contra virus EBLV en una población de animales.

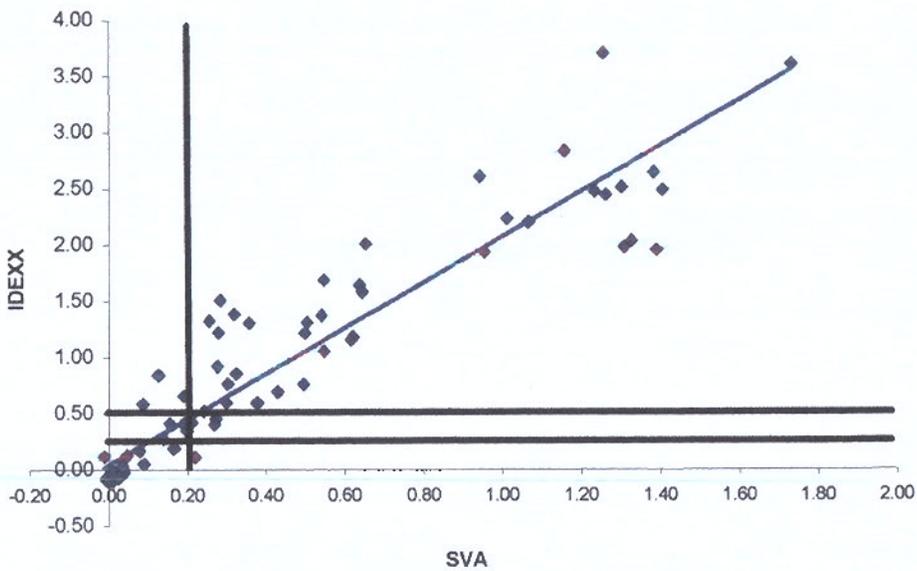


Figura 10. Gráfica de dispersión de los valores obtenidos con dos kits comerciales para el análisis de anticuerpos contra virus BHV en una población de animales.

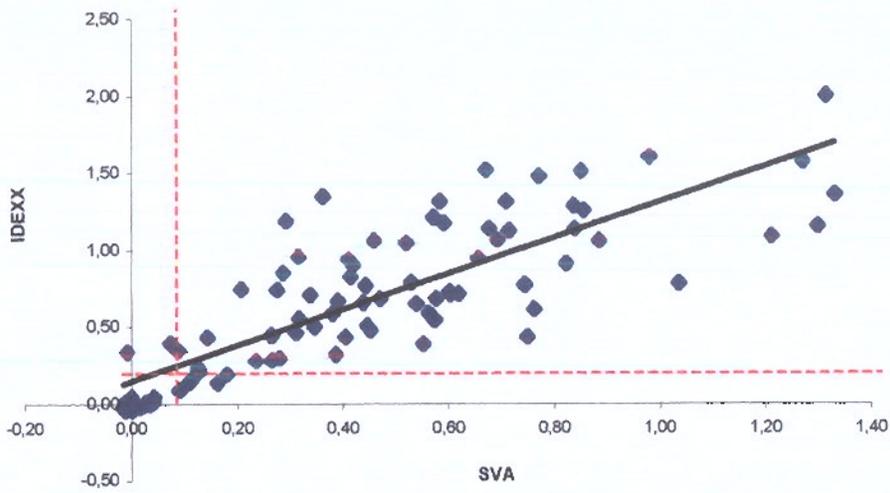


Figura 11. Gráfica de dispersión de los valores obtenidos con dos kits comerciales para el análisis de anticuerpos contra virus BVDV en una población de animales.

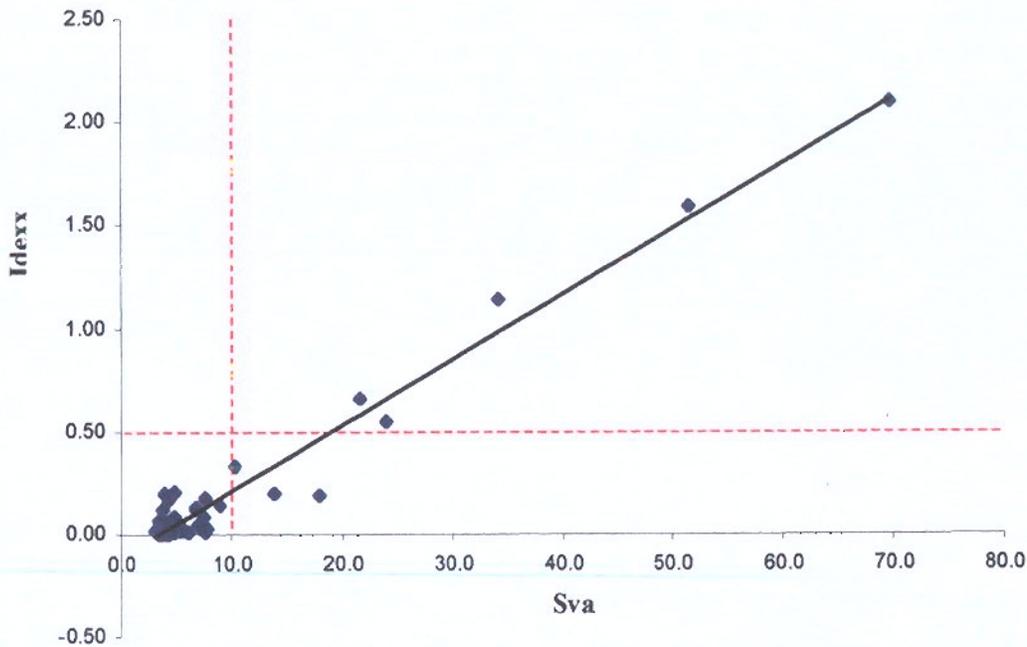


Figura 12. Gráfica de dispersión de los valores obtenidos con dos kits comerciales para el análisis de anticuerpos contra *Brucella abortus* en una población de animales.

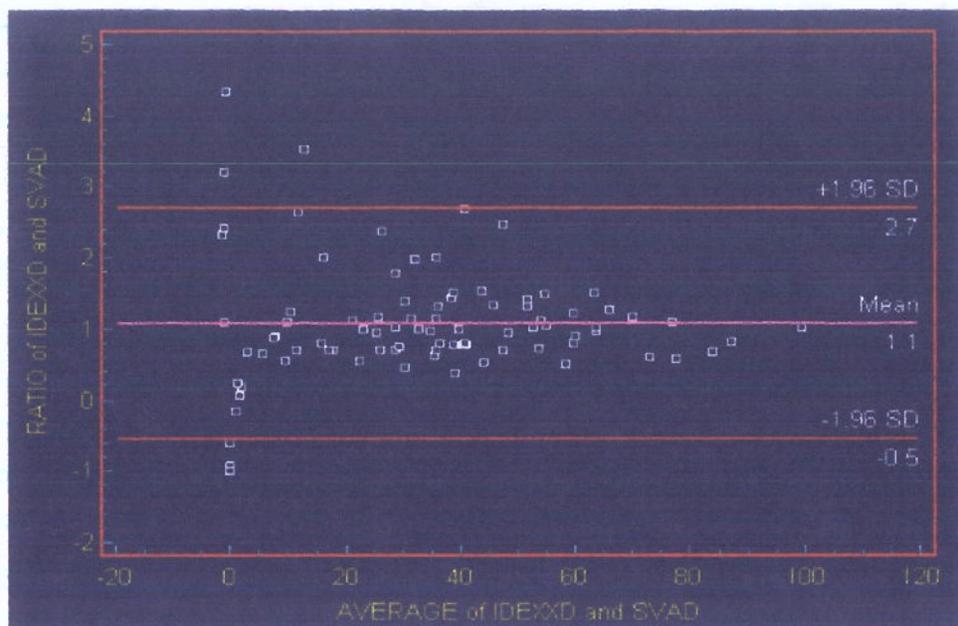


Figura 13. Gráfica de Bland-Altman para los resultados obtenidos mediante dos kits comerciales distintos, para el análisis de anticuerpos contra virus BVDV. Líneas en rojo delimitan los límites de confianza (95%) para los promedios de las lecturas de las muestras.

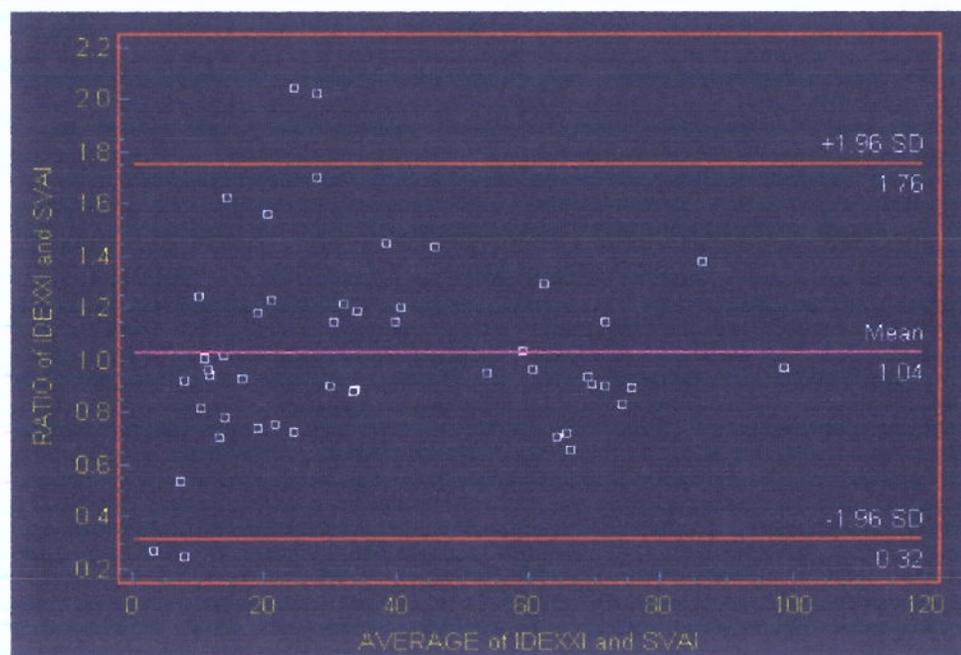


Figura 14. Gráfica de Bland-Altman para los resultados obtenidos mediante dos kits comerciales distintos, para el análisis de anticuerpos contra virus BHV. Líneas en rojo delimitan los límites de confianza (95%) para los promedios de las lecturas de las muestras.

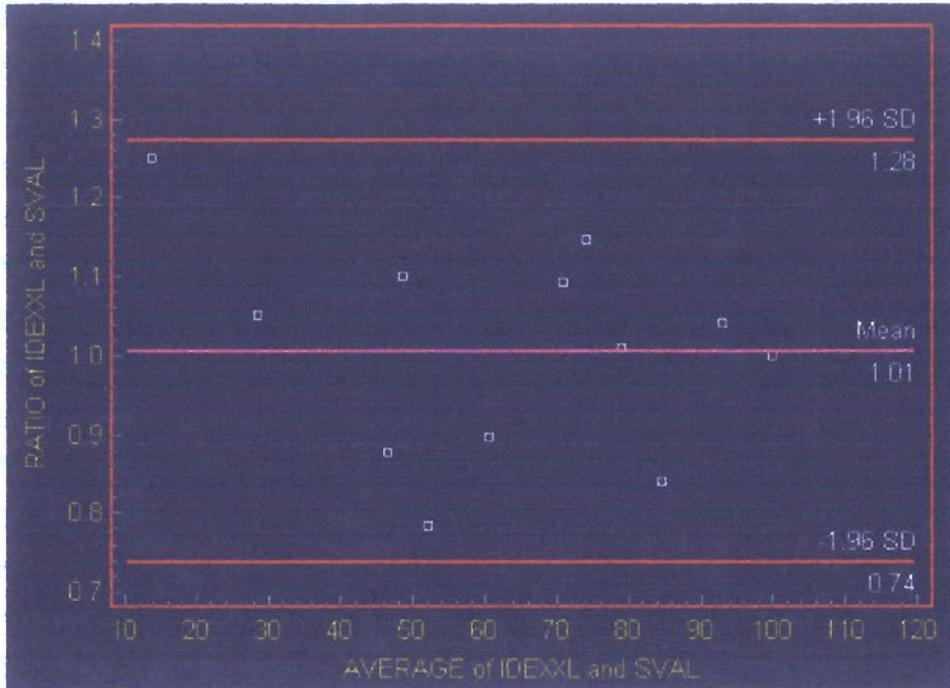


Figura 15. Gráfica de Bland-Altman para los resultados obtenidos mediante dos kits comerciales distintos, para el análisis de anticuerpos contra virus EBLV. Líneas en rojo delimitan los límites de confianza (95%) para los promedios de las lecturas de las muestras.

5.4 RESULTADO N° 4: ANTECEDENTES SOBRE EL LÍMITE DE DETECCIÓN EN TANQUES PREDIALES OBTENIDOS.

Los ensayos de simulación de estanque predial para las enfermedades Brucelosis, IBR, DVB y Leucosis permitieron establecer los límites aproximados de detección de anticuerpos en muestras de leche para cada una de estas enfermedades, con el kit comercial SVANOVIR® de la empresa Svanova. Las simulaciones se hicieron diluyendo 4 muestras de estanque predial positivas a Brucelosis mediante ELISA con muestras negativas equivalente a un animal infectado en el rango de 0 a 640 animales no infectados. En el caso de las otras enfermedades se utilizaron 3 muestras positivas a Leucosis e IBR y 2 muestras positivas a DVB las que se diluyeron con muestras negativas en el rango de 0 a 320. En la Figura 16, se observan los resultados de la diluciones de 4 muestras positivas a Brucelosis y donde se puede establecer que para Brucelosis, el límite de detección de este kit puede ser tan alto como un animal infectado entre 640 animales sanos, por cuanto en la última dilución todavía era posible detectar anticuerpos en las 4 muestras analizadas. Este resultado en conclusión confirma la mayor sensibilidad del ELISA respecto a la prueba de Ring test que se utiliza actualmente en las lecherías. Este resultado es muy favorable por cuanto ninguna de las lecherías con las que se trabajó en el proyecto tiene estanques prediales equivalentes a la recepción de más de 250 vacas lecheras, por cuanto los predios con más de 100 animales disponen de más de un estanque predial y por lo general, manejan las lecherías como rebaños independientes. Estos resultados contrastan marcadamente con los resultados obtenidos para las otras enfermedades en donde el límite máximo de detección no supero más allá de un animal infectado entre 50 animales sanos (Figuras 17, 18 y 19). Sin embargo, este valor es más que suficiente para poder aplicar esta tecnología al monitoreo de estanques prediales en nuestras condiciones, por cuanto la detección de un predio en el cual solamente un animal se encuentre infectado es altamente improbable, considerando la elevada tasa de transmisión de los agentes virales y bacterianos hacia animales susceptibles. En la eventualidad de encontrarse con un predio en esta situación, el sistema de vigilancia permitiría detectar en un segundo análisis el cambio de reacción del estanque, producto de la rápida transmisión de la infección a un mayor número de animales, originando nuevas seroconversiones y un aumento de la reacción del estanque.

Se estima que la probabilidad de dar por negativo a un predio de 50 vacas que tiene un animal positivo es muy baja, por cuanto en estas circunstancias los cuatro kits pudieron detectar anticuerpos en las diluciones correspondientes a este nivel de infección. En predios con un mayor número de vacas, esta probabilidad aumentará paulatinamente y convendrá adoptar como criterio el que todo predio cuyo estanque dé una reacción superior a la del control negativo, sea considerado sospechoso de tener a lo menos un animal seropositivo. Así, el predio quedaría bajo observación y debiera ser muestreado nuevamente para confirmar el primer análisis. Adicionalmente, puede volver a muestrearse en un plazo de 2 a 3 semanas, cuando todos los animales contagiados al momento del primer muestreo habrían completado el ciclo de seroconversión. En el caso de Brucelosis, no será necesario adoptar dicho criterio por cuanto su sensibilidad excede las poblaciones de vacas por lechería encontradas en la realidad.

**Estimación de Límite de Detección de Anticuerpos
contra Brucella mediante ELISA indirecto**

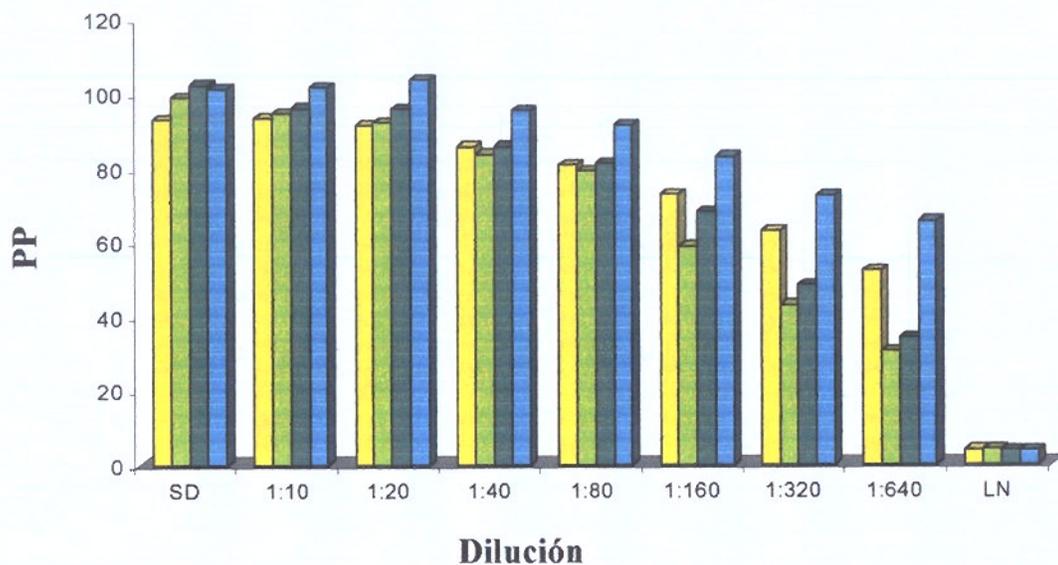


Figura 16

**Estimación de Límite de Detección de Anticuerpos
contra el Virus de la Leucosis (VLB) mediante ELISA indirecto**

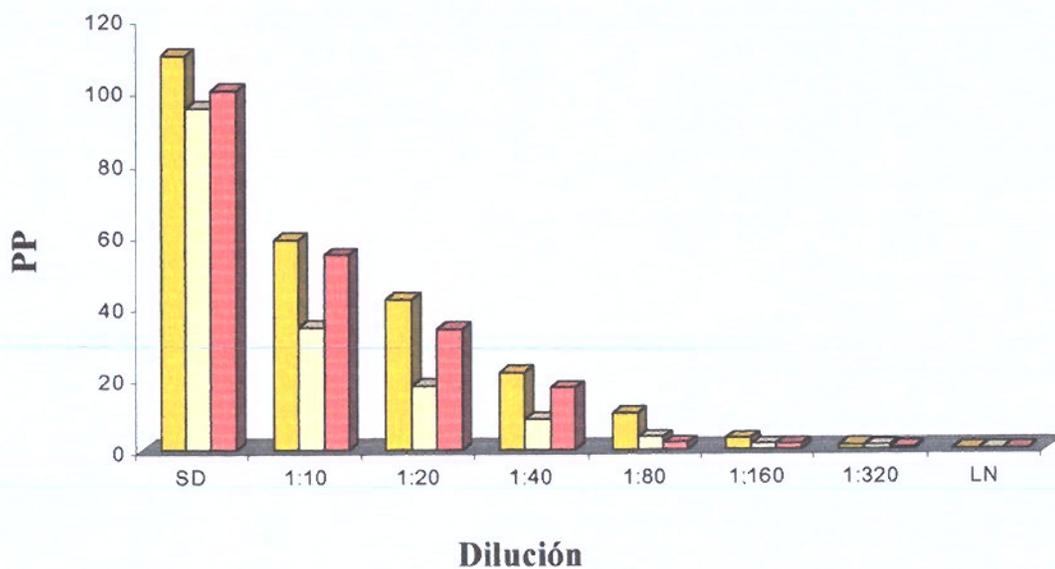


Figura 17

**Estimación de Límite de Detección de Anticuerpos
contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) mediante ELISA indirecto**

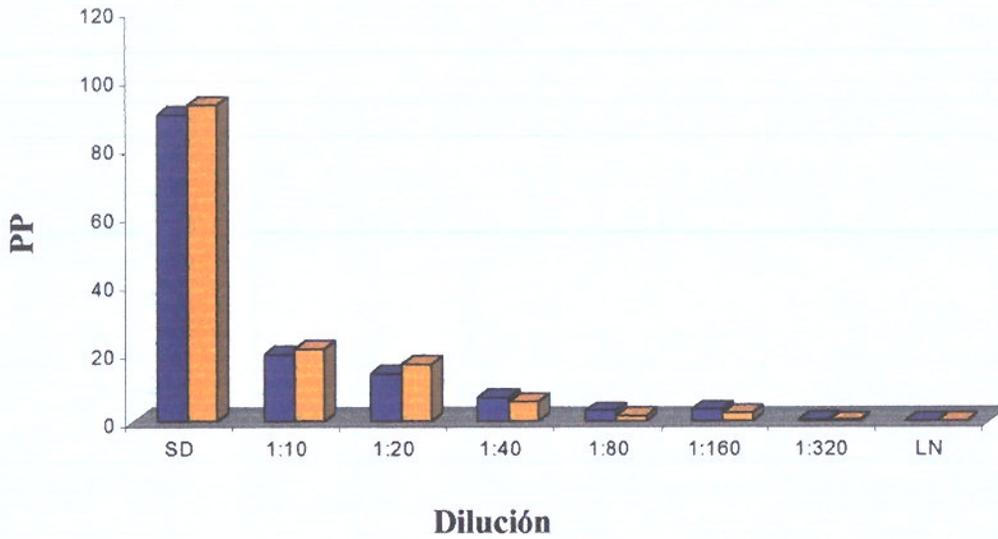


Figura 18

**Estimación de Límite de Detección de Anticuerpos
contra el Virus de la IBR (HVB-1) mediante ELISA indirecto**

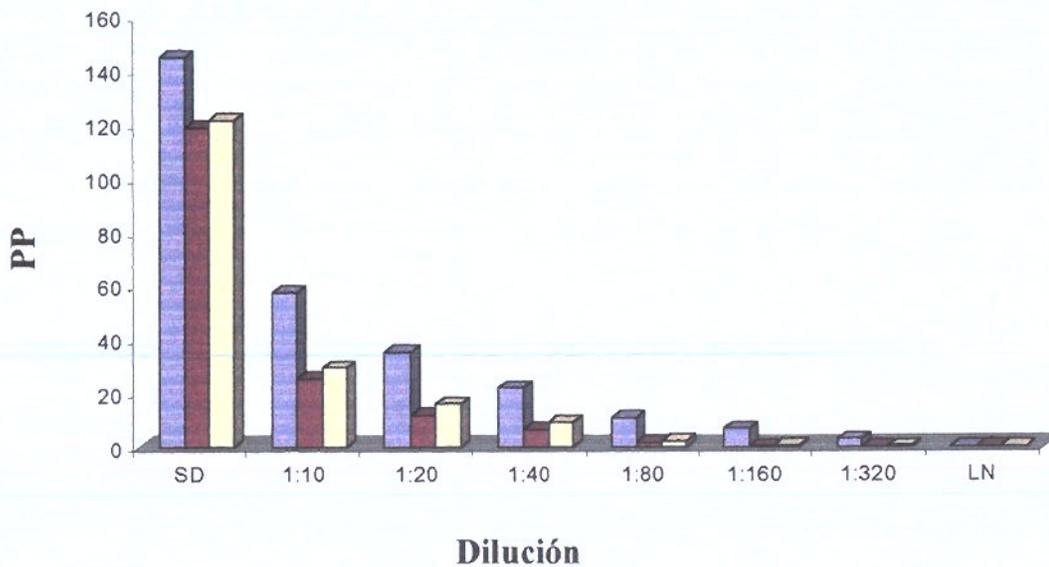


Figura 19

5.5. RESULTADO N° 5: TANQUES PREDIALES POSITIVOS PARA ANTICUERPOS DETERMINADOS.

Nota: Este resultado se informa junto al resultado N° 7 por estar ambos estrechamente relacionados.

5.6. RESULTADO N° 6: ANTICUERPOS PRESENTES EN MUESTRAS DE SUERO Y LECHE DE ANIMALES INDIVIDUALES DETERMINADOS.

Se muestrearon un total de 394 animales pertenecientes a 6 predios tanto de la Comuna de Freire como de Vilcún. Un número aún mayor de animales fueron muestreados para obtener muestras positivas a Brucelosis debido a la baja prevalencia de la enfermedad en la Región. Finalmente, se enviaron un total de 130 muestras de suero al laboratorio del Complejo de Lo Aguirre del SAG Santiago para su análisis mediante las pruebas de referencia y un total de 192 muestras de leche correspondiente a los 4 cuartos de 48 vacas para el cultivo microbiológico. Las pruebas de referencia consistieron en AGID para Leucosis, Seroneutralización (SN) para IBR y DVB y cultivo microbiano para Brucelosis. Muestras de leche correspondientes a todos los animales fueron analizadas en Carillanca mediante ELISA empleando el kit comercial de SVANOVIR, para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra los patógenos de Leucosis, IBR y DVB y Brucelosis. Las pruebas fueron comparadas para estimar el grado de correspondencia entre los resultados.

a) IBR: Las muestras de suero fueron clasificadas mediante SN en no reactivas o negativas (34) y reactivas o positivas (88). Estas últimas presentaron diversos grados de reacción, desde débil (título 2) a fuerte (título 16). Por otro lado, los valores (COD) de reacción ELISA para las muestras de leche correspondientes analizadas variaron entre 0.00 y 1.74. De éstas, 72 tuvieron un valor COD superior a 0.20, siendo clasificadas como positivas y el resto (50) fueron negativas.

Al calcular sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA (en muestra de leche) utilizada en este estudio con respecto a SN (efectuada en muestra de suero) se obtienen los siguientes valores: Sensibilidad 79.3%, Especificidad 91.2 %. Al comparar las lecturas COD dentro de las categorías de títulos obtenidos por SN, se observó que el número de diferencias entre ELISA y SN aumentó considerablemente a medida que disminuye el título SN, presentándose 0/42, 3/19, 5/11, 11/16 y 3/34 diferencias para las categorías de título 16, 8, 4, 2 y 0, respectivamente. También se observó que las muestras dentro de una categoría de título (SN) presentaron una dispersión considerable de valores COD (ELISA), los que se traslapaban con los de aquellas muestras de otras categorías. No obstante, el promedio de valores COD para las muestras de una categoría de título fue mayor a medida que el título aumentaba (COD promedio de 0.07, 0.14, 0.32, 0.56 y 1.03 para las categorías 0, 2, 4, 8 y 16, respectivamente).

Tabla 2. Comparación entre los resultados de Test de Seroneutralización en muestra de suero y Prueba ELISA en muestra de leche para la detección de anticuerpos contra el virus causante de IBR, en 122 animales de un predio lechero de la IX Región.

SN		ELISA			SN v/s ELISA	
Título	N	Minimo	Maximo	Promedio	Coincidencias	Diferencias
0	34	0	0.53	0.07	31	3
2	16	0.02	0.42	0.14	5	11
4	11	0.04	0.85	0.32	6	5
8	19	0.15	1.63	0.56	16	3
16	42	0.25	1.74	1.03	42	0

Distintos factores pueden explicar al menos parte de la falta de correspondencia absoluta entre ambas pruebas: el tipo de muestra empleado en cada test (leche v/s suero), las que para un mismo animal pueden presentar diferencias en cuanto a concentración de los anticuerpos relevantes; la fracción específica de inmunoglobulinas detectada por los tests (IgG v/s IgM) y la capacidad para detectar la misma diversidad antigénica en muestras de campo. A pesar de su buena reputación, SN es un método indirecto y sería recomendable incluir un tercer método en la comparación, directo, para esclarecer las diferencias observadas entre ambos. Un candidato natural, por su simpleza y bajos costos comparativos, es PCR.

La sensibilidad y especificidad del kit ELISA empleado con respecto a SN, aunque no son óptimas, pueden considerarse suficiente para justificar el empleo de ELISA como herramienta de screening para la detección de anticuerpos contra el virus BHV-1, en una situación de alta prevalencia como la que aparentemente predomina en el país. En una condición de baja prevalencia, será necesario aplicar metodologías de vigilancia de alta sensibilidad y especificidad, a fin de no pasar por alto la detección de animales infectados.

b) DVB: Las muestras de suero fueron clasificadas mediante SN en no reactivas o negativas (37) y reactivas o positivas (89). Estas últimas presentaron diversos grados de reacción, desde débil (título 10) a fuerte (título 80). Por su lado, los valores (COD) de reacción ELISA para las muestras de leche correspondientes analizadas variaron entre 0.07 y 1.42. De éstas, 100 tuvieron un valor COD superior a 0.15, siendo clasificadas como positivas y el resto (26) fueron negativas.

Al calcular sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA (en muestra de leche) utilizada en este estudio con respecto a SN (efectuado en muestra de suero) se obtienen los siguientes valores: Sensibilidad 93.3%, Especificidad 54.1%. Al comparar las lecturas COD dentro de las categorías de títulos obtenidos por SN, se observó que la mayor parte de las diferencias se produjo entre las muestras con título SN 0 (negativas): a diferencia del caso de IBR, ELISA dio mayor número de casos positivos que SN. Los casos mencionados fueron confirmados por análisis con un segundo kit ELISA, por lo que es poco probable que se trate de error de análisis. Los mismos factores que afectan la comparación en el caso de IBR son aplicables al caso de DVB.

Tabla 3. Comparación entre los resultados de Test de Seroneutralización en muestra de suero y Prueba ELISA en muestra de leche para la detección de anticuerpos contra el virus causante de DVB, en 126 animales de un predio lechero de la IX Región.

SN		ELISA			SN v/s ELISA	
Título	N	Mínimo	Maximo	Promedio	Coincidencias	Diferencias
0	37	0.07	1.28	0.15	20	17
10	27	0.01	0.91	0.34	25	2
20	34	0.07	1.42	0.46	30	4
40	20	0.15	0.94	0.39	20	0
80	8	0.11	1.23	0.53	8	0

Tabla 4. Informe de resultados de análisis de SN a IBR y DVB realizado por el Laboratorio del Complejo de Lo Aguirre SAG Santiago.

N° Muestra	IBR SN	Título	DVB SN	Título	N° Muestra	IBR SN	Título	DVB SN	Título
1	+	16	+	80	66	+	16	+	20
2	+	16	+	40	67	-	0	+	10
3	+	4	-	0	68	-	0	+	40
4	+	16	+	20	69	+	2	-	0
5	+	16	+	40	70	+	4	-	0
6	+	16	+	20	71	+	16	+	80
7	+	16	-	0	72	+	2	-	0
8	+	16	+	10	73	+	16	-	0
9	+	4	+	40	74	+	8	+	80
10	-	0	+	20	75	-	0	+	40
11	+	16	+	10	76	-	0	+	80
12	+	8	+	20	77	+	16	-	0
13	+	2	+	40	78	+	16	-	0
14	+	16	+	10	79	+	16	+	40
15	+	16	+	10	80	+	4	-	0
16	+	2	+	10	81	+	16	+	20
17	+	8	+	40	82	+	8	-	0
18	+	16	+	40	83	+	16	+	20
19	+	8	+	20	84	+	8	-	0
20	+	8	+	40	85	+	4	+	80
21	-	0	+	20	86	+	16	+	80
22	+	8	+	10	87	-	0	-	0
23	+	16	+	10	88	-	0	-	0
24	+	4	+	10	89	-	0	-	0
25	+	8	+	10	90	-	0	-	0
26	+	2	-	0	91	-	0	-	0
27	+	16	+	10	92	-	0	-	0

Tabla 4. Continuación...

28	+	16	+	20	93	-	0	-	0
29	+	8	+	40	94	-	0	-	0
30	+	16	+	20	95	-	0	-	0
31	+	16	+	20	96	+	2	-	0
32	+	4	-	0	97	-	0	+	20
33	+	16	+	40	98	-	0	-	0
34	+	8	-	0	99	-	0	-	0
35	+	8	+	10	100	-	0	-	0
36	-	0	+	20	101	+	2	+	20
37	+	2	+	20	102	+	2	+	80
38	+	2	+	10	103	-	0	+	20
39	+	2	+	10	104	+	2	+	20
40	+	16	+	10	105	+	2	+	20
41	-	0	+	10	106	-	0	+	10
42	+	16	+	20	107	+	2	+	20
43	+	16	+	10	108	+	8	+	10
44	+	16	+	20	109	+	8	-	0
45	+	16	+	10	110	+	2	+	20
46	+	16	-	0	111	+	16	+	40
47	+	16	+	20	112	+	16	+	10
48	+	4	+	20	113	+	8	+	40
49	-	0	+	10	114	-	0	+	20
50	+	4	+	20	115	+	2	+	10
51	-	0	+	10	116	-	0	+	80
52	-	0	+	20	117	+	8	+	40
53	-	0	-	0	118	+	16	+	20
54	+	16	-	0	119	-	0	+	40
55	+	8	+	40	120	+	2	+	40
56	+	16	-	0	121	+	16	+	20
57	+	2	+	10	122	-	0	-	0
58	+	16	+	20	123	+	4	+	10
59	+	4	+	20	124	+	2	-	0
60	+	8	-	0	125	+	16	-	0
61	+	4	+	40	126	+	8	+	20
62	-	0	+	40	127	+	2	+	40
63	-	0	+	20	128	+	4	+	10
64	-	0	+	10	129	-	0	-	0
65	+	16	+	40	130	-	0	-	0

c) **Leucosis:** Es necesario destacar que para el análisis de Leucosis se realizó en forma complementaria una tesis de pregrado con la estudiante de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, Srta. Marcela Recabal, cuyo objetivo fue comparar el método AGID, que se utiliza actualmente en Chile frente, a ELISA en muestras de suero y leche, y una prueba PCR anidado en linfocitos sanguíneos. Mayores antecedentes se entregan en artículo científico que se encuentra actualmente en revisión en la revista Archivos de Medicina Veterinaria, en anexos de este Informe.

La prueba AGID identificó un menor número de animales positivos que las pruebas PCR en sangre, ELISA en suero y ELISA en leche (Figura 20). De 126 animales analizados, AGID detectó 75 animales positivos, lo que equivale al 60% del total. Por otro lado, PCR detectó un 25% más de positivos que AGID (100/126). Tres animales positivos a AGID fueron negativos según la prueba PCR en sangre y 28 de las 51 muestras negativas a AGID fueron positivas a PCR (Tabla 5). La concordancia obtenida entre ambas pruebas fue de 75% mientras que el valor estadístico *kappa* fue de 0.45, considerándose moderado. La sensibilidad diagnóstica de PCR con respecto a AGID fue de 96% mientras que la especificidad fue de 45%.

Tabla 5. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del PCR en sangre en relación a AGID.

		AGID		
		+	-	Total
PCR	+	72	28	100
	-	3	23	26
	Total	75	51	126
Sensibilidad:		96%		
Especificidad:		45%		
Concordancia: <i>kappa</i>		0.45		

El método ELISA, aplicado tanto en suero como en leche, permitió detectar un total de 100 animales positivos (79%), lo que equivale a un 25% más de animales positivos que la prueba AGID (Tabla 6). Todos los animales positivos a AGID fueron también positivos a ELISA aplicado tanto en suero como en leche, mientras que 25 animales negativos a AGID fueron consignados como positivos a ELISA, en ambas muestras biológicas. De esta forma, la concordancia entre ambas pruebas fue de 79% con un valor *kappa* de 0.55 y los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron 100 y 51%, respectivamente.

Tabla 6. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del ELISA tanto en suero como en leche en relación a AGID.

ELISA	AGID			
		+	-	Total
	+	75	25	100
	-	0	26	26
Total	75	51	126	
Sensibilidad:		100%		
Especificidad:		51%		
Concordancia: <i>kappa</i>		0.55		

El mismo análisis se realizó considerando a la prueba PCR en sangre como el método de referencia y comparando a los métodos AGID, ELISA en suero y ELISA en leche (Tabla 7). En este caso, el valor *kappa* de 0.85 indica una concordancia casi perfecta, tanto en suero como en leche, entre las pruebas PCR y ELISA (Landis y Koch, 1977), manteniéndose la concordancia descrita en la Tabla 5 para PCR y AGID.

Tabla 7. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia de AGID, ELISA en suero y ELISA en leche en relación a la prueba de PCR en sangre.

Prueba usada como Referencia	Prueba Alternativa	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor <i>kappa</i>
PCR sangre	AGID	72	88	0.45
	ELISA suero	97	88	0.85
	ELISA leche	97	88	0.85

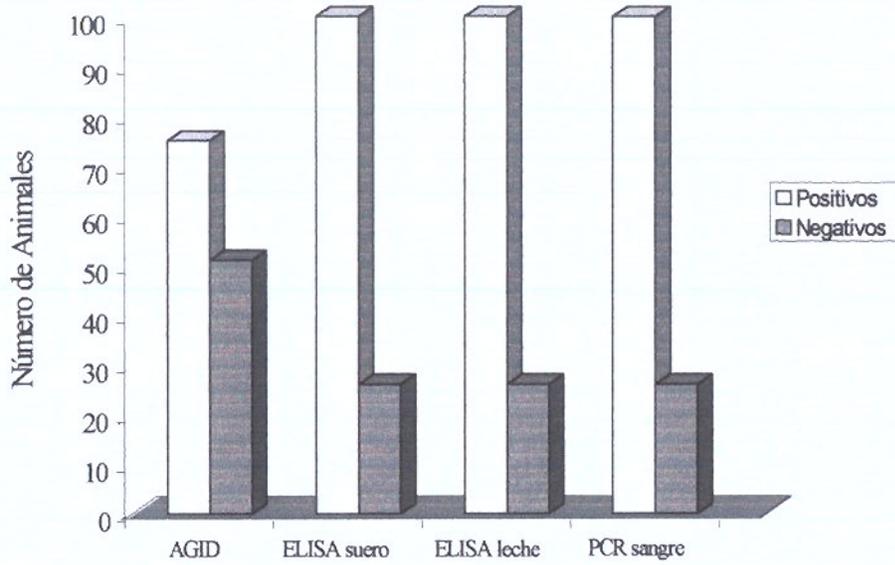


Figura 20. Análisis comparativo de las distintas pruebas analíticas.

Número de animales positivos y negativos identificados con cada una de las pruebas AGID, ELISA suero, ELISA leche y PCR en sangre.

Tabla 8. Lista de animales muestreados y resumen de resultados respectivos de los análisis AGID, ELISA en suero, ELISA en leche y PCR en sangre.

ID Muestra	AGID suero	ELISA suero	ELISA leche	PCR sangre	ID Muestra	AGID suero	ELISA suero	ELISA leche	PCR sangre
1	+	+	+	+	70	+	+	+	+
2	+	+	+	+	71	+	+	+	+
3	+	+	+	+	72	+	+	+	+
4	+	+	+	+	73	+	+	+	+
5	-	+	+	+	74	+	+	+	+
6	-	+	+	+	75	+	+	+	+
7	+	+	+	+	76	+	+	+	+
8	-	-	+	-	77	+	+	+	+
9	+	+	+	+	78	+	+	+	+
10	+	+	+	+	79	+	+	+	+
11	-	-	-	-	80	-	+	+	+
12	-	+	+	+	81	+	+	+	+
13	+	+	+	+	82	-	-	-	+
14	-	-	-	-	83	+	+	+	+
15	+	+	+	+	84	+	+	+	+
16	+	+	+	-	85	+	+	+	+
17	+	+	+	+	86	-	+	+	+
18	+	+	+	+	87	+	-		-
19	-	+	+	+	88	+	+	+	+
20	-	-	-	-	89	-	+	+	+
21	+	+	+	+	90	+	+	+	+
22	+	+	+	+	91	+	+	+	+
23	+	+	+	+	92	+	+	+	+
24	+	+	+	+	93	-	+	+	+
25	+	+	+	+	94	-	-	-	-
26	+	+	+	+	95	-	-	-	+
27	+	+	+	+	96	+	+	+	+
28	+	+	+	+	97	-	+	+	+
29	+	+	+	+	98	+	+	+	+
30	-	-	-	-	99	-	+	-	-
31	+	+	+	+	100	+	+	+	+
32	-	-	-	-	101	-	-	-	-
33	+	+	+	-	102	-	+	+	+
34	+	+	+	+	103	-	-	-	-
35	-	+	+	+	104	-	-	-	-
36	-	-	-	-	105	-	+	+	+
37	-	-	-	-	106	-	-	-	+
38	+	+	+	+	107	+	+	+	+
39	-	-	-	-	108	+	+	+	+
40	-	-	-	-	109	-	-	-	-
41	+	+	+	+	110	+	+	+	+
42	-	+	+	+	111	+	+	+	+
43	+	+	+	+	112	-	+	+	+
44	+	+	+	+	113	+	+	+	+
45	-	-	-	-	114	-	-	-	-
46	-	+	+	+	115	-	+	+	+
47	+	+	+	+	116	-	+	+	+
48	+	+	+	-	117	-	+	+	+
49	-	-	-	-	118	-	+	+	+

Tabla 8. Continuación...

50	+	+	+	+	119	+	+	+	+
51	+	+	+	+	120	+	+	+	+
52	+	+	+	+	121	+	+	+	+
53	-	+	+	+	122	-	-	-	-
54	-	+	+	+	123	+	+	+	+
55	-	-	-	-	124	-	+	+	+
56	+	+	+	+	125	-	+	+	+
57	-	+	+	+	126	+	+	+	+
58	+	+	+	+	127	+	+	+	+
59	-	+	+	+	128	+	+	+	+
60	+	+	+	+	129	-	-	-	-
61	+	+	+	+	130	-	-	-	-
62	+	+	+	+					
63	+	+	+	+					
64	+	+	+	+					
65	+	+	+	+					
66	+	+	+	+					
67	+	+	+	+					
68	+	+	+	+					
69	+	+	+	+					

d) Brucelosis: En este caso, también se realizó una tesis de pregrado con el estudiante de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, Sr. Cristian Sauterel, donde se evaluó, entre otras cosas, el método de referencia de cultivo microbiológico frente a ELISA y PCR. Mayores antecedentes de este trabajo estarán disponibles una vez que la tesis de este alumno esté concluida. Sin embargo, en este informe se describe lo referente a las actividades originalmente programadas en este proyecto.

Mediante ELISA, PCR y cultivo bacteriológico se determinó en paralelo la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* y de *Brucella abortus* en una muestra de 48 animales provenientes de un predio con brucelosis. Los resultados y el análisis de concordancia entre las pruebas se encuentran resumidos en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Lista de animales muestreados y resultados respectivos de los análisis de ELISA, PCR y Cultivo.

Autocrotal	OD	ELISA	Cultivo	PCR
8777	1,113	+	-	+
9171	1,431	+	+	+
6381	1,489	+	+	+
9340	0,942	+	-	+
7714	1,152	+	+	+
9196	1,250	+	+	+
9028	1,026	+	+	+
7519	0,644	+	-	+
7976	0,097	-	-	-
7042	0,936	+	+	+
9007	1,108	+	-	+
9495	1,425	+	+	+
8394	1,337	+	+	+
8565	1,262	+	+	-
8614	1,291	+	-	+
8859	1,046	+	-	+
8964	1,421	+	+	+
8649	1,588	+	+	+
8986	1,202	+	+	+
8508	1,271	+	+	+
8244	0,901	+	-	+
8605	1,303	+	+	+
6933	1,273	+	+	+
8368	1,414	+	+	+

Autocrotal	OD	ELISA	Cultivo	PCR
8562	1,248	+	+	+
7206	1,531	+	+	+
8177	1,247	+	+	+
7853	1,572	+	+	+
9058	1,305	+	+	+
7736	1,319	+	+	+
9319	1,184	+	-	+
6914	1,276	+	+	+
8559	1,290	+	+	+
8419	1,455	+	+	+
8351	1,197	+	+	+
7719	1,297	+	+	+
6867	1,355	+	+	+
8934	1,425	+	+	+
58	1,348	+	+	+
8625	1,461	+	+	+
8630	1,292	+	+	-
8747	1,404	+	+	+
8410	1,428	+	+	+
7556	0,103	-	-	-
9147	0,059	-	-	-
8975	1,061	+	+	+
9194	1,184	+	+	+
8331	1,252	+	+	+

Tabla 10. Cuadros de Contingencia para el análisis de concordancia entre tres pruebas diagnósticas aplicadas a una muestra de 48 animales de un predio con Brucelosis.

a)		Cultivo		
		+	-	Total
ELISA	+	37	8	45
	-	0	3	3
	Total	37	11	48

b)		Cultivo		
		+	-	Total
PCR	+	35	8	43
	-	2	3	5
	Total	37	11	48

c)		PCR		
		+	-	Total
ELISA	+	43	2	45
	-	0	3	3
	Total	43	5	48

a) Cultivo vs ELISA.

La concordancia porcentual entre ELISA y Cultivo fue de 83,3%. Ambas pruebas calificaron de idéntica forma a 37 animales positivos y a tres animales negativos. ELISA dio como positivos a ocho animales que fueron negativos al Cultivo. Al respecto, es pertinente mencionar que el análisis bacteriológico no fue realizado inmediatamente después de recibidas las muestras en el Laboratorio de Referencia, por lo que es razonable suponer que un número de positivos auténticos no pudo ser detectado por Cultivo. No se observaron muestras que, siendo positivas a Cultivo, fueran negativas a ELISA. El valor *kappa* -que indica el nivel de concordancia entre un par de pruebas- fue bajo e indica una baja concordancia entre este par de pruebas. Sin embargo es necesario precisar que ello sólo es el efecto del bajo número comparativo de casos negativos en la muestra del estudio y no se considerará en el análisis.

b) Cultivo vs PCR.

En este caso la concordancia porcentual fue de 77,3%. Ambas pruebas calificaron del mismo modo a 35 muestras positivas y a tres negativas. Al igual que en el caso anterior, PCR dio como positivas a ocho muestras que Cultivo dio como negativas, lo que tiene como probable explicación la demora en el cultivo. Por tratarse de las mismas muestras que ELISA dio positivas (Tabla 10), se podría especular que el número de bacterias viables para cultivo en esas muestras era insuficiente para dar positivo a Cultivo. Se observó que, a excepción de dos muestras, todos los positivos observados por Cultivo fueron positivos a PCR, indicando el excelente nivel de sensibilidad de la prueba molecular. Estas dos muestras también eran positivas a ELISA, y entre las causas de esta discrepancia puede considerarse la posibilidad de error y/o inhibición de la reacción PCR.

c) PCR vs ELISA

La concordancia porcentual fue 95,8% y las diferencias se originaron en un par de animales negativos a PCR y positivos a ELISA. No se observaron animales positivos a PCR y negativos para ELISA.

Considerando lo anterior, se concluye que ELISA (al valor de corte utilizado) detectó al menos el mismo número de positivos detectado por Cultivo y que PCR fue ligeramente menos sensible que Cultivo y en general muy similar a ELISA. Si el resultado de las ocho muestras negativas a Cultivo y positivas a PCR y ELISA se acepta como válido, entonces ELISA o PCR detectaron un mayor número de positivos que Cultivo, y la combinación de ELISA y PCR fue superior a cualquiera de ellos por sí solo frente a Cultivo.

5.7 RESULTADO N° 7: TANQUES PREDIALES DE LA IX REGIÓN MONITOREADOS.

5.7.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS LECHERÍAS REGISTRADAS EN EL ESTUDIO

De acuerdo a fuentes oficiales (SAG, Abril de 2004) en Mayo de 2003 existían 658 lecherías distribuidas en 26 comunas de la IX Región. En este estudio se registraron entre Junio de 2003 y Septiembre de 2004, un total de 317 lecherías. Esto significa que casi la mitad (48.2%) de las lecherías oficialmente reconocidas en La Araucanía se muestrearon y analizaron a lo menos una vez durante el período de observación. El estudio abarcó 17 comunas de la región y un universo de 523 lecherías. De esta forma, las 317 lecherías muestreadas en esas comunas representaron el 60.6% del universo existente a nivel de las 17 comunas visitadas. El número de lecherías muestreadas en cada comuna varió entre 1 (Ercilla, Imperial y Perquenco) y 68 (Pitrufquén) y la proporción del universo comunal muestreado lo hizo entre 13% (Loncoche) y 100% (Cunco, Galvarino, Gorbea, Imperial y Perquenco) (Tabla 11).

De las 317 lecherías registradas en el período, 187 muestras se recibieron en Junio de 2003, 216 en Diciembre de 2003 y 246 en Septiembre de 2004 (59.0%, 61.1% y 77.6%, respectivamente). Asimismo 6, 11 y 41 muestras se recibieron exclusivamente en el primer, segundo o tercer muestreo (1.9%, 3.5% y 12.9%, respectivamente) y sólo 149 se recibieron en los tres muestreos (47.0%). Este comportamiento se debió en parte a que las empresas lecheras no siempre enviaban todas las muestras que debían. También algunas lecherías dejaron de entregar leche a determinada planta por cierre o por destinar la producción a la quesería. El incremento en el tercer muestreo se debió casi exclusivamente a la incorporación de predios de pequeños productores afiliados a los centros de acopio. Si bien hasta aquí se juzga como provechosa, es evidente la necesidad de perfeccionar la integración con las empresas lecheras a fin de garantizar que un mayor número de lecherías puedan ser muestreadas en todas las oportunidades.

Tabla 11. Distribución del muestreo de lecherías en comunas de la IX Región.

Comuna	Universo	Muestra	%
Angol	9	6	67
Collipulli	2		
Cunco	13	13	100
Curacautín	10	7	70
Ercilla	7	1	14
Freire	89	57	64
Galvarino	2	2	100
Gorbea	40	40	100
Imperial	1	1	100
Lautaro	21	10	48
Loncoche	86	11	13
Los Sauces	1		
Padre Las Casas	11	8	73
Perquenco	1	1	100
Pitrufquén	144	68	47
Pucon	1		
Puerto Saavedra	3		
Puren	9		
Renaico	80		
Temuco	7	4	57
Teodoro Schmidt	15		
Tolten	7		
Traiguén	10	3	30
Victoria	11	10	91
Vilcun	61	57	93
Villarrica	14		

Se dispuso de datos poblacionales de 263 lecherías de la muestra, las que representan al 40.4% de las lecherías de la región y al 50.3% de aquellas presentes en las 17 comunas del estudio. Esta fracción de las lecherías acumuló 20.683 vacas, con un promedio de 78.6 vacas por lechería. Las lecherías con menos de 50 vacas fueron las más abundantes (58.2% de las lecherías). Aquellas con 50 a 100, 100 a 150 y más de 150 vacas correspondieron al 14.1, 10.6 y 17.1% de la muestra, respectivamente. En conjunto, las lecherías con más de 150 vacas acumularon más de la mitad (55.2%) del total de vacas de la muestra (Tabla 12).

Table 12. Población de vacas lecheras en una muestra de lecherías de la región de La Araucanía (Año 2004, n=263).

Segmento poblacional	Número de lecherías	Porcentaje	Total de vacas por segmento poblacional	Porcentaje
<50	153	58,2%	3387	16,4%
50 a 100	37	14,1%	2499	12,1%
100 a150	28	10,6%	3388	16,4%
>150	45	17,1%	11409	55,2%
Total	263	100,0%	20683	100,0%

Casi un tercio de las lecherías de la muestra pertenecía a un centro de acopio (Lecherías CA, n=75, 29%), las que típicamente tenían menos de 50 vacas. Las poblaciones de vacas en las lecherías que no pertenecían a centros de acopios (Lecherías no CA) estaban más balanceadas, con menos de la mitad de ellas ubicadas en el segmento poblacional más bajo (Figura 21 y Tabla 13). Así mismo, se estableció que en la comuna de Freire se ubica la mayoría de los predios con más de 100 animales y que comunas como Pitrufrquén y Gorbea concentran preferentemente a pequeños productores. Vilcún presenta proporciones similares de lecherías grandes y pequeñas.

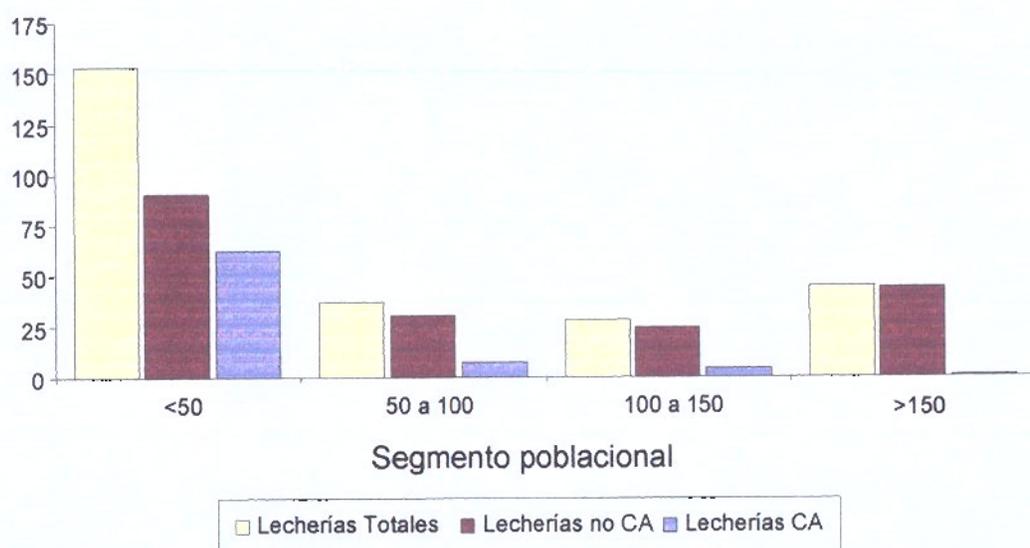


Figura 21. Número de lecherías totales por segmento poblacional y según afiliación a centro de acopio (n=263, Año 2004).

Tabla 13. Detalle de características poblacionales de 263 lecherías de la IX Región en relación a afiliación a centros de acopio (Año 2004).

	<50			50 a 100			100 a 150			>150			Total	%
	Número de Lecherías	% Segmento	% Total	Número de Lecherías	% Segmento	% Total	Número de Lecherías	% Segmento	% Total	Número de Lecherías	% Segmento	% Total		
CA	63	41%	84%	7	19%	9%	4	14%	5%	1	2%	1%	75	29%
No CA	90	59%	48%	30	81%	16%	24	86%	13%	44	98%	23%	188	71%
Total	153	100%	58%	37	100%	14%	28	100%	11%	45	100%	17%	263	100%

CA: Lecherías afiliadas a centro de acopio. No CA: Lecherías no afiliadas a centro de acopio. La fila superior se refiere a los segmentos poblacionales de menos de 50, 50 a 100, 100 a 150 y más de 150 vacas por lechería.

5.7.2 USO DE VACUNAS INTERFERENTES

A través de una encuesta y de entrevistas con productores, se estableció que sólo el 16,4% de las lecherías había utilizado vacunas que interfieren con el serodiagnóstico de DVB e IBR. En estos casos, su uso siempre obedeció a sospechas de la presencia de los patógenos en el predio. No obstante, esta conclusión se basa en datos aportados solamente por el 31.2% de las lecherías.

5.7.3 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS LECHERÍAS

Se determinó la localización geográfica de las lecherías mediante un receptor satelital. A la fecha se dispone de tal información para 268 lecherías, que representan el 84.5% de aquellas efectivamente muestreadas. A partir de este conjunto de datos se pudo determinar que la gran mayoría de las lecherías muestreadas se localiza en el valle central y preferentemente en las comunas de la provincia de Cautín (Figura 22). Esta distribución estuvo naturalmente condicionada por el área de cobertura de las plantas lecheras que colaboraron con el proyecto, lo que excluyó el muestreo de áreas lecheras importantes como Renaico, Villarrica y Loncoche, o de áreas que entregan la producción a plantas queseras como ciertas comunas de la costa.

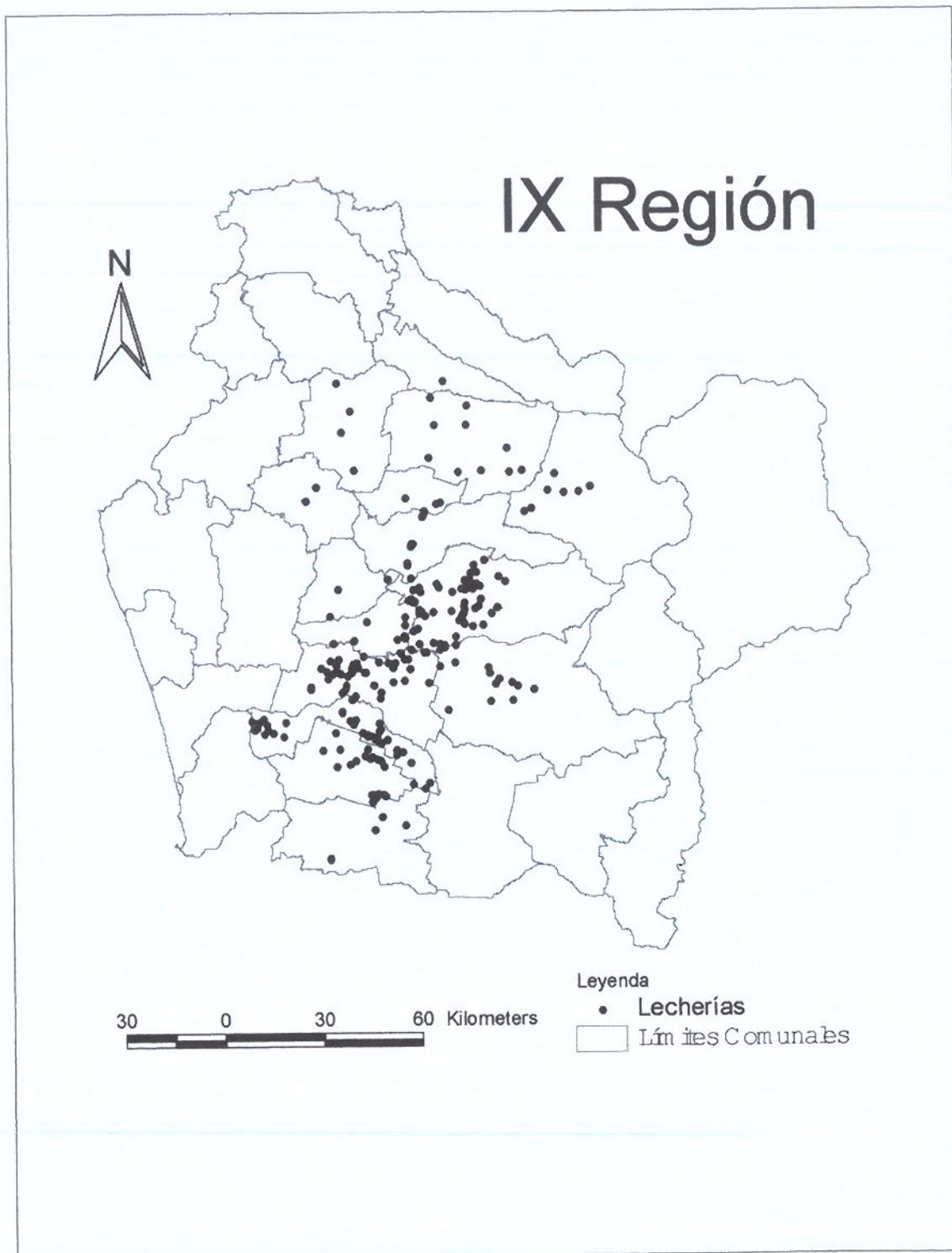


Figura 22. Localización geográfica de 268 lecherías de la IX Región (Septiembre de 2004).

5.7.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS LECHERÍAS

Inicialmente se utilizó el número asignado independientemente por cada empresa lechera a sus respectivos proveedores. Posteriormente se usó el rol predial único (RUP), asignado a cada establecimiento pecuario por el SAG. Debido a que ciertos predios tienen más de una lechería y un único RUP, se añadió a éste un sufijo correlativo que permitió la diferenciación de todas las lecherías de la muestra. Como el sistema de identificación mediante RUP partió a mediados de 2004, a la fecha el 88% de las lecherías cuenta con código asignado. En ciertos casos se detectó que el RUP asignado no corresponde al de la comuna en el que efectivamente se encuentra la lechería y fueron notificados al SAG para su rectificación.

5.7.5 ANTECEDENTES SEROLÓGICOS

Los antecedentes serológicos recopilados en tres muestreos efectuados entre Junio de 2003 y Septiembre de 2004, indican que la situación de las cuatro enfermedades en las lecherías incluidas en el estudio es diversa y mientras que BRU se encuentra bajo control, LEB, DBV e IBR son altamente prevalentes entre las lecherías estudiadas.

a) Brucelosis: Hubo anticuerpos detectables en 12, 10 y 12 lecherías en cada muestreo, representando 6.4, 4.6 y 4.9% del total de muestras recibidas en cada oportunidad. Estos valores reflejan una baja presencia de la enfermedad en las lecherías estudiadas y una tendencia a su eliminación gradual. Esta favorable situación se confirma al examinar la evolución de la serología en un grupo de 149 lecherías cuyas muestras pudieron ser recibidas y analizadas en las tres oportunidades. En este grupo, el porcentaje de lecherías positivas para anticuerpos fue de 6.7, 4.7 y 4.7% en los sucesivos muestreos (Tabla 14).

Al analizar la evolución de la inmunidad en el grupo de 149 lecherías se observó que en 11 de ellas se detectaron anticuerpos en a lo menos una de las tres ocasiones (7.4%). En cuatro de estos casos se observó una disminución sostenida de la reacción durante el período, reflejando la aplicación exitosa de medidas de control en los rebaños afectados. En otro caso, una lechería pasó de una reacción altamente positiva a una negativa, lo que se asoció a la remoción completa de animales seropositivos desde ése rebaño. Hubo un caso en el que se observó un aumento sostenido de la reacción, probablemente asociado a diseminación intrapredial o a la ineficacia de las medidas de control implementadas. En otro, luego de una fuerte disminución de la reacción entre el primer y segundo muestreos, se apreció un nuevo incremento de la reacción, asociado tal vez a medidas de control deficientemente aplicadas. Fue posible comprobar que en todos estos predios el Servicio Agrícola y Ganadero había detectado animales positivos mediante las técnicas habituales. Además, tanto el muestreo de animales individuales en algunos predios como la información aportada por los respectivos administradores permitieron confirmar lo sugerido por los análisis de estanques (descrito más adelante). Los cuatro casos restantes fueron lecherías en las que hubo una reacción positiva transitoria y de baja magnitud. Este comportamiento podría estar vinculado a la presencia de animales infectados al momento del muestreo que luego abandonaron el predio o que entraron a período seco. Sin embargo, no se puede descartar un proceso de seroconversión del estanque a raíz de la introducción reciente del patógeno. No se dispone de antecedentes sanitarios respecto de estos predios que permitan confirmar o rechazar estas posibilidades.

Tabla 14. Seroprevalencia para Brucelosis (Bru) y Leucosis Enzoótica Bovina (Leu) observada en una muestra de lecherías de la IX Región, en base a análisis ELISA de leche del estanque predial.

Lecherías analizadas	Total por Muestreo			Grupo de Seguimiento		
	187	216	246	149		
Fecha Muestreo	Jun-03	Dic-03	Sep-04	Jun-03	Dic-03	Sep-04
Seropositivas a Bru	6,4%	4,6%	4,9%	6,7%	4,7%	4,7%
Seropositivas a Leu	62,6%	57,4%	56,5%	62,4%	61,1%	59,7%

Geográficamente, las lecherías positivas a Brucelosis a Septiembre de 2005 se localizaron en las comunas de Freire y Vilcún (Figura 23) y en su gran mayoría correspondieron a predios de más de 100 vacas por lechería. Fue posible establecer que el traslado de animales desde un predio positivo localizado en el sur de Vilcún a un predio del mismo propietario en el norte de esta comuna, estuvo asociado a la aparición de un nuevo predio infectado, colindante con el que recibió los animales. En otro caso se estableció que la compra de animales desde un predio infectado fue la causa de la infección recurrente y continuas alzas en la reacción del estanque del predio receptor.

b) Leucosis Enzoótica Bovina (LEB): Se detectaron anticuerpos en 117, 124 y 139 lecherías, correspondiendo a 62.6, 57.4 y 56.5% del total de cada muestreo (Tabla 14). La disminución de la seroprevalencia entre el primer y segundo muestreo (-5.2%) obedeció más a la inclusión de un mayor número de lecherías negativas en el segundo muestreo que a una tendencia neta a la disminución de la seroprevalencia, como ocurrió en el caso de brucelosis. De hecho, en el mismo período la seroprevalencia en el grupo de lecherías de seguimiento experimentó una caída de sólo un 1.3%.

En el grupo de seguimiento hubo 99 lecherías (66.4%) que presentaron anticuerpos a lo menos en uno de los muestreos. En la mayor parte de éstas no se observó una variación de los valores de reacción detectados al inicio del estudio, mientras que en otras se evidenciaron procesos de aumento o disminución del nivel de anticuerpos que pudieran ser consistentes con infección y seroconversión recientes y con la eliminación completa de animales infectados respectivamente. El mayor número de casos hizo difícil la comprobación experimental de estas hipótesis.

La presencia de LEB parecía no estar asociada al tamaño de los predios y su distribución espacial fue relativamente uniforme, a excepción de lo observado en Pitrufquén, comuna en que los centros de acopio de la zona Este presentan un mayor número de casos positivos que los observados en la zona Oeste (Figura 24).

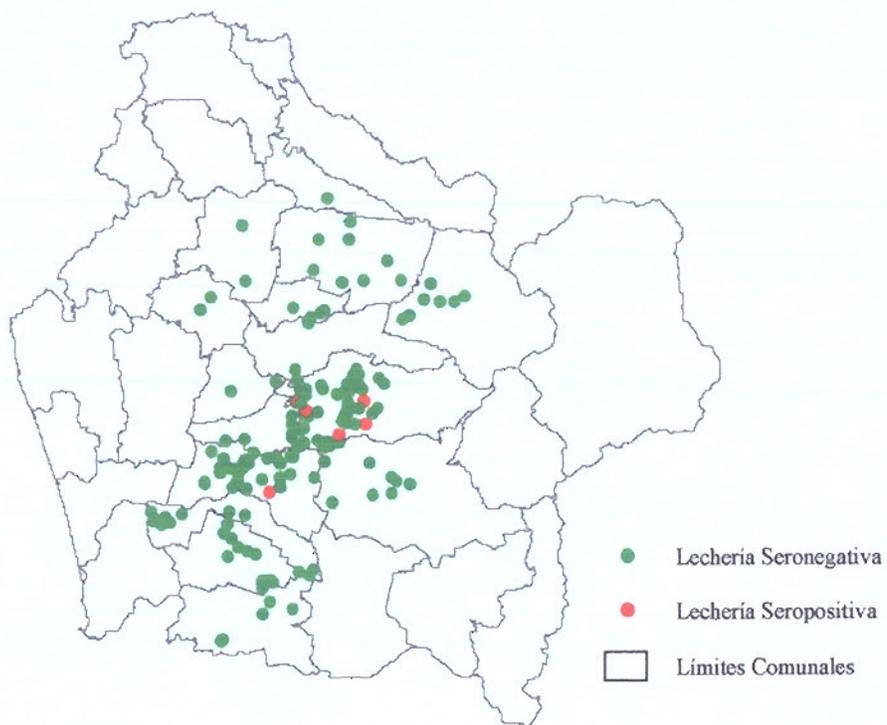


Figura 23. Localización de lecherías seropositivas a Brucelosis. Septiembre de 2004.

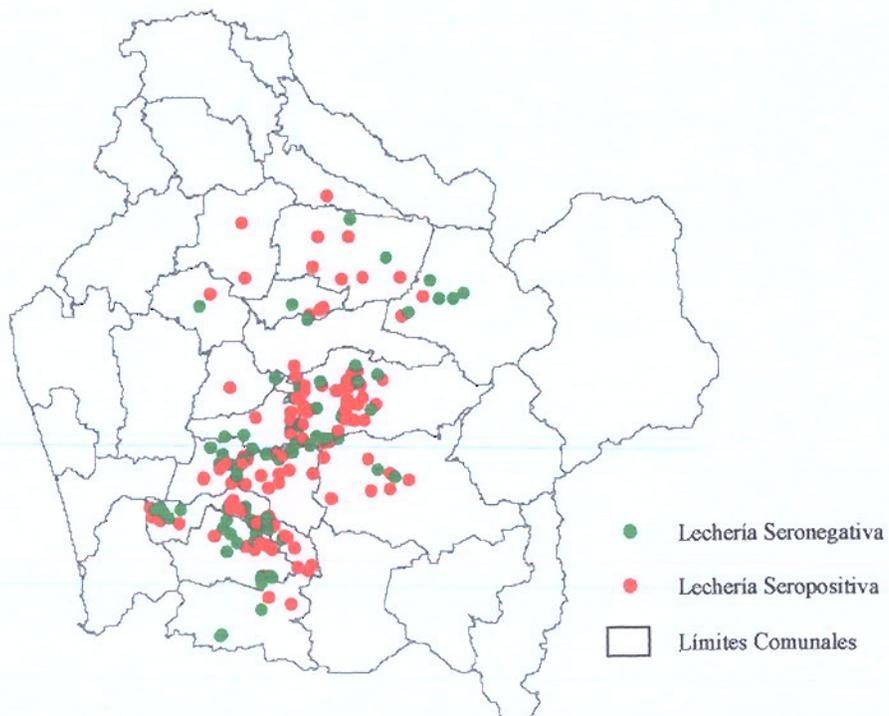


Figura 24. Localización de lecherías seropositivas a Leucosis. Septiembre de 2004.

Aún cuando en la muestra hubo escasas lecherías libres de anticuerpos a los virus de la DVB e IBR, lo importante es conocer la fracción de predios en los que está ocurriendo infección activa. La situación de las lecherías para DVB e IBR se describirá de acuerdo a la clasificación utilizada exitosamente en los países Nórdicos, que las divide en cuatro categorías o clases según la magnitud del valor ELISA del estanque. En base a las características de la transmisión de estas enfermedades se ha determinado que mientras más alto sea el valor ELISA, mayor es también la probabilidad que esté ocurriendo una infección activa o un cuadro agudo (Tabla 15).

Tabla 15. Clasificación de las lecherías de acuerdo al nivel de anticuerpos a DVB e IBR presentes y su asociación a la probabilidad de ocurrencia de infección activa.

Valor ELISA	Clase	Probabilidad de Ocurrencia de Infección Activa
< 0.050	0	Muy Baja
0.051 – 0.250	1	Baja
0.251 – 0.550	2	Media
> 0.551	3	Alta

Fuente : Niskanen et al., 1991.

c) Diarrea Viral Bovina (DVB): A pesar que en promedio el 96.1% de las lecherías presentó anticuerpos contra el virus DVB en los tres muestreos efectuados, sólo 73, 95 y 61 se clasificaron en la clase 3 (39.0, 44.0 y 24.8% del total de cada muestreo) y son sospechosas de presentar infección activa. Las proporciones de lecherías en clase 3 en el grupo de 149 lecherías muestreadas en tres ocasiones varió de 36.2 a 43.6 y a 20.1% (Tabla 16). Estas observaciones sugieren un mayor dinamismo del virus de la diarrea viral comparado con brucelosis y leucosis, consistente con la biología de este patógeno.

Aún cuando no hay datos nacionales comparables, se estima que la proporción de lecherías en clase 3 es alta. De acuerdo a lo planteado por el Prof. Stefan Alenius, esta situación reflejaría la existencia de una presión de infección máxima para esta enfermedad, favorecida por la inexistencia de medidas de control y deficiencias en la aplicación de medidas de bioseguridad de parte de los productores (mal uso de vacunas, compra de animales). Datos equivalentes obtenidos en Perú por el investigador sueco Karl Stahl permitieron establecer sin embargo, que la proporción de lecherías en clase 3 en ése país es superior al reportado en nuestro caso para una muestra de lecherías de la región.

Las comunas de Pitrufquén y Gorbea presentaron mayores proporciones de lecherías clase tres y distintos veterinarios de terreno en estas comunas manifestaron que en el mismo período han observado cuadros clínicos compatibles con la presencia del virus de la diarrea viral (Figura 25). La variación de las proporciones relativas de estanques en cada clase se puede observar en la Figura 27.

Tabla 16. Seroprevalencia para Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR) observada en una muestra de lecherías de la IX Región, en base a análisis ELISA de leche del estanque predial.

Lecherías analizadas	Total por Muestreo			Grupo de Seguimiento		
	187	216	246	149		
Fecha Muestreo	Jun-03	Dic-03	Sep-04	Jun-03	Dic-03	Sep-04
Seropositivas a DVB	98,4%	96,3%	93,5%	98,0%	96,6%	94,6%
Clase 3 DVB	39,0%	44,0%	24,8%	36,2%	43,6%	20,1%
Seropositivas a IBR	78,1%	77,3%	72,4%	76,5%	79,9%	77,2%
Clase 3 IBR	61,5%	54,6%	41,1%	61,1%	56,4%	43,0%

d) Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR): De modo similar a DVB, una alta proporción de la muestra fue positiva a anticuerpos contra el virus de la IBR. Sin embargo, una fracción mayor de estas lecherías fue clasificada en clase 3. Además, mientras que la proporción de lecherías seropositivas se mantuvo relativamente constante, la fracción de aquellas en clase 3 tendió a disminuir durante el período de observación (Tabla 16).

Freire fue la comuna que presentó la proporción más alta de lecherías de clase 3, lo que es consistente con el hecho que en esta comuna predominan los rebaños grandes, en los cuales el control de factores gatillantes como el estrés es más difícil (Figura 27). La variación de las proporciones relativas de estanques en cada clase se puede observar en la Figura 28.

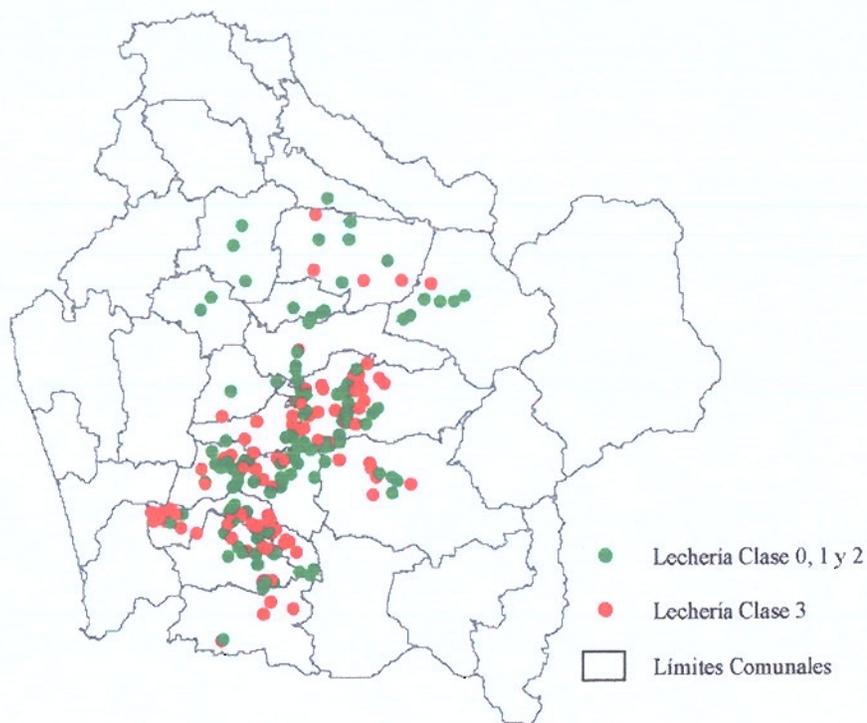


Figura 25. Localización de lecherías Clase 3 para DVB. Septiembre de 2004.

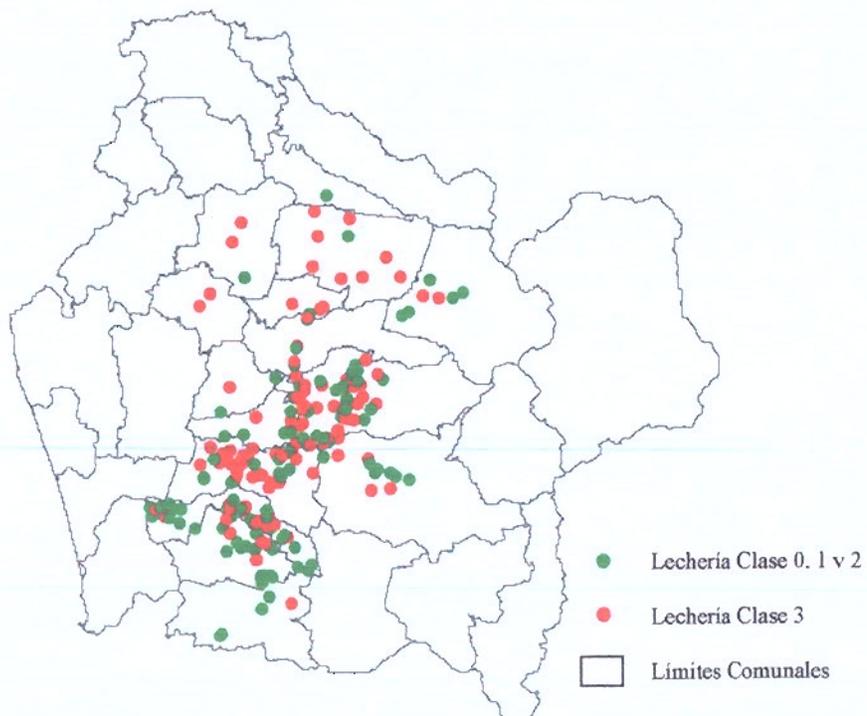


Figura 26. Localización de lecherías Clase 3 para IBR. Septiembre de 2004.

Porcentaje de lecherías

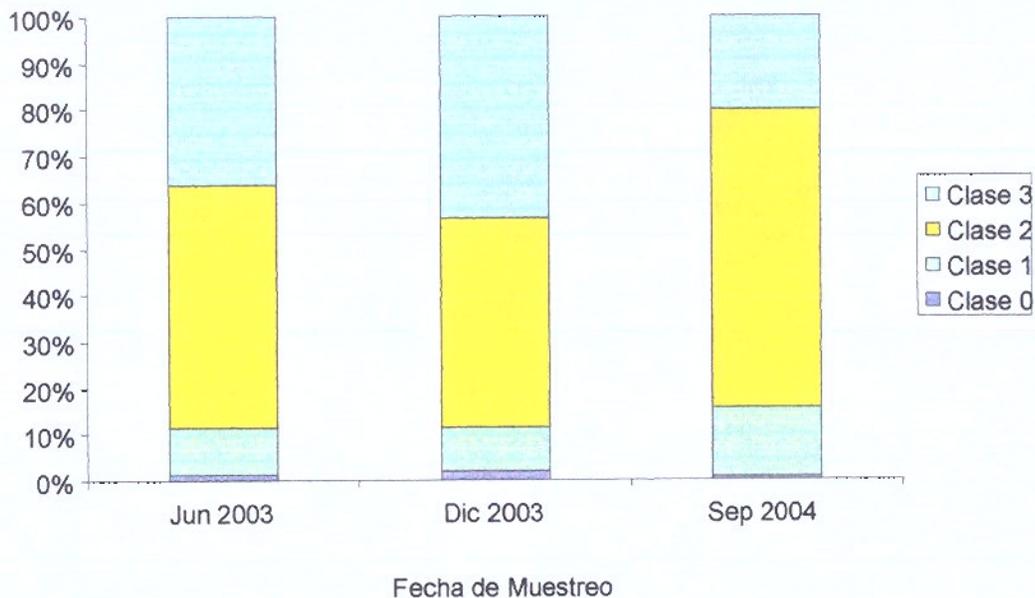


Figura 27. Proporciones relativas de lecherías para DVB según clase. Septiembre de 2004, n=149

Porcentaje de lecherías

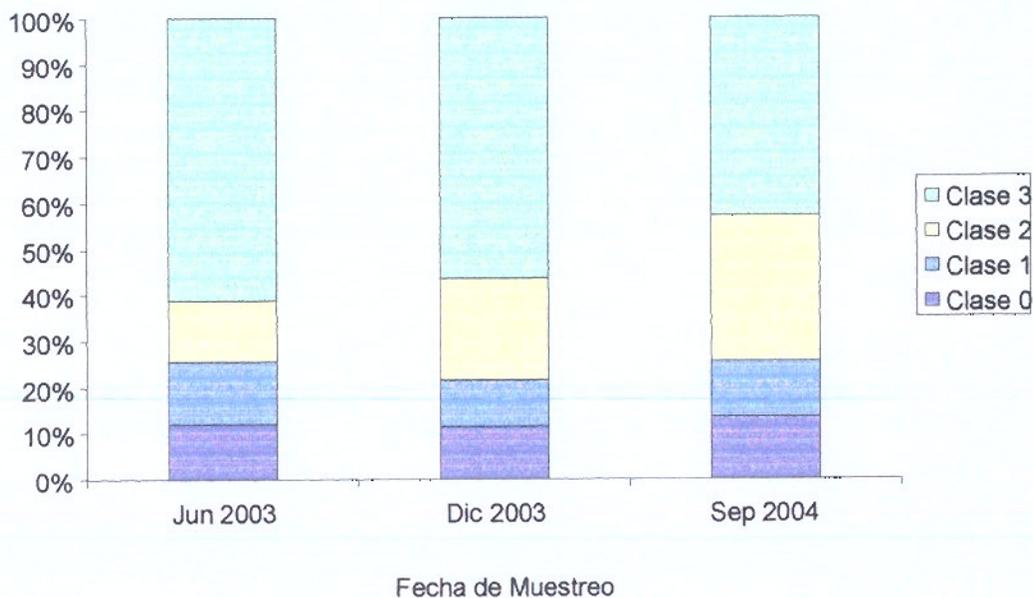


Figura 28. Proporciones relativas de lecherías para IBR según clase. Septiembre de 2004, n=149.

e) Estudio de casos de Brucelosis en predios lecheros de la muestra.

Como se indicó previamente, en ciertos casos fue posible confirmar la situación sanitaria sugerida por el análisis de anticuerpos para Brucelosis en las muestras de estanques prediales.

En un caso (Figura 29), un rebaño presentó un valor ELISA muy alto al comienzo del estudio (Junio de 2003). Este predio no estaba bajo ningún programa oficial de control de brucelosis. Por contar con menos de 50 vacas en ordeña se solicitó al productor permiso para muestrear el estanque y todos los animales del rebaño, incluyendo vacas secas y otros, muestreo que se llevó a cabo en Agosto de 2003. En esta oportunidad el valor del estanque descendió levemente y se encontraron tres animales mediana a fuertemente positivos (Tabla 17). El productor decidió eliminar los tres animales, y el predio completo se volvió a muestrear un mes después. En esta ocasión, el nivel de anticuerpos del estanque fue igual al control negativo, y ningún animal evidenció seroconversión. El estanque se volvió a muestrear en dos oportunidades más, durante los muestreos de rutina (Diciembre de 2003 y Septiembre de 2004) y siguió negativo.

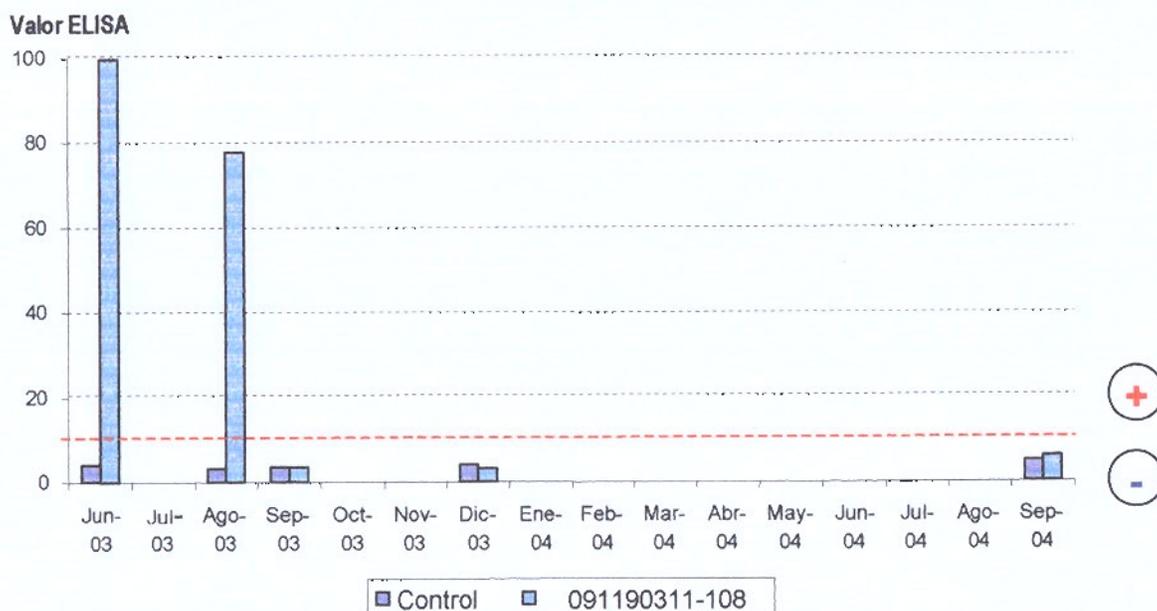


Figura 29. Caso de erradicación de la infección por *Brucella* en un predio lechero de la comuna de Vilcún.

Tabla 17. Resultados parciales del análisis de animales individuales de un predio lechero de la comuna de Vilcún, en Agosto y en Septiembre de 2003.

	08/2003	09/2003
ID	Leche	Leche
032	7,7 -	5,9 -
049	4,0 -	3,9 -
085	4,6 -	3,6 -
100	3,9 -	4,2 -
101	4,4 -	3,3 -
102	3,4 -	2,9 -
104	3,0 -	3,2 -
106	4,0 -	3,5 -
107	3,6 -	3,5 -
109	90,8 +	Vendida
110	2,9 -	2,9 -
114	4,7 -	3,5 -
177	6,5 -	3,5 -
179	2,9 -	2,9 -
181	3,2 -	4,0 -
182	4,4 -	3,3 -
184	5,4 -	3,4 -
186	3,3 -	3,1 -
190	4,4 -	3,0 -
191	4,2 -	3,1 -
193	5,2 -	3,6 -
196	3,3 -	4,0 -
197	91,1 +	Vendida
198	3,4 -	3,5 -
200	3,3 -	3,2 -
Estanque	77,7 +	3,5 -

En un segundo caso (Figura 30), un rebaño de 80 vacas presentó un valor de estanque alto (Junio de 2003). El predio estaba bajo un programa oficial de control de brucelosis. Se muestreó el estanque y todos los animales, incluyendo vacas secas, en Agosto de 2003. El estanque mostró una reducción importante entre ambos muestreos, lo que según datos del productor se explica por la eliminación de animales infectados, detectados en el intervalo por el programa oficial. Aproximadamente el 25% de los animales analizados por nuestro laboratorio fue seropositivo (Tabla 18), con un rango amplio de valores asociados probablemente a diferentes etapas de la infección por *Brucella*. Se sugirió al productor eliminar aquellos animales que presentaban los valores más altos. El rebaño se volvió a muestrear en Noviembre de 2003, y varios animales negativos o con bajo título de anticuerpos mostraron incrementos importantes en éstos, evidenciando que el rebaño presentaba una situación de diseminación activa del patógeno. El estanque se volvió a muestrear en Diciembre de 2003 y Septiembre de 2004, mostrando una tendencia a la disminución gradual del nivel de anticuerpos, producto de la continua eliminación de animales seropositivos.

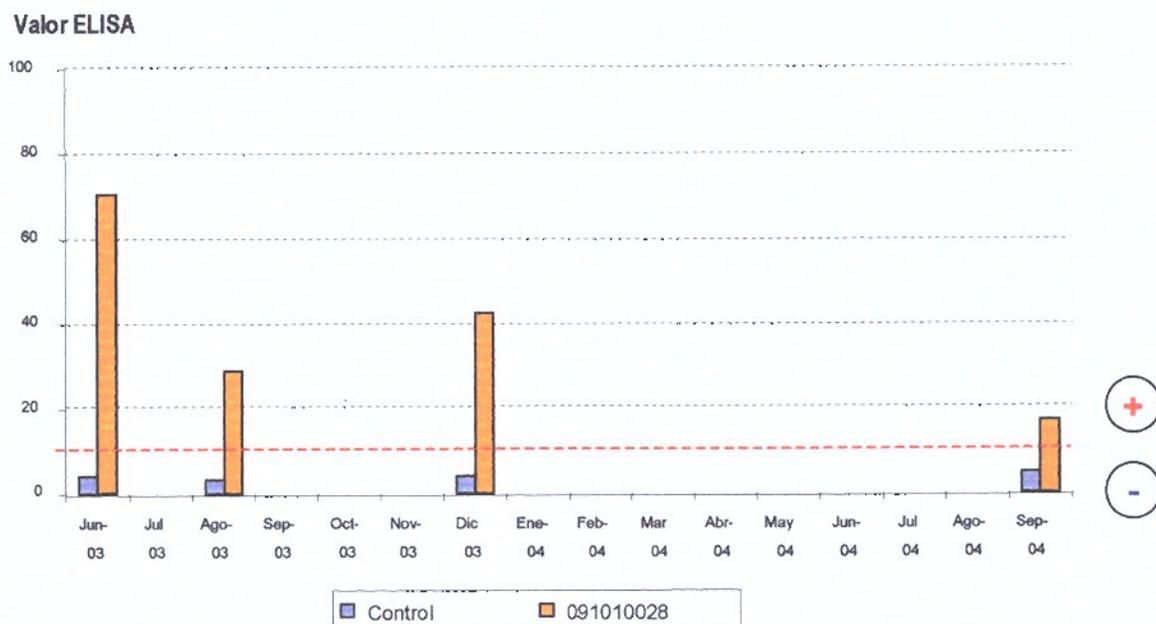


Figura 30. Caso de control de la infección por *Brucella* en un predio lechero de la comuna de Vilcún.

Tabla 18. Resultados parciales del análisis de animales individuales de un predio lechero de la comuna de Vilcún, en Agosto y en Noviembre de 2003.

28-08-03			20-11-03			28-08-03			20-11-03		
ID	Leche		Leche		Suero	ID	Leche		Leche		Suero
236	2,6	-	3,2	-	5,7	1539	5,3	-	3,6	-	8,6
5153	2,6	-	3,4	-	4,2	1633	5,5	-	4,3	-	9,9
272	2,8	-	2,8	-	5,5	305	5,7	-	4,5	-	7,8
1095	2,8	-	3,2	-	5,3	251	5,8	-	4,0	-	5,4
2231	2,9	-	2,7	-	4,5	51	6,4	-	4,6	-	7,4
326	3,1	-	3,3	-	7,6	227	6,9	-	5,8	-	7,6
5174	3,1	-	4,1	-	4,6	5187	7,2	-	8,0	-	11,4
278	3,1	-	4,0	-	5,5	84	7,6	-	16,7	+	7,9
5152	3,1	-	5,5	-	6,6	250	8,2	-	10,3	+	10,8
224	3,2	-	3,0	-	4,2	1595	8,3	-	21,0	+	7,6
5168	3,2	-	3,3	-	4,4	274	8,9	-	10,0	+	20,5
258	3,3	-	4,2	-	4,7	5144	9,1	-	5,6	-	7,5
262	3,3	-	4,4	-	6,9	5178	9,7	-	6,3	-	7,6
5151	3,4	-	13,4	+	4,7	5198	9,8	-	17,3	+	67,0
1470	3,5	-	6,4	-	8,0	5195	10,7	+	4,3	-	4,8
1635	3,5	-	3,4	-	4,8	102	11,3	+	10,3	+	14,7
256	3,5	-	4,0	-	7,6	157	11,5	+	97,3	+	118,1
5110	3,5	-	3,1	-	6,9	1358	12,3	+	6,9	-	9,1
1502	3,6	-	3,4	-	4,9	5074	13,1	+	47,8	+	47,9
283	3,8	-	4,1	-	6,2	5136	13,8	+	63,3	+	84,7
2205	3,8	-	3,3	-	4,8	1496	14,2	+	30,7	+	20,4
5095	3,8	-	4,3	-	14,8	261	17,5	+	7,1	-	17,4
5180	3,8	-	4,9	-	5,7	276	21,1	+	25,0	+	29,5
5190	3,8	-	3,3	-	4,8	1486	22,8	+	63,5	+	54,5
152	3,8	-	3,8	-	5,3	5145	28,6	+	106,2	+	124,0
5156	3,9	-	5,4	-	4,7	5067	40,0	+	25,4	+	57,9
290	4,5	-	5,9	-	5,1	5147	41,5	+	69,0	+	65,9
310	4,7	-	3,6	-	5,9	307	43,0	+	38,4	+	74,5
2264	4,7	-	3,7	-	9,4	122	43,3	+	34,7	+	54,2
280	5,0	-	4,5	-	10,5	1520	44,9	+	13,2	+	17,1
5162	5,2	-	36,7	+	91,1	247	54,8	+	97,3	+	128,3

5.8 ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

5.8.1 ESTUDIOS MOLECULARES

Debido a las ventajas de las técnicas moleculares como el PCR, tal como se describió anteriormente, se montaron los protocolos para la detección molecular de algunos de los patógenos incluidos en el proyecto (Leucosis, DVB y Brucelosis). En algunos casos, (Leucosis) estos estudios correspondieron a los primeros intentos en el país para implementar un sistema de diagnóstico molecular de esta enfermedad y los primeros estudios moleculares relacionados a la tipificación de cepas locales del virus en nuestros rebaños. Esta misma tecnología se aplicó en forma pionera para el análisis de la diversidad genética del virus, a partir del ADN extraído de la fracción de células somáticas de la leche del estanque predial, constituyéndose en un método rápido y conveniente para tipificar el virus en una amplia zona geográfica.

5.8.2 ESTUDIOS MOLECULARES RELACIONADOS AL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB):

El objetivo de esta actividad fue establecer factibilidad de utilizar las muestras de leche de los estanques prediales como fuente de ADN para la detección y tipificación del virus de la leucosis bovina en rebaños lecheros. Como resultado del monitoreo por ELISA realizado a los estanques prediales de la Región se seleccionaron 33 muestras que tenían una reacción fuertemente positiva desde las cuales se extrajo ADN para realizar el PCR. Todas las muestras elegidas dieron una reacción positiva al PCR (Figura 30). El análisis de RFLP realizado por digestión con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Pvu* II y *Bcl* I (Figura 31) permitieron clasificar a las muestras en 2 de los 3 subgrupos conocidos de este virus (Tabla 19). El perfil de restricción correspondiente al subgrupo Belga (Rice et al., 1984) se encontró en 17 muestras analizadas mientras que 16 poseían un perfil de restricción similar al subgrupo Australiano (Coulston et al., 1990). De todas las muestras analizadas hasta la fecha no se han encontrado aún alguna con un perfil de restricción similar al otro subgrupo descrito o Japonés (Sagata et al., 1985).

Tabla 19. Asignación de los aislados chilenos del virus de la Leucosis bovina a los subgrupos conocidos.

País	Muestras	Subgrupo			
		Belga	Australiano	Japonés	Otro
Chile	33	17	16	0	0



Figura 30. Amplificación mediante PCR del ADN viral extraído desde linfocitos de la leche del estanque predial.

Electroforesis en agarosa al 1.5% de productos de PCR de muestras de leche de estanques prediales seronegativas (1-7) y seropositivas (8-12) a una prueba de ELISA indirecto.

St: Estándar 1 Kb (Promega); CN: control negativo; CP: control positivo, fragmento de 444 pb del gen *env* de VLB clonado en el plasmido TOPO-TA vector (Invitrogen).

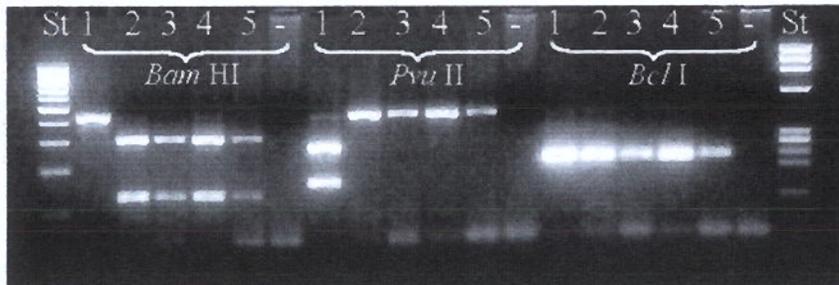


Figura 31. Análisis de restricción en gel de agarosa al 2% de amplicones del virus de la leucosis bovina en muestras representativas de predios de la IX Región.

Líneas 1-5 corresponden a los productos de amplificación por PCR digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Pvu* II y *Bcl* I de 5 diferentes rebaños seropositivos. De acuerdo a los tamaños de fragmentos fue posible asignar los distintos aislados a los diferentes grupos reconocidos en el mundo.

ST: Estándar de tamaño molecular 1 Kb y Phi X-174 Hae III (Gibco BRL), respectivamente. -: Corresponde a una muestra negativa.

En forma adicional, se seleccionaron 10 muestras de animales individuales desde un predio a los que se les realizó PCR. El producto de amplificación de estas muestras se sometió a digestión con un mayor número de enzimas de restricción, para aumentar el poder resolutivo de la técnica. En la Figura 32 se aprecia los perfiles de restricción para 6 muestras (1-6) digeridas con las enzimas *Ava* I, *Bam* H I, *Pvu* II, *Psy* I, *Taq* I, *Acc* I, *Bcl* I, *Bgl* I y *Cvi* II. No se encontraron diferencias en los perfiles de restricción de las muestras analizadas cuando se comparó con las enzimas *Psy* I, *Taq* I, *Acc* I, *Bcl* I, *Bgl* I y *Cvi* II ya que los fragmentos que genera cada una de estas enzimas es similar para todas las muestras analizadas. Sin embargo, el análisis con las enzimas *Ava* I, *Bam* H I y *Pvu* II permitió identificar claramente al menos 2 variantes genéticas de este virus por cuanto el perfil de restricción de las muestras 1 y 2 es diferente al de las muestras 3, 4 y 5 los cuales son similares entre sí. Este análisis permite concluir la presencia de más de una cepa de este virus en el predio analizado. Esta situación se explicaría por una re-infección del predio con otra cepa del virus lo que refleja la importancia de las medidas de bioseguridad que deben ser implementadas en un predio para evitar la infección con un virus en particular.

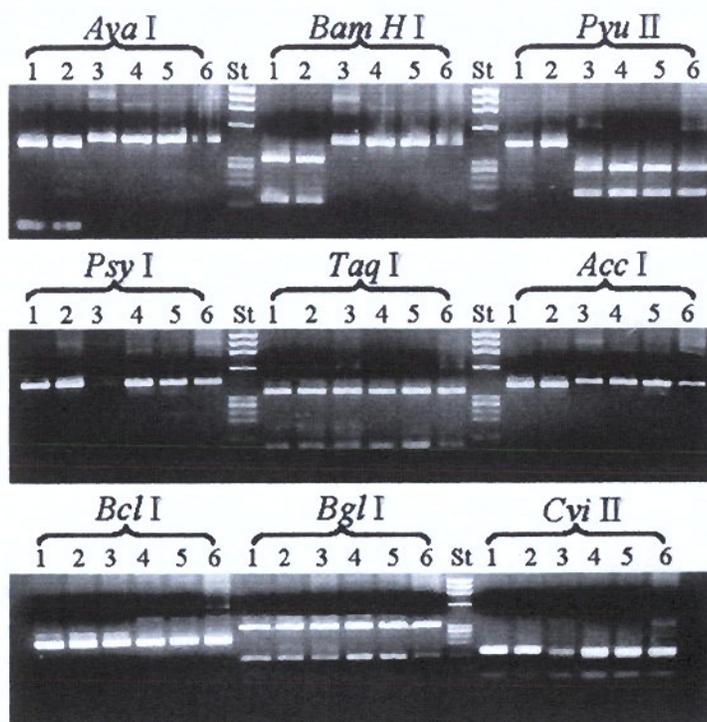


Figura 32. Análisis RFLP de muestras de ADN viral amplificadas desde leucocitos sanguíneos de animales individuales.

Electroforesis en agarosa al 3% de los productos de amplificación de 6 diferentes muestras de animales individuales (1-6) digeridas con las enzimas de restricción *Ava* I, *Bam* H I, *Pvu* II, *Psy* I, *Taq* I, *Acc* I, *Bcl* I, *Bgl* I y *Cvi* II, como se muestra en la Figura. St: Standard 1 Kb Promega.

De las muestras amplificadas de los estanques prediales de la Región, se secuenciaron 8 fragmentos de 444 pb, correspondientes a la región *env* del virus de la leucosis bovina (Figura 33). Las secuencias obtenidas fueron ingresadas en GenBank (Tabla 20). El análisis filogenético realizado a los 8 clones chilenos con 59 secuencias de VLB publicadas en GenBank permitió confirmar la agrupación original de las muestras a los subgrupos Australiano y Belga (Figura 34). De forma interesante, los clones chilenos se agruparon en forma independiente dentro de cada subgrupo lo que indicaría un cierto grado de divergencia genética con los otros aislados comparados en este estudio. En efecto, los 5 clones chilenos analizados que pertenecen al subgrupo Belga, poseen algunas diferencias nucleotídicas muy conservadas y que serían únicas por cuanto ninguna de las otras secuencias analizadas poseen estas mutaciones (Figura 35), incluidas dos aislados de Brasil y uno de Argentina que por las cercanías y el comercio entre los países se podría haber esperado un mayor grado de similitud genética con nuestros aislados. Estas cambios nucleotídicos o mutaciones tuvieron lugar en la posición 70 del fragmento de 444 pares de bases, donde el par de nucleótidos TG fue reemplazado por CA y en la posición 174 donde el nucleótido A fue reemplazado por G. Estos cambios afectaron la secuencia aminoacídica deducida, reemplazando los residuos conservados valina y glutamina por una metionina y arginina, respectivamente (Figura 36). Los cambios encontrados podrían tener importantes efectos en la infectividad y capacidad de virulencia del virus, situaciones que deberían analizarse en más detalle en el futuro. Sin embargo, en lo inmediato estos cambios podrían ser utilizados para diseñar una prueba de diagnóstico de las cepas locales del virus basado en RFLP para de esta forma monitorear eventuales introducciones de este virus desde otros países.

```

1  CACAA RGGCG GCGCC GGTTC GGAGC CAGGG CCATG GTCAC ATATG ATTGC
51  GAGCC CCGAT GCCCT TATGT GGGGG CAGAT CGCTT CGACT GCCCC CACTG
101 GGACA ATGCC TCCCA GGCCG ATCAA GGATC CTTTT ATGTC AATCA CCAGA
151 TTTTA TTCCT GCATC TCAAA CAATG TCATG GAATT TTCAC TCTGA CCTGG
201 GAAAT ATGGG GATAT GACCC CCTGA TCACC TTTC TTTAC ATAAA ATCCC
251 TGATC CCCCT CAACC CGACT TCCCT CAGTT GAACA GTGAC TGGGT TCCCT
301 CTGTC AGATC ATGGG CCCTG CTTTT AAATC AAACG GCACG GGCCT TCCCA
351 GACTG TGCTA TATGT TGGGA ACCTT CCCCT CCCTG GGCTC CCGAG ATATT
401 AGTAT ACAAC AAAAC CATYT CCAGC TCTGG ACCCG GCCTC GC

```

Figura 33. Secuencia nucleotídica (444 pb) del gen *env* de un aislado del virus de la leucosis bovina obtenido de un predio de la IX Región.

Tabla 20. Secuencias nucleotídicas ingresadas a GenBank.

Código de Identificación de laboratorio	Número de Acceso de GenBank
RF96	AY515273
RF14	AY515274
RF145	AY515275
RF176	AY515276
RF27	AY515277
RF58	AY515278
RF8	AY515279
RF1	AY515280

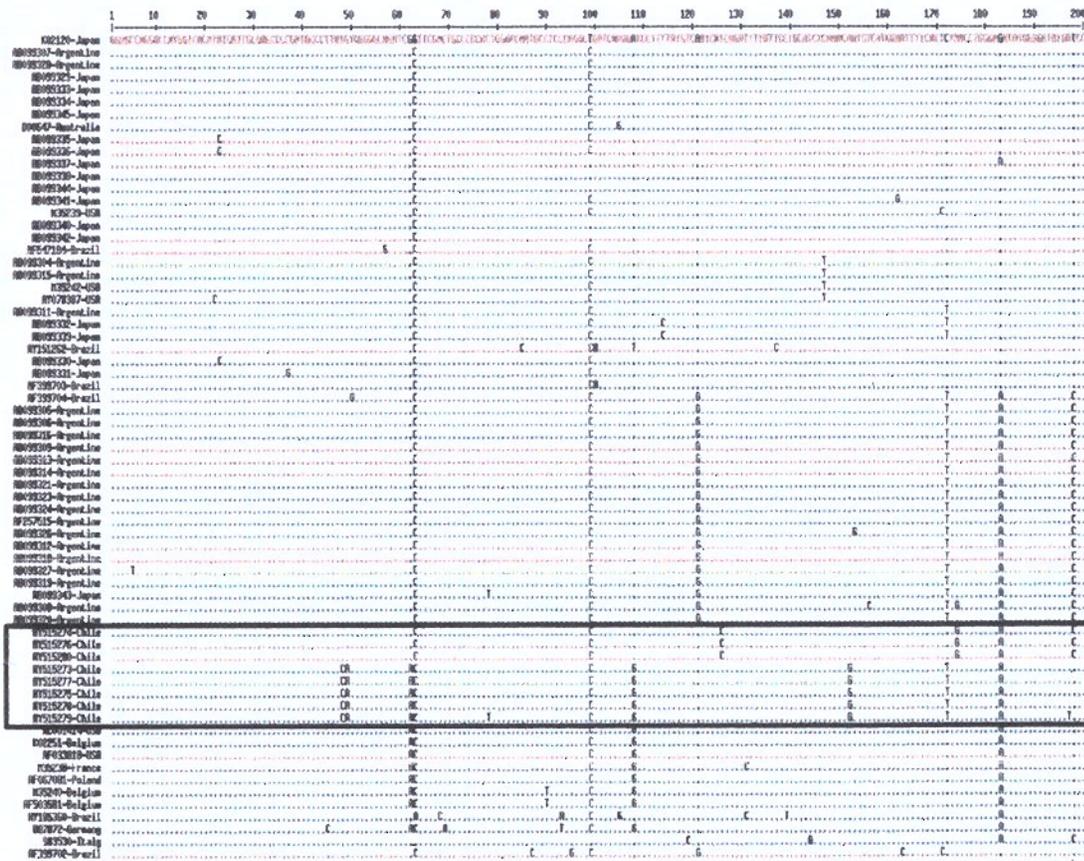
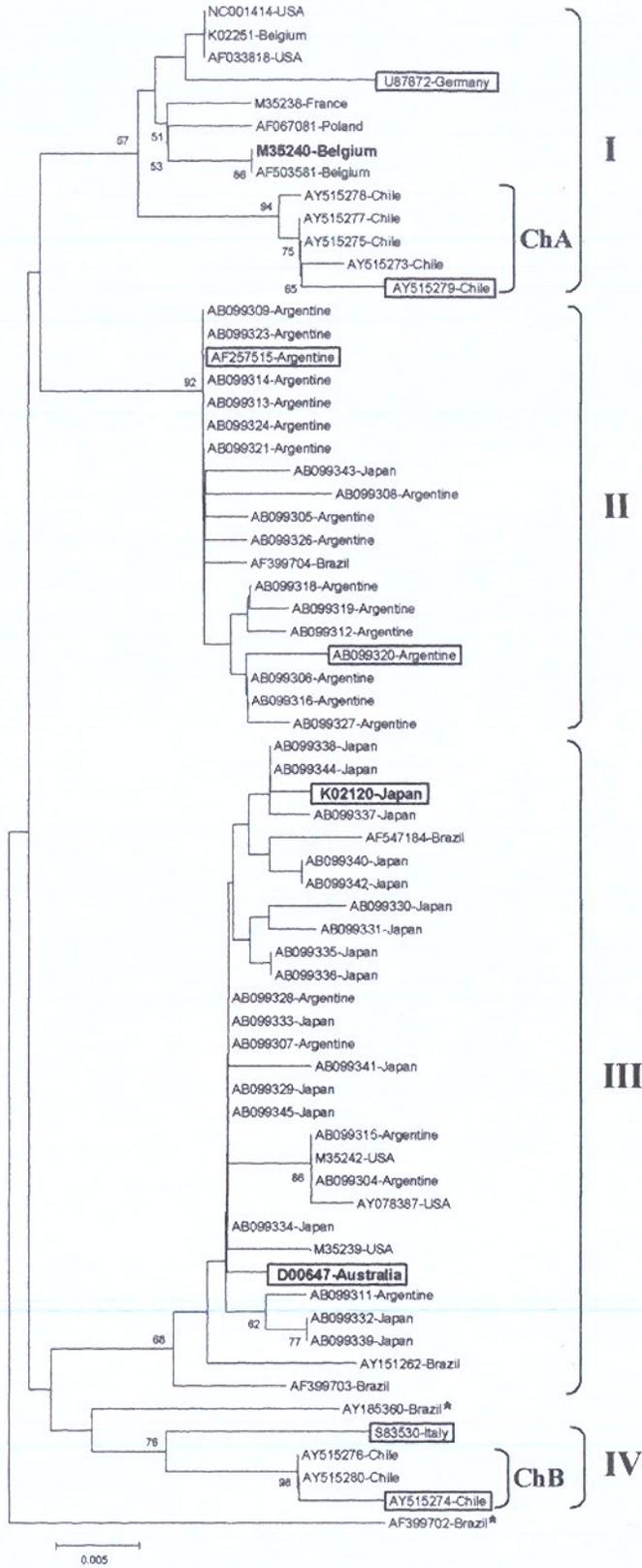


Figura 34. Alineamiento de 67 secuencias de VLB correspondientes a un fragmento de 444 pb del gen *env* viral. La zona demarcada corresponde a las secuencias chilenas incluidas en este estudio. Sólo 200 de los 444 pb se muestran en la figura.



5.8.3 ESTUDIO MOLECULAR DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA.

Se implementó una metodología que permite detectar el RNA del virus DVB en muestras de leche, sangre, plasma o suero de bovinos (Figura 37). Esto complementará el enfoque propuesto para vigilancia del estanque predial sobre la base de análisis ELISA, porque permite detectar directamente la presencia de infección activa en animales muy jóvenes y diferenciar predios con infección activa de aquellos con infección pasada reciente. Con este enfoque fue posible identificar animales con infección activa en diferentes rebaños del estudio y, en concordancia con información ELISA y epidemiológica, calificarlos correctamente como predios con infección activa. Además, se utilizó esta tecnología para identificar en un “Spot test” la eventual presencia de animales persistentemente infectados en la muestra. De los 30 predios muestreados (10 animales en los grupos etarios de 6 y 12 meses de edad y en el grupo de vaquillas de primer parto), se encontraron al menos 13 predios con infección activa (Tabla 21). En los predios con un bajo nivel de anticuerpos en el estanque predial (Clase 0-1) prácticamente no se encontraron anticuerpos en los animales muestreados, mientras que en los predios con niveles de anticuerpos medianos a altos (Clases 2-3) la exposición al virus de los animales jóvenes ocurrió durante las dos últimas temporadas de nacimientos. Del análisis se puede concluir la ausencia de infección activa en por lo menos 16 de los 30 predios analizados. Estos predios corresponden en su mayoría a los predios con menores títulos de anticuerpos, es decir en las Clases 0 a 1. De las misma forma, la mayor probabilidad de infección activa se encontró en los predios cuyos estanques prediales estaban clasificados en los niveles 2 y 3, de los cuales al menos 12 indican la presencia de infección activa, mientras que en 2 casos no se obtuvo un resultado concluyente debido al bajo número de animales analizados en estos predios (<10). Es pertinente mencionar el caso de un predio Clase 0 donde 4 de 9 animales analizados presentaron títulos altos de anticuerpos, indicativo de infección activa. Esta situación se podría explicar por la introducción de un ternero PI en el predio como resultado, por ejemplo, de la compra de una vaquilla preñada (gestante de un PI) en feria u otro predio. En un caso anterior, nuestro laboratorio demostró que precisamente este mecanismo fue el responsable de la introducción de un animal PI en un rebaño de carne de la Región. La compra de reemplazos en feria o a vecinos aún es práctica común entre productores de la zona (incluso entre quienes afirman tener un predio cerrado) y nuestros resultados ilustran el riesgo de introducción de DVB u otra enfermedad a causa de esta. Esto resalta la importancia de las medidas de bioseguridad como las impulsadas por el programa PABCO (Planteles Bajo Control Oficial) del SAG, que impone el establecimiento de predios cerrados.

Como conclusión se puede mencionar que la importancia de este experimento radica en la asociación entre la clase de estanque determinada por el análisis serológico del estanque y la probabilidad que el rebaño haya estado recientemente expuesto al virus, a juzgar por la serología a una muestra del stock más joven del predio. En los predios en que el Spot Test no evidenció infección activa, es muy fácil mantener esta situación cumpliendo algunas medidas mínimas de seguridad como mantener los predios cerrados, no comprar animales en feria, evitar el contacto de los animales con animales de otro predio, etc. En aquellos predios con infección activa, es posible que se produzca un “self clearing” esto es que el virus se auto elimine del predio sin necesidad de emplear vacunas, ya que los animales PI no viven mucho tiempo. Sin embargo, es en estos casos donde se deben extremar las medidas para evitar el contacto de estos animales con vacas o vaquillas en servicio, ya que se corre el riesgo de provocar la gestación de un nuevo animal PI para la temporada siguiente.

siguiente.

Dentro de las muestras negativas en el Spot Test (196), se realizó un RT-PCR a 26 pooles de 6 muestras cada una, los que se utilizaron para intentar identificar animales PI en la muestra. El resultado de este análisis no permitió encontrar animales persistentemente infectados (PIs), ya que todos los pooles analizados fueron negativos (Figura no mostrada). A pesar de que varios predios presentarían infección activa, de acuerdo al nivel de anticuerpos de los animales nacidos en la última temporada, es posible que el (los) animal (es) causante de la infección haya muerto antes de la fecha en que se realizó el muestreo, ya que estos animales no vivirían mucho tiempo (Comunicación personal Stefan Alenius) o que simplemente no fueron incluidos en el grupo de animales muestreados en este estudio.

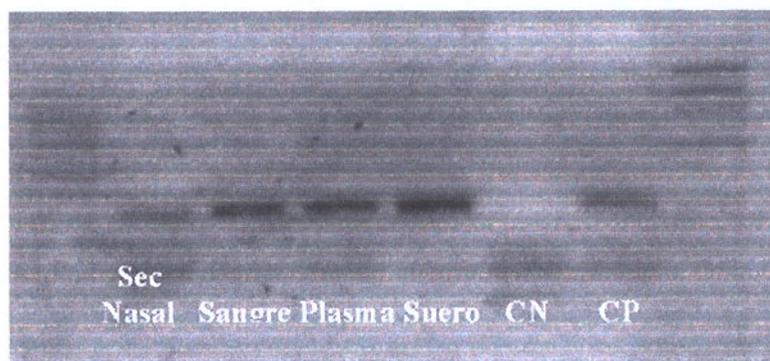


Figura 37. Detección del RNA del virus BVDV mediante RT-PCR en muestras de secreción nasal, sangre, plasma y suero de un ternero persistentemente infectado.
CN: Control Negativo; CP: Control Positivo.

Tabla 21. Listado de predios y evaluación de riesgo de infección de acuerdo al resultado del Spot test.

Predio	Propietario	COD estanque	Nº Muestras	Fecha Muestreo	Riesgo de infección activa
Parcela 45	Fredy Osses	0	10	05/04/04	Libre de infección
Santa Lucía	Rose Marie Scherer	0	10	12/05/04	Infección activa
La Granja Lumahue	Werner Luchsinger	0	10	13/05/04	Libre de infección
Alto mahuida	Carlos Ramirez	0	9	01/06/04	Infección activa
La Cascada	Victor H Navarrete	1	12	07/04/04	< 9 meses libre > 9 meses no
Calatayud	Carmen Saenz	1	10	26/05/04	Libre de infección
Santa Laura	German Hofstetter	1	10	31/05/04	Libre de infección

En forma complementaria, se realizó un estudio de colaboración internacional con el propósito de examinar la diversidad genética del virus de la Diarrea viral bovina en Sudamérica. Este trabajo involucró la participación de países como Chile, Bolivia, Perú y Suecia y la idea fue recabar información genética del virus y compararla con la información generada en Suecia. Para esto, se secuenciaron 10 aislados del VDVB (**Figura 38**), cuyas secuencias nucleotídicas fueron enviadas al Laboratorio de Epidemiología de la Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia, quienes están actualmente realizando el análisis filogenético y cuyos resultados también se espera publicar, en un futuro cercano, en alguna revista científica internacional. Sin duda esta información, contribuirá a un mayor conocimiento de la epidemiología de este virus, conocimientos que tendrán importantes implicaciones para el control y diagnóstico de la enfermedad.

```
1   TCAAC TCCAT GTGCC ATGTA CAGCA GAGAT TTTTA GTAGC AATAC AGTGG GCCTC
56  TGCAG CACCC TATCA GGCTG TATTC TTAAC GGTTA GTTAG ACCGC TTTTG CCTGA
111 GCGAC CCCTG CTCAG GTTAA GATGT GCTGT GGGCA TGCTC GTCCA CGTGG CATCT
166 CGAGG CTTGT CATAc TAAGC GTCGA ACCAC TGACG ACTAC CCTGT ACTCA GGGCT
221 TCAGC CATCC AACGA ACCCA CCACT GTTGC TACCC TCCTT GTTTG CTAGT CCTAC
276 TAAGG GCATA
```

Figura 38. Secuencia nucleotídica (285 pb) del virus de la Diarrea viral bovina (DVB) obtenida de aislados de predios de la IX y X Región.

5.8.4 ESTUDIOS MOLECULARES DE BRUCELOSIS

Se implementó un método de diagnóstico molecular de *Brucella abortus* basado en PCR, el cual permite además diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo. Aunque existen diversos métodos de diagnóstico para esta enfermedad, la capacidad de diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo ha recibido menos atención. Esto último es de particular importancia en aquellos países en los que se sospecha de la utilización de la vacuna cepa 19, incluido Chile donde se encuentra prohibida desde hace muchos años. De la misma forma, RB51 es la vacuna oficial en nuestro país pero no en todos los países del mundo, por lo cual esta herramienta diagnóstica puede ser de utilidad en aquellos países que tienen prohibida su venta (Adone et al., 2001).

El método escogido basa la discriminación de las cepas en la detección mediante PCR de tres regiones genómicas específicas: el elemento de inserción IS711 típico de *B. abortus*, una duplicación de este mismo elemento que es característica de *B. abortus* cepa RB51 y del gen *eri*, característico del género *Brucella* y ausente en *B. abortus* cepa 19.

En la Figura 39 se muestra la separación electroforética de los productos de amplificación ensayados. En los carriles 2 al 6 se ensayó sólo la amplificación de la secuencia IS711 (498 pb) en un panel de muestras correspondientes a ADN purificado a partir de bacterias aisladas (cepa de campo, vacuna RB51 y vacuna Cepa19) y de células somáticas de dos muestras de leche provenientes de animales infectados. Todas las muestras fueron positivas al ensayo. En los carriles 7 al 11 se ensayó sólo la amplificación de un fragmento del gen *eri* (178 pb) en el mismo panel de muestras ya descrito. Como era de esperar, en este caso sólo la muestra correspondiente a la cepa vacunal Cepa19 fue negativa a la prueba. En los carriles 12 al 16 se ensayó la amplificación "múltiple" de estas dos secuencias, incluyendo además un partidor extra que permite la detección del elemento IS711, duplicado sólo en la cepa vacunal RB51 (364 pb). En este caso se obtuvieron todos los productos esperados, lo que permitió diferenciar efectiva y rápidamente a las cuatro clases de cepas del panel de ensayo.

Posteriormente se evaluó la capacidad del método PCR para detectar *B. abortus* cepa de campo a partir de muestras de leche, para lo cual se analizaron un total de 48 muestras correspondientes a animales de un predio con infección activa. En el 90% de las muestras analizadas (43), fue posible observar una banda de amplificación confirmando la presencia de *B. abortus*.

En la Figura 40 se observa el resultado del PCR en 13 de las 48 muestras analizadas. En este caso 11 de las 13 muestras amplificaron un producto de 498 pb con los partidores IS711 y Bru (carriles 1 al 13). Sólo las muestras correspondientes a los carriles 3 y 10 arrojaron resultados negativos. Finalmente, el método se evaluó en muestras de tejido de animales de matadero confirmando la factibilidad de utilizar este método en este tipo de muestras (Figura 41). Los resultados obtenidos de este estudio han aportado con un procedimiento rápido para la identificación de *B. abortus* directamente desde muestras de leche, basada en la técnica de PCR. Además, este método permitió diferenciar, a partir de cultivos microbiológicos, *B. abortus* cepa de campo de las 2 cepas vacunales de mayor uso como son RB51 y cepa 19. Finalmente, este método demostró su capacidad para aplicarse en muestras de tejido de animales de matadero (linfonódulo supramamario y abomaso de feto), lo cual abre otras posibilidades de aplicación para esta técnica en distintas muestras de tejido del animal.

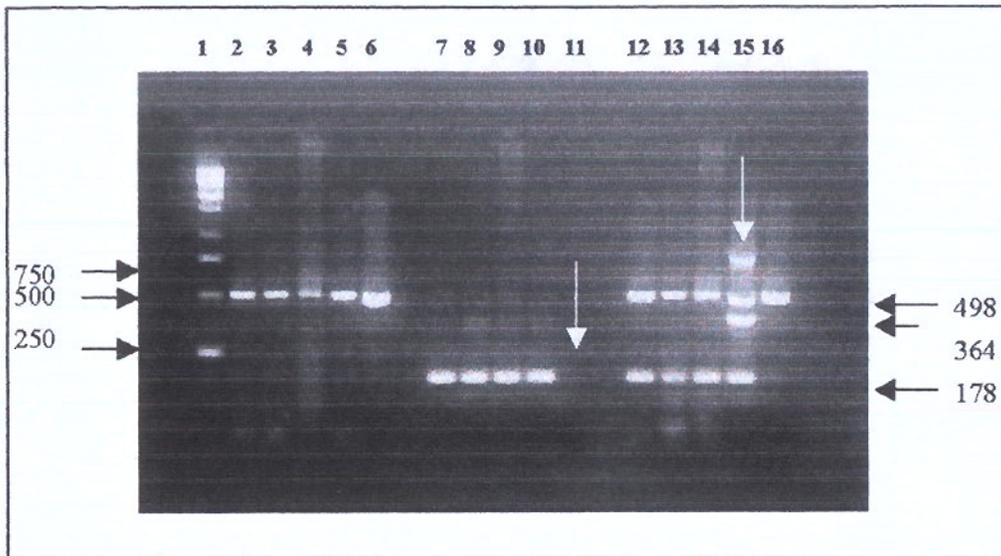


Figura 39. Diferenciación de *B. abortus* cepa de campo, vacuna RB51 y cepa 19 mediante el método AMOS PCR.

Carril 1: estándar 1Kb; carriles 2, 7 y 12: *B. abortus* cepa de campo; carriles 3, 4, 8, 9, 13 y 14: muestras de leche; carriles 5, 10 y 15: vacuna RB51; carriles 6, 11 y 16: cepa 19.

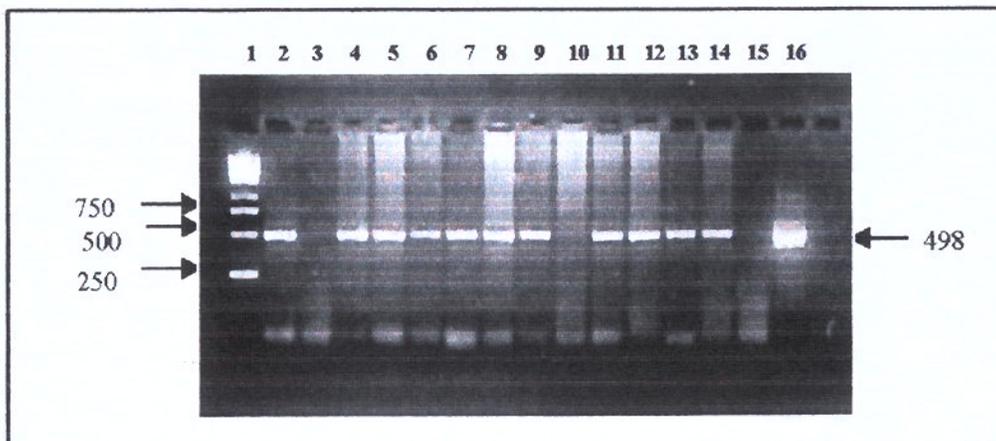


Figura 40. Amplificación por PCR a partir de ADN aislado desde muestras de leche.

Carril 1: estándar 1 Kb; carriles 2 al 14: muestras individuales de leche; carril 15: control negativo (mix sin ADN); carril 16: control positivo (ADN cultivo *B. abortus*). Cada carril contiene 10 uL de 25uL de la mezcla de reacción.

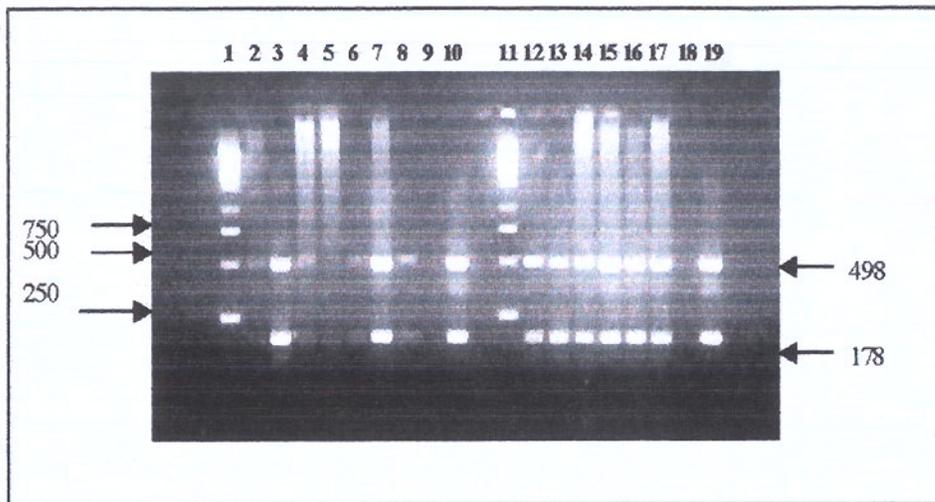


Figura 41. Amplificación por PCR a partir de ADN aislado desde muestras de abomaso del feto y linfonódulos supramamarios.

Carriles 1 y 11: estándar 1 Kb; **carriles 2, 3, 4 y 7:** corteza linfonódulo supramamario; **carril 5:** raspado de epitelio abomasal; **carril 6:** secreción sanguinolenta de linfonódulo supramamario; **carril 8:** líquido abomasal; **carriles 9 y 18:** control negativo; **carril 10 y 19:** control positivo, cepa de campo; **carriles 12 al 17:** médula de linfonódulos supramamarios.

6. FICHAS TÉCNICAS Y ANÁLISIS ECONÓMICO DEL CULTIVO, RUBRO, ESPECIE ANIMAL O TECNOLOGÍA QUE SE DESARROLLÓ EN EL PROYECTO, JUNTO CON UN ANÁLISIS DE LAS PERSPECTIVAS DEL RUBRO DESPUÉS DE FINALIZADO EL PROYECTO.

6.1 FICHAS TÉCNICAS SERVICIOS GENERADOS

Las tecnologías y know how adquiridos en el desarrollo del proyecto permiten la creación de tres nuevas clases de servicio genéricos asociados al mejoramiento de la sanidad de bovinos lecheros a saber: monitoreo serológico sistemático de rebaños lecheros, diagnóstico serológico de enfermedades bovinas y asesoría para el control de enfermedades bovinas. A continuación se describen las características generales más relevantes de cada clase de servicio.

a) Monitoreo de Enfermedades Infecciosas Bovinas en Rebaños Lecheros.

Definición: Análisis del contenido de anticuerpos anti-patógeno específicos presentes en una muestra de leche del estanque predial y su interpretación de acuerdo a variables epidemiológicas (población, movimiento de animales) y a resultados previos (comportamiento del estanque).

Aplicaciones: De acuerdo al objetivo del análisis el resultado permite confirmar, descubrir o descartar que el rebaño esté bajo un proceso infeccioso específico. Debido a la naturaleza semicuantitativa de los resultados es posible seguir la evolución de los niveles de anticuerpos en el estanque, estrechamente asociados a variables epidemiológicas, como una forma indirecta de evaluar el éxito de un programa de control.

Mercado y clientes: Se considera la existencia de un universo de casi 600 rebaños lecheros comerciales en la IX Región, inscritos ante el SAG. De ellos, 317 ya fueron monitoreados con éxito durante el curso del proyecto FIA BID-PI-C-2001-1- P-035. Los clientes son los productores individuales, asociaciones de productores, empresas lecheras, empresas asesoras, médicos veterinarios e instituciones públicas.

Operación: Los clientes reciben indicaciones para la toma de muestras válidas, cancelan el valor del servicio y reciben frascos de muestras. También entregan información para contacto, la correcta identificación del rebaño e información que ayuda a realizar la mejor interpretación posible del análisis. Las muestras son recolectadas por los clientes y enviadas a laboratorio. El ingreso de muestras, su análisis, interpretación e informe de resultados se realizan de acuerdo a prácticas de laboratorio y administrativas que garantizan el cumplimiento de los principios de confiabilidad y oportunidad.

b) Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas Bovinas en Animales Individuales.

Definición: Análisis del contenido de anticuerpos anti-patógeno específicos presentes en una muestra de leche o suero de animales y su interpretación.

Aplicaciones: De acuerdo al objetivo del análisis el resultado permite confirmar, descubrir o descartar que un animal esté bajo un proceso infeccioso específico. Debido a la naturaleza semicuantitativa de los resultados es posible categorizar a los animales en diversos

grados de reacción siendo posible así establecer prioridades para eliminación en el marco de un programa de control privado u oficial.

Mercado y clientes: En principio se considera un universo mínimo de unos 1.400 animales en riesgo de adquirir brucelosis, pertenecientes a 10 rebaños lecheros comerciales positivos a la enfermedad de un total de 317 analizados en la IX Región. Unos 400 animales correspondientes a cuatro rebaños positivos ya fueron analizados con éxito durante el curso del proyecto FIA BID-PI-C-2001-1- P-035, contribuyéndose a la eliminación de la infección en dos de ellos. En el caso de Leucosis se estima que no menos de 11.600 animales existen en a lo menos 124 lecherías positivas a la enfermedad en la IX Región. Esta misma cantidad se puede considerar como piso para IBR. En el caso de DBV, por su distribución y epidemiología, se debe considerar como universo a la población de animales menores de 1 año presentes en las lecherías de la IX Región. Los clientes son productores individuales, médicos veterinarios e instituciones públicas.

Operación: Los clientes reciben indicaciones para la toma de muestras válidas, cancelan el valor del servicio y reciben frascos para muestras de leche. La toma de muestras de suero o sangre es de costo del cliente. El cliente entrega información para contacto, la correcta identificación de los animales e información que ayuda a realizar la mejor interpretación posible del análisis. Las muestras son recolectadas por los clientes y enviadas a laboratorio. El ingreso de muestras, su análisis, interpretación e informe de resultados se realizan de acuerdo a prácticas de laboratorio y administrativas que garantizan el cumplimiento de los principios de confiabilidad y oportunidad.

c) Control de Enfermedades Infecciosas Bovinas en Rebaños Lecheros.

Definición: Estudio, elaboración e implementación de un plan de manejo tendiente a la eliminación de una enfermedad infecciosa específica de un rebaño lechero.

Aplicaciones: El objetivo final es controlar y erradicar una enfermedad infecciosa específica de un rebaño lechero, a fin de cumplir con regulaciones sanitarias o comerciales o mejorar índices reproductivos o productivos del rebaño.

Mercado y clientes: Sólo 14 de los 317 rebaños analizados en el proyecto FIA BID-PI-C-2001-1- P-035 eran negativos a las cuatro enfermedades infecciosas consideradas. De aquí que prácticamente todas las lecherías de la región requieren asistencia para el control y erradicación para a lo menos una enfermedad infecciosa que afecta los índices reproductivos o productivos, o que es sujeto de regulación sanitaria o comercial. Los clientes son productores individuales o asociaciones de productores.

Operación: Los planes de control y erradicación de las distintas enfermedades infecciosas bovinas se elaboran e implementan en base a características epidemiológicas propias de la enfermedad, la existencia de herramientas diagnósticas y preventivas específicas y las condiciones ambientales y económicas bajo las cuales se desarrolla la faena productiva. En el caso de brucelosis, el plan de manejo se elabora e implementa de acuerdo a las normas oficiales especificadas en el Instructivo Técnico N°3 del PEBB/IT3 del SAG. Un marco general similar se aplica en el caso de enfermedades distintas de brucelosis.

6.2 Análisis económico del rubro y tecnologías desarrolladas.

Para determinar el impacto económico que se genera con el proyecto, se mantiene la misma orientación de la estimada en el inicio del proyecto, ya que los resultados contemplados se han logrado dentro de los rangos esperados, contemplando de todas formas la actualización de valores definidos para el productor.

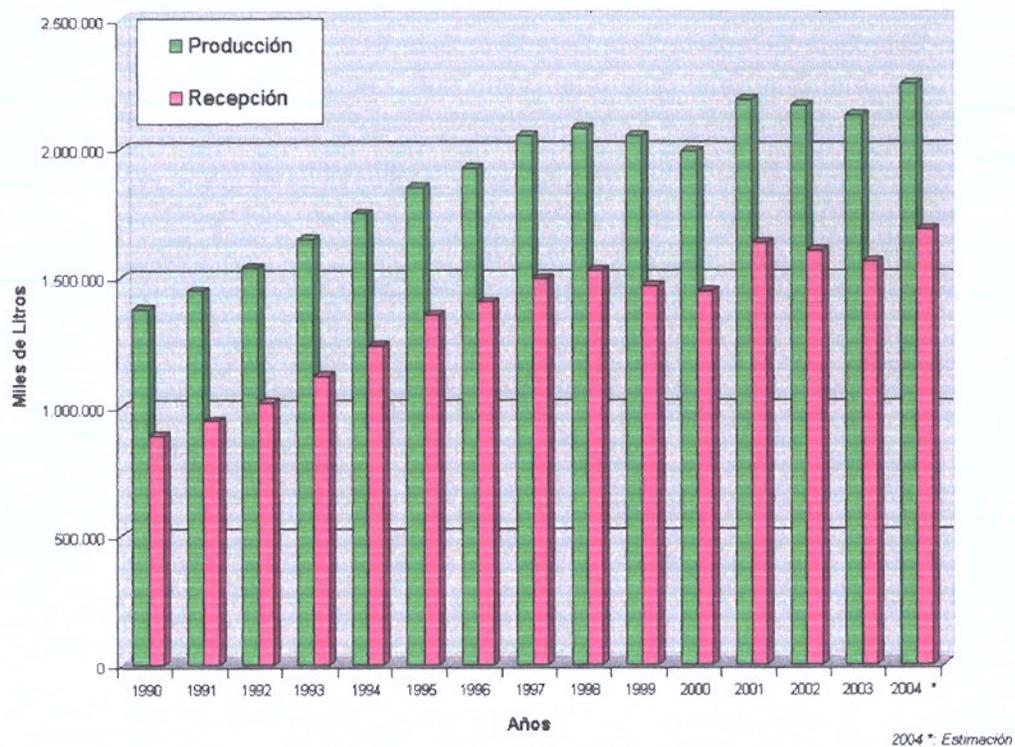
a).- Perspectivas del rubro

Durante los últimos años la producción nacional de leche ha mantenido un aumento constante de la que en promedio un 70% se contempla en recepción de plantas. A pesar de que en los años 1999-2000 y los años 2002-2003 tanto la producción como la recepción de leche en plantas disminuye, a partir del año 2004 esta situación se revirtió en forma positiva y superior a las expectativas. Se puede decir que se ha mantenido un margen entre la producción y la recepción de leche. Ver gráfico N°1. Por otro lado las regiones donde tienen una mayor concentración de recepción de leche en plantas son la X y IX, de acuerdo con el gráfico N°2.

En relación a los precios pagados a los productores los mayores índices se encuentran en la región metropolitana, destacando en todas las regiones los precios han tenido un aumento importante entre el año 2003 y el año 2004 entre un 2% a un 7%, donde el menor aumento se dio en la región de La Araucanía, siendo la región de Los Lagos donde se encuentra un valor pagado más bajo, ver gráfico N°3. En relación al gráfico N°4 podemos apreciar además que los precios se han mantenido dentro de un rango favorable en los últimos años.

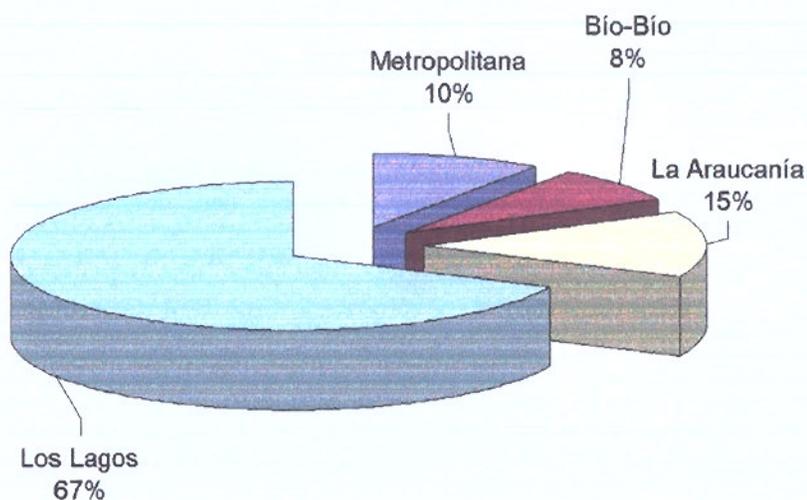
En cuanto al destino que se da a la leche recepcionada en plantas, la mayor parte se destina, a parte de la elaboración de leche fluida, a la elaboración de yogur, leche en polvo, quesos y leche condensada, ver gráficos N°5.a y 5.b. En términos de las exportaciones e importación de productos lácteos, nuestros proveedores de leche en mayor importancia son Argentina y Uruguay, mientras que nuestro principal cliente de exportación es México. En relación a la balanza comercial, el año 2004 presenta un fuerte cambio mostrándose una notable disminución de las importaciones así como un aumento de las exportaciones, esto a su vez se sustenta por la diferencia de la producción de leche, recepción en plantas y elaboración de productos lácteos, estimándose que es posible aún crecer más la balanza en forma positiva, ver gráficos N°6, 7 y 8.

Gráfico N°1: Producción y Recepción Nacional de Leche



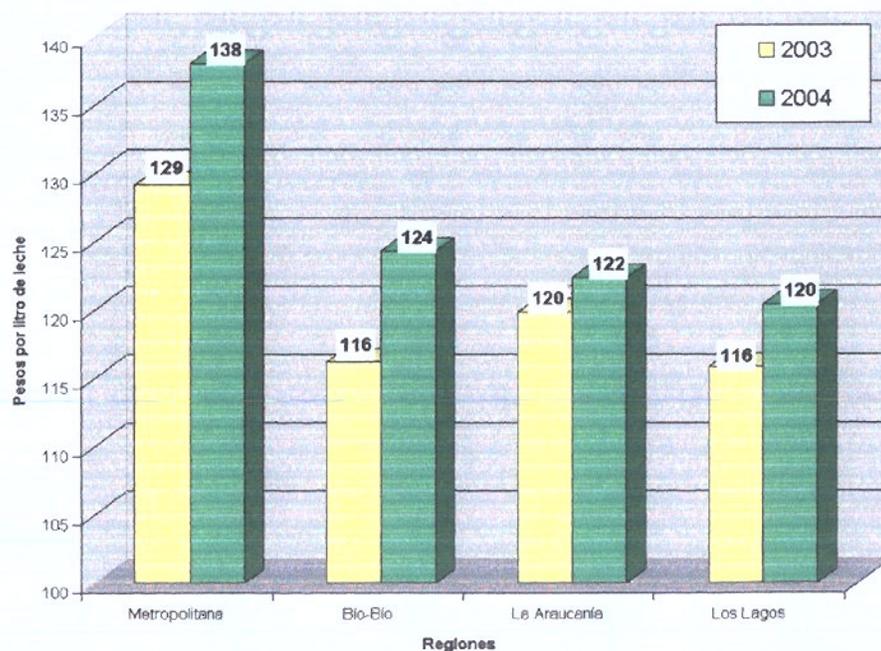
Fuente: Odepa 2005

Gráfico N°2: Recepción de Leche Fluida en plantas por regiones para los años 2003-2004



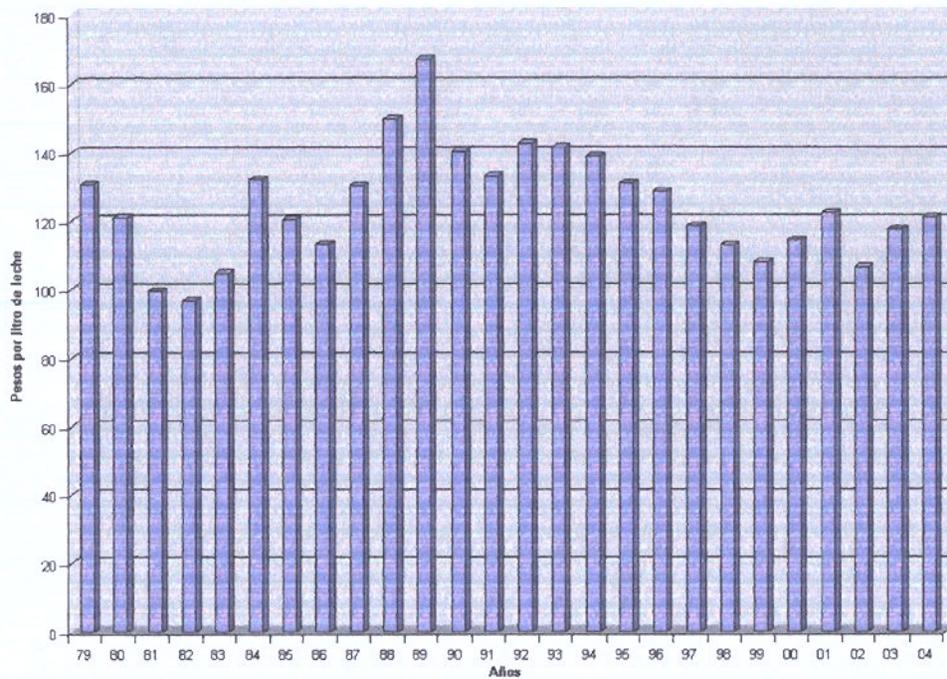
Fuente: Odepa 2005

Gráfico N°3: Precios Promedios Ponderados de leche pagados a productores por región Enero a Noviembre 2003-2004



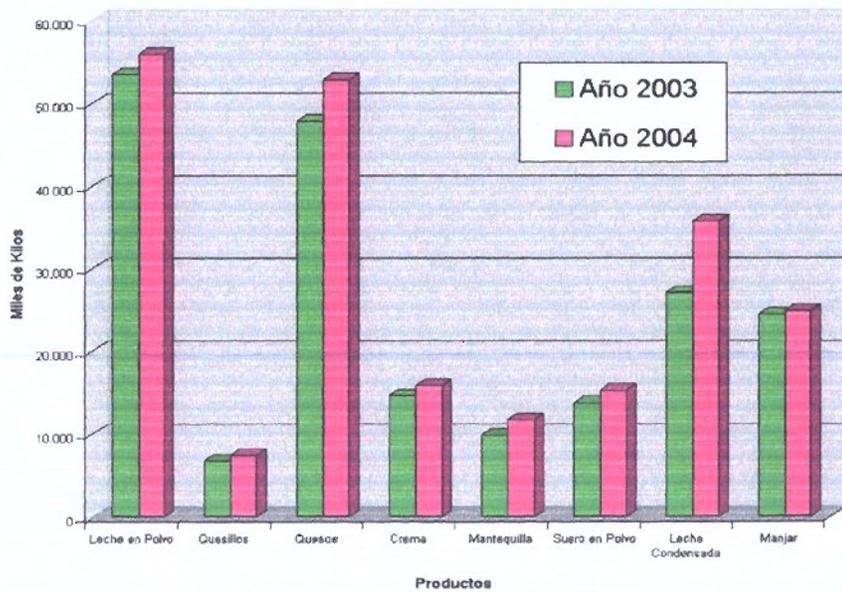
Fuente: Odepa 2005

Gráfico N°4: Precios promedio pagados al productor años 1979-2004



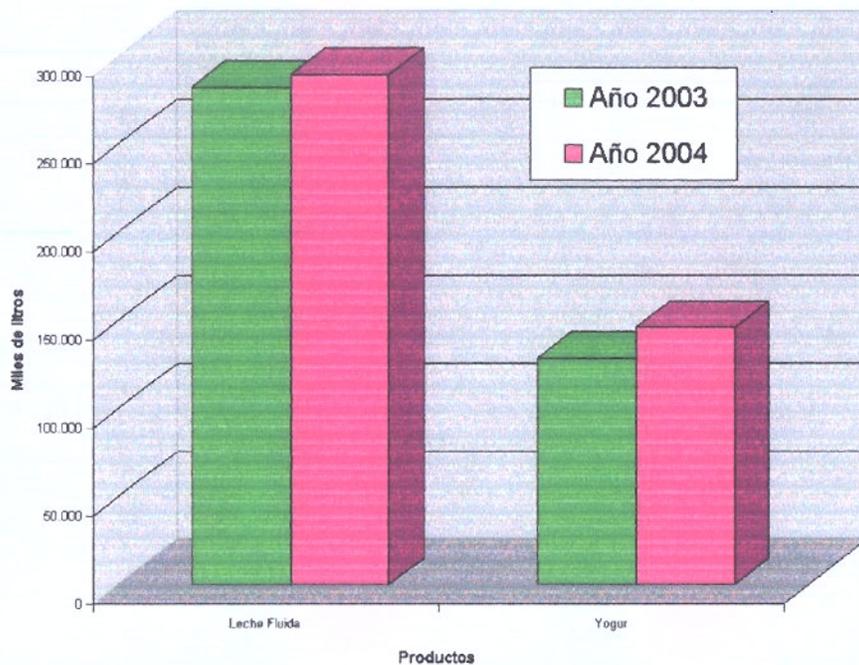
Fuente: Odepa 2005

Gráfico N°5.a: Elaboración de Productos Lácteos en Plantas Lecheras Enero a Noviembre 2003-2004



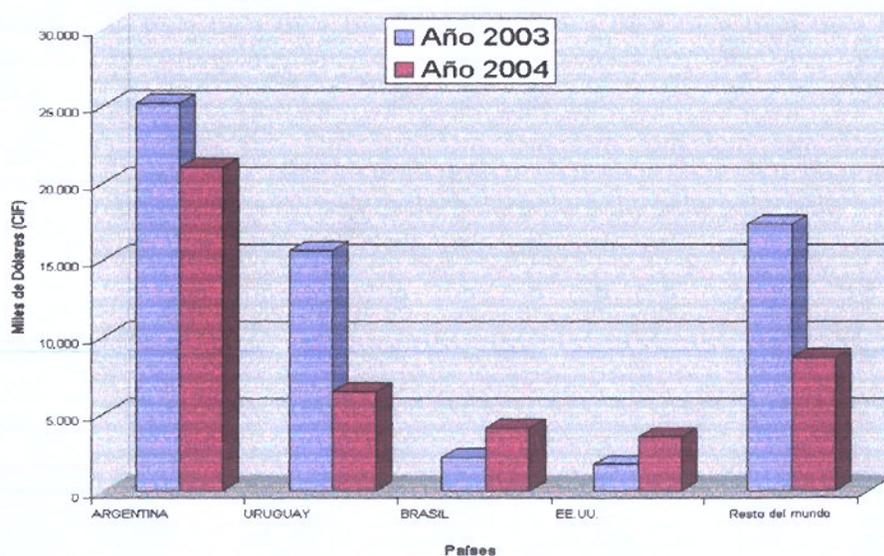
Fuente: Odepa 2005

Gráfico N°5.b: Elaboración de Productos Lácteos en Plantas Lecheras Enero a Noviembre 2003-2004



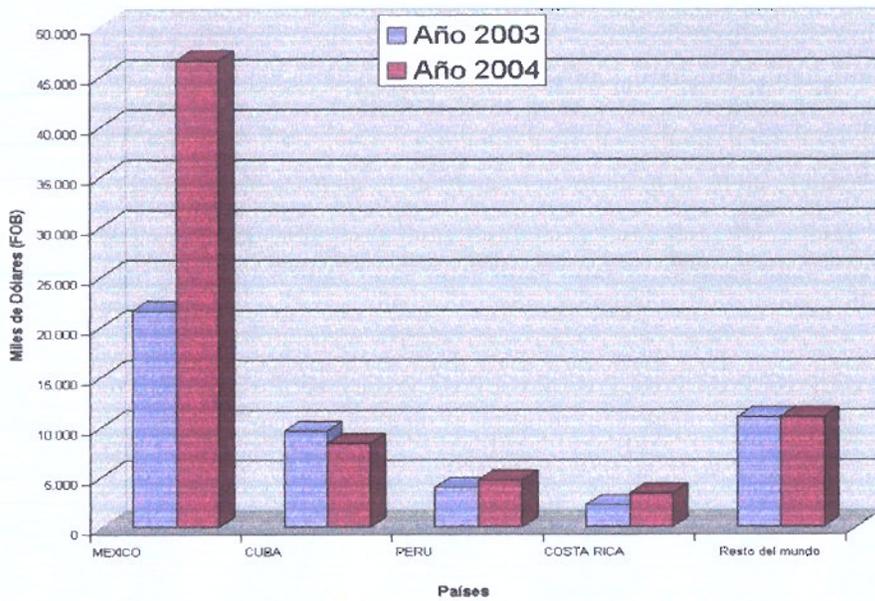
Fuente: Odepa 2005

Gráfico 6: Importaciones de productos lácteos Enero a Noviembre 2003-2004



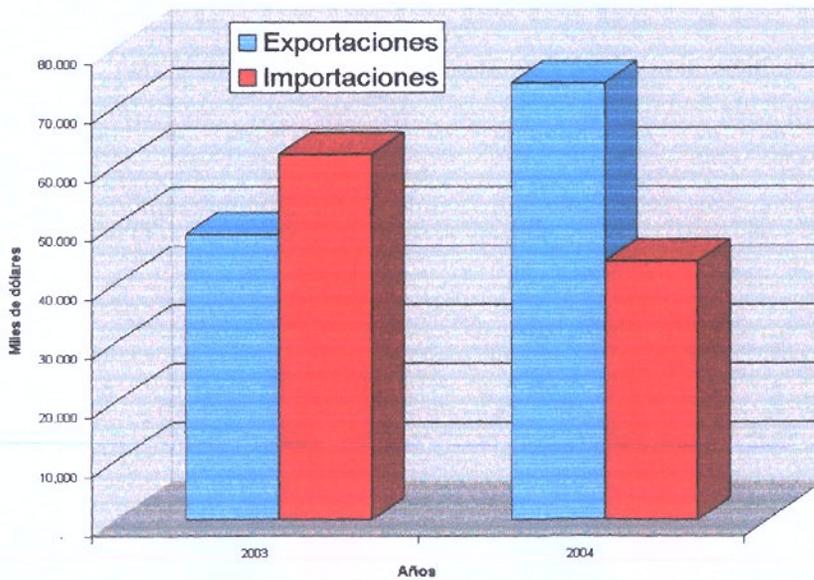
Fuente: Odepa 2005

Gráfico 7: Exportaciones de productos lácteos Enero a Noviembre 2003-2004



Fuente: Odepa 2005

Gráfico N°8: Exportaciones e Importaciones de productos lácteos años 2003-2004



Fuente: Odepa

b).- Consideraciones generales:

Para la evaluación económica, se considero la situación de la masa de vacas en la IX Región, contemplando productores lecheros que comercializan su producción en plantas lecheras y que son potenciales clientes para adquirir la tecnología, la cual se basa en incorporar los análisis de diagnóstico como sistema de vigilancia dentro de los rebaños lecheros.

La evaluación consideró que el costo de los análisis serán de cargo en su totalidad del productor dentro del ítem de Sanidad Animal, por lo cual este ítem varía en aumento, conjuntamente con ello se considera un programa de índole gubernamental de difusión de la nueva tecnología haciendo énfasis en los beneficios del control y erradicación de las enfermedades contempladas.

Por otra parte la entidad tecnológica que desarrolló la tecnología estaría en condiciones de implementar el servicio que entregue la tecnología a los productores.

Los resultados que se obtienen con la tecnología generada para la actividad de producción de leche son:

1. Aumento de la producción de la leche.
2. Aumento de la calidad de la leche.
3. Disminución de abortos.
4. Disminución de lapsos interparto.
5. Aumento de la tasa de reproducción de los rebaños.

c) Evaluación económica privada: Situación Agricultor que usa el servicio tecnológico

Para determinar los valores de ingresos, costos e inversiones por hectárea se establecieron ciertos supuestos que se entregan a continuación:

Cuadro N°1: Supuestos estructura de costo e ingresos			
Item	Variación	Resultado Asociado	Observación
Precio de la leche	3,3%	2	aumento del precio por litro de leche considerando que en la actualidad por predio libres de dos enfermedades (Brucelosis y Tuberculosis) se paga una diferencia de \$2 más por litro de leche, si contemplamos que la situación con proyecto considera el control de 4 enfermedades (contemplando brucelosis) se considera que el litro de leche debería tener un aumento de al menos \$4, lo cual es aproximadamente un 3,3% de aumento con respecto al precio actual. El precio actual se ha considerado de acuerdo con los que esta pagando actualmente en promedio las plantas lecheras de la región (ver gráfico N°3).
Mano de obra	-5,7%	2, 3 y 4	se requieren menos horas de mano de obra para atender a los animales, tratamientos y aislaciones necesarias.
Alimentación	-5,7%	2, 3 y 4	existe una menor necesidad de alimentación, ya que se debe considerar recuperación de animales enfermos y mantención de animales no productivos.
Salud Animal	13,1%	2, 3 y 4	hay menores costos de tratamientos y de manejo animal, pero no alcanzan a cubrir los mayores de costos de los análisis para diagnóstico de enfermedades.
Reproducción	-9,1%	5	hay mayor eficiencia reproductiva lo que implica menores costos derivados de la inseminación.
Sala de Ordeña	-2,9%	2, 3 y 4	hay menores costos para prevenir un aumento en la difusión de las enfermedades, lo que implica aumentar las exigencias sanitarias y normas preventivas durante el proceso de ordeña.
Movilización	-2,6%	2, 3 y 4	hay menores costos por mayor cantidad de viajes para compra de medicamentos y otros para los animales enfermos.
Litro por hectárea	10%	1	debido a lo anterior se estima un aumento de 10% de la productividad por hectárea, de acuerdo con información de las plantas lecheras la productividad por hectárea es de 7.000 litros de leche.

Considerando los supuestos entregados, posteriormente se determinó el costo e ingreso por litro de leche. Los valores estimados se basan en información obtenida de estudios de casos INIA, Odepa 2005 (Página Web e Informativos) y plantas lecheras de la IX Región.

Cuadro N°2: Estructura de Costo e Ingreso por litro de leche (Valores en \$)

Item	Con tecnología	Sin tecnología	Diferencia \$	Diferencia %
Mano de Obra	22,05	23,37	-1,32	-5,7%
Alimentación	42,54	45,10	-2,55	-5,7%
Combustibles y Otros	8,06	8,06	0,00	0,0%
Reparaciones	3,66	3,66	0,00	0,0%
Salud Animal	6,35	5,62	0,73	13,1%
Reproducción	3,99	4,39	-0,40	-9,1%
Control Lechero	1,47	1,47	0,00	0,0%
Sala Ordeña	4,06	4,19	-0,12	-2,9%
Riego	0,21	0,21	0,00	0,0%
Arriendo Máquinas	0,42	0,42	0,00	0,0%
Subtotal Costos Directos	92,82	96,48	-3,66	-3,8%
Electricidad	3,73	3,73	0,00	0,0%
Fletes	0,48	0,48	0,00	0,0%
Textiles	0,16	0,16	0,00	0,0%
Contabilidad	1,44	1,44	0,00	0,0%
Gastos Financieros	2,61	2,61	0,00	0,0%
Impuestos a la Renta	0,37	0,37	0,00	0,0%
Bienes Raíces	0,88	0,88	0,00	0,0%
Vehículo	1,94	1,99	-0,05	-2,6%
Varios	2,56	2,56	0,00	0,0%
Subtotal Costos Indirectos	14,17	14,22	-0,05	-0,4%
Total Costo litro de leche \$	106,99	110,70	-3,71	-3,4%
Precio por litro	126,00	122,00	4,00	3,3%
Margen Bruto	19,01	11,30	7,71	68,3%
Depreciación	9,94	9,94	0,00	0,0%
Utilidad	21,03	18,92	2,10	11,1%

Luego los valores obtenidos se aplican a la productividad por hectárea, obteniéndose finalmente los costos e ingresos por hectárea.

Cuadro N°3: Estructura de Costo e Ingreso por hectárea (Valores en \$)

Item	Con tecnología	Sin tecnología	Diferencia \$	Diferencia %
Costo directos del litro de leche	92,82	96,48	-3,66	-3,8%
Costo indirectos del litro de leche	14,17	14,22	-0,05	-0,4%
Costo totales del litro de leche	106,99	110,70	-3,71	-3,4%
Precio del litro de leche	126,00	122,00	4,00	3,3%
Litros por hectárea	7.700,00	7.000,00	700,00	10,0%
Costos directos por hectárea \$	714.705,51	675.366,96	39.338,55	5,8%
Costos indirectos por hectárea \$	109.083,78	99.524,77	9.559,02	9,6%
Costo totales del litro de leche	823.789,30	774.891,73	48.897,57	6,3%
Ingresos por hectárea \$	970.200,00	854.000,00	116.200,00	13,6%
Ingreso - Costo por hectárea \$	256.494,49	178.633,04	76.861,45	43,0%

Se considera necesario mejorar el ambiente donde están los animales para que el control sea exitoso y para que las enfermedades no se diseminen o reintroduzcan o sea para que sea eficazmente controlada, es necesario una adecuación de la infraestructura lo que incluye cercos, mangas, corrales, bebederos, caminos, ente otros.

Cuadro N°4: Estructura de Inversiones por hectárea (Valores en \$)

Item	Con tecnología	Sin tecnología	Diferencia \$	Diferencia %
Cercos, corrales, mangas, bebederos y otros	50.000	0	50.000	100,0%
Ingreso -Costo por hectárea \$ (*)	50.000	0	50.000	100%

De acuerdo con las estructuras de costos, ingresos, inversiones se entrega a continuación los cuadros con los flujos de cajas determinados, contemplando lo siguiente:

- Se contempla que el primer año se aplica la tecnología en el sistema productivo, pero los beneficios de precio y productividad por hectárea se verían reflejados a partir del segundo año del proyecto.
- El horizonte de evaluación se considera de 6 años.
- No se considera un impuesto a las utilidades.

Cuadro N°5: Situación producción de leche para una hectárea

ITEM	AÑOS DE PROYECCION					
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	AÑO 4	AÑO 5	AÑO 6
1. ENTRADAS						
Ingresos por venta sin la tecnología						
Precio por litro	122	126	126	126	126	126
Litros por hectárea	7.000	7.700	7.700	7.700	7.700	7.700
Subtotal Entradas	854.000	970.200	970.200	970.200	970.200	970.200
2. SALIDAS						
2.1 Inversiones						
Infraestructura	50.000					
Subtotal Inversiones	50.000	0	0	0	0	0
2.2 Gastos de Operación: Gastos Directos						
Mano de Obra	163.610	169.797	169.797	169.797	169.797	169.797
Alimentación	315.676	327.590	327.590	327.590	327.590	327.590
Combustibles y Otros	56.396	62.035	62.035	62.035	62.035	62.035
Reparaciones	25.649	28.214	28.214	28.214	28.214	28.214
Salud Animal	39.342	48.924	48.924	48.924	48.924	48.924
Reproducción	30.701	30.693	30.693	30.693	30.693	30.693
Control Lechero	10.260	11.286	11.286	11.286	11.286	11.286
Sala Ordeña	29.302	31.292	31.292	31.292	31.292	31.292
Riego	1.477	1.624	1.624	1.624	1.624	1.624
Arriendo Máquinarias	2.954	3.249	3.249	3.249	3.249	3.249
Subtotal Gastos de Operación Directos	675.367	714.706	714.706	714.706	714.706	714.706
2.3 Otros: Gastos Indirectos						
Electricidad	26.115	28.727	28.727	28.727	28.727	28.727
Fletes	3.342	3.676	3.676	3.676	3.676	3.676
Textiles	1.088	1.197	1.197	1.197	1.197	1.197
Contabilidad	10.104	11.115	11.115	11.115	11.115	11.115
Gastos Financieros	18.265	20.092	20.092	20.092	20.092	20.092
Impuestos a la Renta	2.565	2.821	2.821	2.821	2.821	2.821
Bienes Raíces	6.140	6.754	6.754	6.754	6.754	6.754
Vehículo	13.950	14.951	14.951	14.951	14.951	14.951
Varios	17.954	19.750	19.750	19.750	19.750	19.750
Subtotal Costos Indirectos	99.525	109.084	109.084	109.084	109.084	109.084
Subtotal Gastos Indirectos	199.050	218.168	218.168	218.168	218.168	218.168
Subtotal salidas	924.416	932.873	932.873	932.873	932.873	932.873
3. BENEFICIOS NETOS TOTALES	-70.416	37.327	37.327	37.327	37.327	37.327

Una vez determinados los flujos de caja se calculan los indicadores económicos Tir y Van, los cuales arrojan valores positivos y muy interesantes para el agricultor, ver cuadro N°6, y es bueno además recalcar que el riesgo para el agricultor de implementar la tecnología no es alto.

Cuadro N°6: Indicadores económicos

Tipo proyección	Tasa de Descuento	VAN (\$)	TIR (%)	Observación
Agricultor	12%	64.139	45%	Determinación para una hectárea productiva

d) Evaluación económica social: Situación regional de la implementación del servicio tecnológico y uso por parte de los agricultores

Con la situación de estructura de costos, ingresos e inversiones por hectárea es factible hacer una proyección regional, desde un punto de vista del beneficio de la implementación de la tecnología que desarrollo el proyecto en la situación de los agricultores considerados como usuarios factibles de los servicios.

Se consideró los costos e ingresos por hectárea determinados para la proyección del agricultor por las hectáreas que adoptan la tecnología de acuerdo al cuadro N°5 del punto C (situación agricultor). Además se considera incorporar como inversiones el costo total que tuvo la realización del proyecto y los costos de la realización de un plan de difusión que eventualmente se debería realizar (ver Cuadro N°7). De acuerdo con información de costos referenciales de otros programas de difusión gubernamentales este último costo de se determinó como sigue:

Programa difusión	\$/Ha	N° Ha	Duración
Lanzamiento	1.000	30.000	1er año
Mantenimiento	500	30.000	2do, 3er y 4to año

Se estima que con un plan de difusión inicial fuerte y con tres años posteriores de continuidad es posible ir incorporando la curva de adopción en forma satisfactoria, ya que la aplicación de la tecnología puede ser rápida, especialmente en los predios con control lechero, por lo cual el horizonte de evaluación se considera a 6 años con un punto de vista conservador.

Se definió una curva de adopción de tecnología muy conservadora, considerando el horizonte de evaluación definido anteriormente y la experiencia de transferencia y difusión de resultados de INIA Carillanca en el rubro para otras actividades similares. En las actividades de difusión realizadas por el proyecto asistieron en promedio 42 productores, lo cual representa un 12% de los productores a los cuales se realizaron los análisis de diagnóstico en sus predios.

Cuadro N°8: Curva de adopción de la tecnología

Item	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6
Curva de AT	2%	5%	10%	15%	20%	35%
N° Hectareas totales	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000
N° Hectareas con AT	600	1.500	3.000	4.500	6.000	10.500
N° Hectareas AT	29.400	28.500	27.000	25.500	24.000	19.500

AT: Adopción Tecnológica

Por otra parte se consideró los 337 productores y sus hectáreas asociadas en que se realizaron análisis (toma de muestras, etc.) durante el desarrollo del proyecto. Esto se determinó con 337 productores por 50 hectáreas (hectáreas promedio por productor), lo cual da un total de 16.850 hectáreas, se estima que a nivel de la IX Región las hectáreas potenciales de adoptar la tecnología serían el doble, por lo cual se considera 30.000 hectáreas potenciales de adopción tecnológica a nivel regional.

Con esta información, se considera que a partir del primer año de evaluación (año de término del proyecto) al menos 12 productores que han participado de una u otra forma dentro del proyecto incorporan un programa de control de enfermedades en el primer año.

Cuadro N°9: Situación producción de leche para la Región

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCION					
	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	AÑO 4	AÑO 5	AÑO 6
1. ENTRADAS						
Ingresos por venta con la tecnología						
Ingresos por hectárea con tecnología	970.200	970.200,00	970.200,00	970.200,00	970.200,00	970.200,00
N° Hectareas con AT	600	1.500	3.000	4.500	6.000	10.500
Subtotal Ingresos	582.120.000	1.455.300.000	2.910.600.000	4.365.900.000	5.821.200.000	10.187.100.000
Valor Residual						
Subtotal Entradas	582.120.000	1.455.300.000	2.910.600.000	4.365.900.000	5.821.200.000	10.187.100.000
2. SALIDAS						
2.1 Inversiones						
Costos del Proyecto	143.521.531					
Programa de Difusión	30.000.000	15.000.000	15.000.000	15.000.000		
Infraestructura	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000
N° Hectareas con AT	600	900	2.100	2.400	3.600	6.900
Subtotal Inversiones	203.521.531	60.000.000	120.000.000	135.000.000	180.000.000	345.000.000
2.2 Gastos de Operación: Gastos Directos						
Gtos. Dir. por Ha. c/ tecnología	714.705,51	714.705,51	714.705,51	714.705,51	714.705,51	714.705,51
N° Hectareas con AT	600	1.500	3.000	4.500	6.000	10.500
Subtotal Gastos de Operación	426.823.309	1.072.052.272	2.144.116.545	3.216.174.217	4.282.233.090	7.504.407.907
2.3 Otros: Gastos Indirectos						
Gtos. Ind. por Ha. c/ tecnología	109.083,78	109.083,78	109.083,78	109.083,78	109.083,78	109.083,78
N° Hectareas con AT	600	1.500	3.000	4.500	6.000	10.500
Subtotal Otros Gastos	65.450.271	163.625.677	327.251.354	490.877.031	654.502.709	1.145.379.740
Subtotal salidas	697.795.111	1.295.683.950	2.591.367.899	3.842.051.849	5.122.735.799	8.994.787.647
3. BENEFICIOS NETOS TOTALES	-115.675.111	159.616.050	319.232.101	523.848.151	698.464.201	1.192.312.353

Los indicadores económicos TIR y VAN arrojan valores positivos e interesantes para el rubro, ver cuadro N°10, pero es bueno recalcar el que el Van como indicador es más confiable y representativo, de todas formas los resultados económicos son muy favorables al haber invertido en realizar el proyecto. Cabe destacar que el impacto y valores futuros están basados en el éxito del plan de difusión de la tecnología, lo cual implica además una recepción positiva por parte de los productores de la región considerada en la evaluación, y su ampliación a otras regiones, lo que superaría aún más los resultados positivos obtenidos.

Cuadro N°10: Resumen de indicadores económicos

Tipo proyección	Tasa de Descuento	VAN (\$)	TIR (%)	Observación
Región	12%	1.774.630.539	208%	Determinación de acuerdo a la curva de adopción tecnológica

e) Evaluación económica privada: Situación Empresa que presta el servicio tecnológico.

Para determinar la evaluación económica del negocio para la institución que implementaría la prestación de servicios se consideran tres servicios a ofrecer, cuya descripción se entrega a continuación:

1. Monitoreo de enfermedades bovinas: consistente en realizar un análisis de anticuerpos en una muestra de leche del estanque e interpretar el resultado de acuerdo a variables demográficas (población y movimiento animal) y a resultados previos (comportamiento del estanque).
2. Diagnóstico de enfermedades bovinas: consistente en realizar un análisis de anticuerpos en una muestra de leche o sangre de uno o varios animales e interpretar el resultado de acuerdo a variables individuales (historia del animal).
3. Control de enfermedades bovinas: consiste en la implementación de un plan de manejo de la población animal tendiente a eliminación/erradicación de una determinada enfermedad detectada en el rebaño.

La estrategia que se contempla para este negocio es competir por diferenciación en calidad como laboratorio acreditado.

Para determinar las estructuras de inversiones, costos e ingresos se contemplan los siguientes supuestos:

- Enfermedad bovina a considerar al inicio del Laboratorio es la: Brucelosis
- Se estima que la enfermedad de Brucelosis desaparecería en un horizonte de 7 a 9 años.
- Existen otras enfermedades posibles de abordar y que tienen una mayor prevalencia tales como Leucosis, DVB e IBR, entre otras.
- La estimación de mercado para la evaluación, está realizada en base a Brucelosis, que es la enfermedad con menor prevalencia entre las que se analizaron en el proyecto.
- De acuerdo a lo anterior la evaluación se realizó en términos muy conservadores al considerar como mercado objetivo para la venta de servicios de diagnóstico de

Brucelosis, que es la enfermedad menos prevalente lo que implica que el horizonte del negocio es mucho mayor.

- Se considera que en un año de intervención, se controla la enfermedad con alta probabilidad de éxito (en base al diagnóstico precoz por vigilancia).

En términos de la demanda y mercado objetivo para el negocio de servicios de Diagnóstico, Monitoreo y Control de Enfermedades, se tiene que:

- De acuerdo con la base de datos de todas las lecherías de la IX Región, esta involucra 580 estanques lecheros, que es la demanda potencial.
- En el proyecto FIA terminado se trabajó fuertemente con 317 lecherías, lo cual se estima podrían ser clientes potencialmente "cautivos".
- El proyecto FIA determinó que de las 317 lecherías, hay al menos un 4% positivas, las cuales requieren diagnóstico y control, para Brucelosis.
- El proyecto FIA determinó que de las 317 lecherías, hay al menos un 60% positivas, las cuales requieren diagnóstico y control, para IBR, DVB y Lecucosis.

En relación a la oferta,

- La única empresa que tiene en el mercado los dos primeros servicios contemplados en este negocio (Monitoreo y Diagnóstico) es Cooprinsen, con un precio promedio de \$2.140.- por análisis. Con respecto al servicio de control, es muy probable que en el futuro cercano lo implementen.
- Dentro de las empresas potenciales de incorporarse en este negocio está Insecabio, que podría llegar a ser un competidor interesante.

Cuadro N°11: Mercado objetivo

Cantidad	Unidad	Comentario
317	Nº estanques lecheros	Se considera 317 lecherías como mercado "cautivo", con las cuales se trabajó fuertemente en el proyecto FIA. Se considera una frecuencia de uso del servicio de análisis en complemento con el control lechero, el cual se realiza una vez al mes.
1.400	Nº de animales	De acuerdo con información obtenida del proyecto se determinó que de las 317 lecherías con se tabajó, existían 12 rebaños con Brucelosis, lo que estaría afectando a 1.400 animales. Se contempla el uso del servicio de análisis al menos 6 veces al año, por la naturaleza ciclica del proceso de control y erradicación, asociados al diagnóstico.
12	Nº estanques lecheros	De acuerdo con información obtenida del proyecto se determinó que de las 317 lecherías con se tabajó, existían 12 rebaños con Brucelosis. Se considera una frecuencia de uso del servicio análisis

En términos de requerimiento para implementar los servicios se consideró que se cuenta ya con la disponibilidad de personal, equipamiento e infraestructura adecuada a los requerimientos, por lo cual en estos aspectos se consideran los tiempos de uso de acuerdo a cada servicio a ofrecer. Los costos para usos de equipamiento e infraestructura se basan en los gastos de adquisición y depreciación.

Cuadro N°12: Estructura de Inversiones (Valores en \$)

Nº	Item	Tipo	Valor \$	% Cartera de Inversión	Valor \$ Propuesto	Vida útil (años)	Valor residual %	Valor Presente 1	Depreciación Anual 1	Depreciación Total 1
1	Timer	Equipo	15.000	40%	6.000	9	10%	600	600	0,26
2	Estufa de cultivo	Equipo	2.500.000	40%	1.000.000	9	20%	200.000	88.889	42,08
3	Centrifuga	Equipo	3.500.000	40%	1.400.000	5	20%	280.000	224.000	106,06
4	Lector Elisa	Equipo	4.000.000	40%	1.600.000	5	20%	320.000	256.000	121,21
5	Autoclave	Equipo	3.500.000	40%	1.400.000	5	20%	280.000	224.000	106,06
6	Destilador de agua	Equipo	2.500.000	40%	1.000.000	5	20%	200.000	160.000	75,76
7	Lavador automático de placas	Equipo	3.000.000	40%	1.200.000	5	20%	240.000	192.000	90,91
8	MicroPipetas monocanal de 1.000 ul	Equipo	100.000	40%	40.000	5	20%	8.000	6.400	3,03
9	MicroPipetas multicanal de 200 ul	Equipo	700.000	40%	280.000	5	20%	56.000	44.800	21,21
10	MicroPipetas monocanal de 20 ul	Equipo	100.000	40%	40.000	5	20%	8.000	6.400	3,03
11	Computador para lector Elisa	Equipo	800.000	100%	800.000	4	5%	40.000	190.000	89,96
12	Computador para secretaría	Equipo	800.000	40%	320.000	4	5%	16.000	76.000	35,98
13	Impresora	Equipo	200.000	40%	80.000	4	5%	4.000	19.000	9,00
14	Refrigerador	Equipo	200.000	40%	80.000	3	10%	8.000	24.000	11,36
15	Infraestructura habilitada	Infraestructura	10.000.000	40%	4.000.000	9	70%	2.800.000	133.333	63,13
16	Terreno	Terreno	2.000.000	40%	800.000			800.000	0	0,00
17	Acreditación laboratorio	Otro	500.000	100%	500.000			0	0	0,00

Para determinar los costos unitarios por análisis se define la siguiente estructura de requerimiento para cada tipo de análisis (Cuadro N°13) y considerando la unidad de costo como un lote de 92 muestras, y donde la capacidad de procesamiento diaria es de 92 x 3 muestras/día, es decir se pueden realizar 92 análisis por tres veces, que corresponden a 1 lote por cada tipo de análisis a ofrecer.

Cuadro N°13: Requerimientos para realizar los servicios ofrecidos

N°	Item	Tipo	Valor \$	Unidad	Monitoreo	Diagnóstico	Control
					Cambios		
1	Bioquímico	Personal	6.818	Hora	1	1	1
2	Técnico de laboratorio	Personal	3.693	Hora	7	7	7
3	Veterinario	Personal	6.818	Hora	0	0	4
4	Secretaria	Personal	1.989	Hora	1,0	1,0	1,0
5	Pocillos	Fungibles	100	Unitario	4	4	4
6	Puntillas 200 ul	Fungibles	7,5	Unitario	216	216	216
7	Puntillas 1.000 ul	Fungibles	6,5	Unitario	92	92	92
8	Placas de dilución	Fungibles	4.200	Unitario	1	1	1
9	Kit de anticuerpos	Fungibles	45.000	Unitario	0,1	0,1	0,1
10	Tubos Eppendorf	Fungibles	12	Unitario	184	184	184
11	Gradillas para tubos Eppendorf	Fungibles	2.000	Mes	0,4	0,4	0,2
12	Material de oficina y computación	Fungibles	50.000	Mes	0,4	0,4	0,2
13	Cloro	Fungibles	530	Litro	0,0625	0,0625	0,0625
14	Detergente	Fungibles	1.500	Litro	0,0625	0,0625	0,0625
15	Guantes	Fungibles	192	Caja	1	1	1
16	Papel absorbente	Fungibles	17.900	Rollo	0,01	0,01	0,01
17	Visitas prediales/empresas	Otros	20.000	Hora	0	0	2
18	Servicios de agua, luz y calefacción	Otros	5.000	Día	0,4	0,4	0,2
19	Telefono, internet, fax,	Otros	2.500	Día	0,4	0,4	0,2
20	Gastos de administración	Otros	10.000	Día	0,4	0,4	0,2
21	Mantenimiento de equipos e imprevistos	Otros	57.000	Día	1,0	1,0	
22	Mantenimiento de equipos e imprevistos	Otros	30.000	Día			1,0
23	Timer	Uso Equipo	0,28	Hora	3	3	3
24	Estufa de cultivo	Uso Equipo	42,09	Hora	3	3	3
25	Centrifuga	Uso Equipo	106,06	Hora	0,43	0,43	0,43
26	Lector Elisa	Uso Equipo	121,21	Hora	1	1	1
27	Autoclave	Uso Equipo	106,06	Hora	1	1	1
28	Destilador de agua	Uso Equipo	75,76	Hora	1	1	1
29	Lavador automático de placas	Uso Equipo	90,91	Hora	2	2	2
30	MicroPipetas monocanal de 1.000 ul	Uso Equipo	3,03	Hora	1	1	1
31	MicroPipetas multicanal de 200 ul	Uso Equipo	21,21	Hora	1	1	1
32	MicroPipetas monocanal de 20 ul	Uso Equipo	3,03	Hora	1	1	1
33	Computador para lector Elisa	Uso Equipo	89,96	Hora	2	2	2
34	Computador para secretaria	Uso Equipo	35,98	Hora	0,4	0,4	0,2
35	Impresora	Uso Equipo	9,00	Hora	0,4	0,4	0,2
36	Refrigerador	Uso Equipo	11,36	Hora	0,4	0,4	0,2
37	Infraestructura	Uso Infraestructura	63,13	Hora	7	7	7
38	Terreno	Uso Infraestructura	0,00	Hora	7	7	7

Con la información anterior se procede a determinar el costo directo de cada servicio a ofrecer, con lo cual se le asume un 3% sobre éste, como aporte a la publicidad y marketing. Al costo total del servicio se le incorpora un 40% adicional para obtener un precio de venta competitivo en el mercado y que además sustente el negocio acorde con las inversiones que se realizan.

Cuadro N°14: Costos y precios por servicio a entregar

ITEM	MONITOREO	DIAGNÓSTICO	CONTROL
Personal \$	377	377	673
Fungibles \$	378	378	264
Otros \$	696	696	799
Uso de equipos \$	10	10	10
Uso de Infraestructura \$	5	5	5
Subtotal Costos \$	1.464	1.464	1.751
Publicidad y Marketing %	3%	3%	3%
Publicidad y Marketing \$	44	44	53
Costo por muestra \$	1.508	1.508	1.803
Incremento para venta %	40%	40%	40%
Precio venta por muestra \$	2.112	2.112	2.525

Para determinar los ingresos al implementar los servicios se determina, en primer lugar una proyección de la cantidad de análisis que serán entregados para el primer año, y posteriormente para el horizonte de 9 años que se considera para su evaluación del proyecto. El número de análisis a vender se estima en base a una curva de escalamiento, la cual indica el porcentaje que se captura del mercado objetivo considerado (ver Cuadro N°11), en cada situación., estos porcentaje se contemplan en forma muy conservado, castigando de alguna manera las expectativas mas reales del proyecto, en post de hacer su evaluación con un mayor rango de éxito.

Cuadro N°15: Proyección de las ventas para el primer año

	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%
Escalamiento	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%	30%
1 Cantidad de Servicios Montoreo	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
Mercado objetivo N° estanques lecheros	317	317	317	317	317	317	317	317	317	317	317	317	317
2 Cantidad de Servicios Diagnóstico	420	0	420	0	420	0	420	0	420	0	420	0	420
Mercado objetivo N° animales	1.400		1.400		1.400		1.400		1.400		1.400		1.400
3 Cantidad de Servicios Control	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4
Mercado objetivo N° estanques lecheros	12		12		12		12		12		12		12

Cuadro N°16: Proyección de las ventas para nueve años

		30%	40%	50%	60%	70%	80%	80%	80%	80%
Escalamiento		30%	40%	50%	60%	70%	80%	80%	80%	80%
1 Cantidad de Servicios Monitoreo		1.141	1.522	1.902	2.282	2.663	3.043	3.043	3.043	3.043
Mercado objetivo N° estanques lecheros		3.804	3.804	3.804	3.804	3.804	3.804	3.804	3.804	3.804
2 Cantidad de Servicios Diagnóstico		2.520	3.360	4.200	5.040	5.880	6.720	6.720	6.720	6.720
Mercado objetivo N° animales		8.400	8.400	8.400	8.400	8.400	8.400	8.400	8.400	8.400
3 Cantidad de Servicios Control		22	29	36	43	50	58	58	58	58
Mercado objetivo N° estanques lecheros		72	72	72	72	72	72	72	72	72

Finalmente se determinan los ingresos en valores monetarios lo cual se basa en el número de análisis a vender multiplicado por el valor de venta de cada análisis.

Cuadro N°17: Proyección de ingresos (Valores en \$)

		Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9
Cantidad de Servicios										
Servicio Monitoreo	2.112	1.141	1.522	1.902	2.282	2.663	3.043	3.043	3.043	3.043
Servicio Diagnóstico	2.112	2.520	3.360	4.200	5.040	5.880	6.720	6.720	6.720	6.720
Servicio Control	2.525	22	29	36	43	50	58	58	58	58
Total de Servicios		3.683	4.910	6.138	7.366	8.593	9.821	9.821	9.821	9.821

Con toda la información generada anteriormente se determinan los flujos de caja, en relación a ingresos totales, costos totales e inversiones. Para determinar estos flujos se contemplan los siguientes aspectos:

- El capital de trabajo se considera como un 20% sobre los costos del primer año (sin contar la depreciación).
- El año 5 se realiza una reinversión para aquellos equipos que han terminado su vida útil.
- La recuperación de la inversión en equipos e infraestructura se consideran de acuerdo a su valor residual.
- Se contempla la venta del terreno, recuperando en un 100% la inversión, aún que lo más probable es que el valor aumente en vez de disminuir.
- El horizonte de evaluación se considera de 9 años tiempo de depreciación de la inversión de mayor duración, haber recuperado la inversión, y por otro lado haber controlado la mayor parte de las enfermedades del mercado "cautivo".
- Se considera un impuesto a las utilidades del orden de un 15%.

Cuadro N°18: Flujo de Caja (Valores en \$)

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
Ingresos									
Servicio Monitoreo	2.409.742	3.212.989	4.016.236	4.819.483	5.622.731	6.425.978	6.425.978	6.425.978	6.425.978
Servicio Diagnóstico	5.321.196	7.094.928	8.868.660	10.642.392	12.416.124	14.189.856	14.189.856	14.189.856	14.189.856
Servicio Control	54.535	72.713	90.892	109.070	127.249	145.427	145.427	145.427	145.427
Subtotal Ingresos	8.785.473	10.380.630	12.975.788	15.570.945	18.166.104	20.761.261	20.761.261	20.761.261	20.761.261
Costos									
Personal	1.393.822	1.856.429	2.323.036	2.787.643	3.252.250	3.716.858	3.716.858	3.716.858	3.716.858
Fungibles	1.387.890	1.890.520	2.313.151	2.775.781	3.238.411	3.701.041	3.701.041	3.701.041	3.701.041
Otros	2.984.178	3.418.904	4.273.630	5.128.357	5.983.083	6.837.809	6.837.809	6.837.809	6.837.809
Publicidad y marketing	161.972	215.963	269.954	323.945	377.936	431.926	431.926	431.926	431.926
Depreciación	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489
Subtotal Costos	6.395.351	8.837.306	10.667.260	12.583.215	14.339.168	16.175.123	16.175.123	16.175.123	16.175.123
Utilidades antes impuesto	790.121	1.549.325	2.308.528	3.067.732	3.826.935	4.586.139	4.586.139	4.586.139	4.586.139
Impuesto 15%	118.518	232.399	346.279	460.160	574.040	687.921	687.921	687.921	687.921
Utilidades después de impuesto	671.603	1.316.926	1.962.249	2.607.572	3.252.895	3.898.218	3.898.218	3.898.218	3.898.218
Depreciación	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489	1.487.489
Recuperación de los equipos					1.460.000				1.652.000
Recuperación de la infraestructura									2.800.000
Venta Terreno									800.000
Recuperación del capital de trabajo									1.101.573
Inversiones									
Equipos	9.160.000				8.240.000				
Infraestructura	4.000.000								
Terreno	800.000								
Acreditación Laboratorio	500.000								
Capital de Trabajo (20%)	1.101.573								
Subtotal Inversiones	15.562.573	0	0	0	8.240.000	0	0	0	0
Flujos de Caja	-15.561.573	2.159.892	2.094.415	3.449.738	4.895.661	-2.039.616	5.385.707	5.385.707	10.939.279

Por último con los flujos ya determinados se calculan los indicadores económicos de Van y Tir, con un tasa de descuento del 12%.

Cuadro N°19: Indicadores económicos

Tasa de descuento :	12,00%
VAII :	\$ 3.787.255
TIR :	16,75%

Los indicadores económicos indican que el proyecto es rentable y atractivo desde un punto de vista privado del negocio. Considerando que estos indicadores son positivos, pero no necesariamente extraordinarios en términos de rentabilidad, vale recordar que de alguna manera hay un cierto “castigo” en su determinación en término del porcentaje de captura del mercado. Por otro lado es válido considerar el aporte socio-económico que aporta la implementación de los servicios mencionados, lo cual se entrega en la evaluación anterior.

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO (LEGALES, TÉCNICOS, ADMINISTRATIVOS, DE GESTIÓN) Y LAS MEDIDAS TOMADAS PARA ENFRENTAR CADA UNO DE ELLOS.

7.1 LEGALES

No se registran problemas legales durante la ejecución del proyecto.

7.2 TÉCNICOS

a) Uno de los problemas técnicos enfrentados tuvo que ver con el lavador de microplacas. Una vez recibido este equipo se probaron diversos programas de lavado y se realizaron las calibraciones de desplazamiento lateral y vertical del Manifold. Este sin embargo, presentó un problema menor en la fase de dispensado de líquidos, que consistió en el goteo constante y la pérdida de retención de líquido en uno de los canales de lavado. Para corregir este problema, se contactó al Servicio Técnico de la empresa proveedora para solicitar su restitución o reparación, proceso que fue acogido favorablemente.

b) Un segundo problema técnico tuvo que ver con la disposición de animales (o muestras) positivos para cada una de las enfermedades en estudio. Esto es de gran relevancia para el montaje de las técnicas de ELISA y sobretodo, necesarias como controles positivos en el montaje inicial de las técnicas de PCR. Una forma de solucionar este problema fue analizando al azar muestras de animales individuales recolectadas previamente en otros experimentos, a partir de los cuales se seleccionaron animales positivos para las enfermedades de interés. Sin embargo, debido al bajo número de predios con animales positivos a Brucelosis, no fue muy fácil encontrar estos animales, por lo que se solicitó cooperación formal a SAG Osorno, quienes facilitaron, aunque con alguna demora, muestras de cultivo para *Brucella abortus* y las cepa vacunal Cepa 19. En otros casos se solicitó muestras positivas a DVB al Laboratorio del Complejo de Lo Aguirre de Santiago. Sin embargo, por diversas razones, estas muestras nunca fueron despachadas a nuestro laboratorio, y el problema se solucionó finalmente gracias a contactos con la Universidad Austral (Dr. Germán Reinhardt).

7.3 ADMINISTRATIVOS

Adquisición de kits: El principal problema presentado correspondió a la adquisición de los kits comerciales los cuales carecían de un distribuidor en el país. Además, debido a que todos estos kits tienen fecha de vencimiento, a veces fue necesario esperar el desarrollo de un nuevo lote para disponer de un tiempo más prolongado para su utilización antes de su vencimiento. Esto significó en ciertas ocasiones, esperar varias semanas antes de tener el producto ya que además había que considerar las demoras ocasionadas durante envío y desaduanaje.

Para corregir esta situación, fue necesario establecer los contactos directamente con la empresa proveedora, y con un agente de aduana, para coordinar la compra e internación expeditas de estos productos al país.

7.4 GESTIÓN

a) Uno de los primeros problemas de gestión presentado en el proyecto fue el bajo número de respuestas (25%) a una encuesta que se realizó a los productores de la IX Región. Esta

encuesta tenía como objetivo informarle a los productores acerca de las actividades de este proyecto, y recoger a la vez información valiosa respecto al uso de vacunas interferentes para las enfermedades IBR y DVB, además de información relacionada al manejo en general del rebaño. Para corregir esta situación, se decidió finalmente visitar a cada uno de los predios, aprovechando el recorrido de los camiones lecheros. Esta actividad contó con la colaboración de las empresas lecheras y del técnico del proyecto Sr. Horacio Floody quien coordinó directamente las salidas a terreno con los choferes de los camiones, muchas de las cuales fueron incluso de madrugada. Esta misma actividad sirvió para completar la base de datos de los productores con la toma de un punto de referencia satelital (GPS) de cada lechería.

b) Un segundo problema de gestión tuvo que ver con la incorporación de la Empresa Lechera Loncoleche en el estudio. Esta empresa insistió en disponer de los resultados de los análisis de los productores, que los convenios de confidencialidad firmados previamente con FIA y SAG nos impedían hacer. Esta situación, sumado a que muchos estanques de esta empresa están ubicados en la X Región, influyó en la decisión de excluirlos del estudio y por ello, la muestra total de estanques de la Región correspondió a la contribución de las otras 3 empresas Lecheras (Surlat, Soprole, y Calan (ex - Parmalat)) que representan el 74% de los estanques de la Región.

c) Un tercer problema de gestión tuvo que ver con la identificación de las muestras de leche que provenían de los estanques lecheros. Cada planta lechera asigna en forma arbitraria un número de registro para cada productor y en algunos casos, como en la planta SOPROLE han diseñado un sistema de identificación en base a códigos de barra, número que está relacionado con la empresa que realiza el Control Lechero (Cooprinsem). El problema se presentó en el segundo muestreo de los estanques prediales de la Región, al percatarnos que habían algunas muestras que no fueron recibidas en esta segunda oportunidad. Esta situación se debió finalmente al movimiento de algunos productores entre las distintas empresas lecheras, quienes buscan mejores precios de pago a la leche. Esta situación se dificultó aún más por el masivo traslado de productores desde PARMALAT, debido a la crisis económica por la que atravesaba esta empresa. Para corregir esta situación, se planteó la necesidad de implementar un sistema único de identificación de los estanques prediales de la Región, que permitió un seguimiento o trazabilidad de la muestra desde que se toma en el predio hasta su llegada al laboratorio. Para este sistema se contó con la colaboración del SAG, quienes pusieron a nuestra disposición la base de datos de predios de la IX Región, a los cuales se les ha asignado un número predial único (RUP). Para el establecimiento de este sistema se solicitó la liberación de los recursos disponibles en el ítem imprevistos para comprar una impresora térmica, un lector de códigos de barra y un software que permitió establecer un sistema identificación de cada estanque predial de la Región, basado en una etiqueta que incluye un código de barra con el RUP de cada lechería impreso en la etiqueta.

8. CALENDARIO DE EJECUCIÓN (PROGRAMADO, REAL) Y CUADRO RESUMEN DE COSTOS (PROGRAMADOS, EFECTIVOS) DEL PROYECTO. EL CUADRO DE COSTOS ES EL MISMO QUE SE PRESENTA EN EL INFORME FINANCIERO FINAL ® FINANCIAMIENTO SOLICITADO MÁS FINANCIAMIENTO TOTAL.

GASTOS PROGRAMADOS /REAL SOBRE APORTES FIA														
GASTO PROGRAMADO	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real
	Ene-02	Ene-02	Feb-02	Feb-02	Mar-02	Mar-02	Abr-02	Abr-02	May-02	May-02	Jun-02	Jun-02	Jun-02	Jun-02
RECURSOS HUMANOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profesionales	458.058	0	458.058	0	458.058	0	458.058	0	458.058	0	458.058	0	458.058	0
Técnicos	0	0	0	0	0	0	350.378	350.378	350.378	350.378	350.378	350.378	350.378	350.378
Consultores	0	0	0	0	78.000	0	78.000	312.000	78.000	0	78.000	0	78.000	0
Administrativos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAQUINARIAS y EQUIPOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adquisición de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valorización de Uso de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos Computacionales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Infraestructura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOVILIZACIÓN, VÍATICOS Y COMBUSTIBLES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Víaticos Nacionales o Alojamiento y Comida	109.200	9.200	109.200	0	0	0	0	0	182.000	129.200	0	0	0	0
Víaticos Internacionales o Alojamiento y Comida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasajes	0	3.300	0	0	665.600	156.439	0	1.700	0	59.800	0	0	0	0
Combustibles	46.800	12.700	46.800	43.860	46.800	0	46.800	79.860	171.600	47.190	46.800	0	0	0
Peajes	0	8.100	0	0	0	0	0	7.800	4.600	3.600	0	0	0	0
MATERIALES y SUMINISTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herramientas	0	0	2.257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Instrumentos de Laboratorio	624.957	0	0	0	0	0	0	963.007	0	103.451	0	118.413	0	0
Materiales Varios	0	0	0	34.400	4.489.252	148.056	0	0	0	1.074.516	0	1.676.438	0	0
SERVICIOS DE TERCEROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Análisis de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	237.952	0	0
ACTIVIDAD DE CAPACITACIÓN O TALLERES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Días de Campo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GASTOS GENERALES y de ADMINISTRACIÓN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Consumos Básicos (Luz, Agua, Teléfono, Gas)	28.080	0	28.080	7.190	28.080	0	28.080	517.259	28.080	44.543	28.080	21.249	0	0
Fotocopias	6.240	0	6.240	0	6.240	0	6.240	9.896	6.240	12.393	6.240	7.038	0	0
Materiales de Oficina	31.200	0	10.400	1.700	83.200	0	10.400	43.016	31.200	20.887	10.400	20.600	0	0
Mantenimiento de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMPREVISTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imprevistos del Proyecto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTALES	1.384.635	23.300	661.835	97.190	5.895.238	204.435	377.956	2.284.916	1.218.236	1.847.958	1.215.888	2.194.116	2.194.116	2.194.116

GASTOS PROGRAMADOS /REAL SOBRE APORTES FIA

GASTO PROGRAMADO	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real
	Jul-02	Jul-02	Ago-02	Ago-02	Sep-02	Sep-02	Oct-02	Oct-02	Nov-02	Nov-02	Dic-02	Dic-02
RECURSOS HUMANOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profesionales	458 058	2.875.259	458 058	575 051	458 058	511.597	458 058	511.597	458 058	511.597	458 058	511.597
Técnicos	350 378	350 378	350 378	350 378	350 378	350 378	350 378	350 378	350 378	350 378	700 755	700 755
Constructores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Administrativos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAQUINARIAS Y EQUIPOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adquisición de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valorización de Uso de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos Computacionales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Infraestructura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOVILIZACIÓN, VIÁTICOS Y COMBUSTIBLES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vícticos Nacionales o Alojamiento y Comida	0	103 800	0	0	0	0	0	0	0	55 200	0	50 600
Vícticos Internacionales o Alojamiento y Comida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasajes	0	36.100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Combustibles	46 800	27 500	46 800	19 125	46 800	249 179	46 800	211 888	46 800	79 744	46 800	49 737
Papeles	0	5 600	0	0	0	0	0	3 200	0	25 200	0	11 200
MATERIALES Y SUMINISTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herramientas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insumos de Laboratorio	0	0	0	8 850	0	0	0	0	0	31 152	0	0
Materiales Varios	0	12 750	0	865 766	0	2 224	0	0	0	22 774	0	976
SERVICIOS DE TERCEROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Análisis de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACTIVIDAD DE CAPACITACIÓN O TALLERES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Días de Campo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GASTOS GENERALES y de ADMINISTRACIÓN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Consumos Básicos (Luz, Agua, Teléfono, Gas)	28 080	23 169	28 080	105 892	28 080	54 166	28 080	4 429	28 080	98 058	28 080	5 408
Fotocopias	6 240	11 875	6 240	3 225	6 240	12 000	6 240	1 500	6 240	19 725	6 240	3 250
Materiales de Oficina	31 200	25 420	10 400	16 770	31 200	6 120	10 400	23 851	135 200	3 350	10 400	15 702
Mantenimiento de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMPREVISTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imprevistos del Proyecto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTALES	828.758	3.471.647	888.968	1.947.051	878.758	1.188.644	838.958	1.104.842	1.824.758	1.128.178	1.250.332	1.348.226

GASTOS PROGRAMADOS /REAL SOBRE APORTES FIA

GASTO PROGRAMADO	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real
	Ene-03	Ene-03	Feb-03	Feb-03	Mar-03	Mar-03	Abr-03	Abr-03	May-03	May-03	Jun-03	Jun-03
RECURSOS HUMANOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profesionales	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675	475 675
Técnicos	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854	363 854
Constructores	133 000	0	133 000	0	133 000	0	133 000	0	133 000	0	133 000	0
Administrativos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAQUINARIAS Y EQUIPOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adquisición de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valorización de Uso de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos Computacionales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Infraestructura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOVILIZACIÓN, VIÁTICOS Y COMBUSTIBLES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vícticos Nacionales o Alojamiento y Comida	616 240	28 000	0	18 400	0	207 600	0	219 120	0	64 600	0	64 600
Vícticos Internacionales o Alojamiento y Comida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasajes	0	0	0	0	0	6 800	0	0	0	0	0	60 700
Combustibles	178 200	14 040	48 600	16 120	48 600	113 724	48 600	143 913	48 600	93 066	48 600	10 000
Papeles	4 860	0	0	0	0	0	0	0	0	3 000	0	6 000
MATERIALES Y SUMINISTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herramientas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insumos de Laboratorio	1 097 084	59 598	0	393 314	0	80 889	0	0	0	911 006	0	3 868 472
Materiales Varios	1 377 000	0	0	0	3 442 500	3 459	0	2 158 406	0	50 363	0	23 340
SERVICIOS DE TERCEROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Análisis de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	608
ACTIVIDAD DE CAPACITACIÓN O TALLERES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Días de Campo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GASTOS GENERALES y de ADMINISTRACIÓN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Consumos Básicos (Luz, Agua, Teléfono, Gas)	29 160	4 619	29 160	6 872	29 160	5 127	29 160	16 043	29 160	44 163	29 160	8 315
Fotocopias	6 480	0	6 480	0	6 480	0	6 480	650	6 480	11 895	6 480	19 695
Materiales de Oficina	32 400	13 726	10 800	0	86 400	4 000	10 800	34 610	32 400	30 774	10 800	17 138
Mantenimiento de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMPREVISTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imprevistos del Proyecto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTALES	4 512,952	948,512	1,887,563	1,274,239	4,585,869	1,283,878	1,087,869	3,612,271	1,889,189	2,948,298	1,887,869	6,913,387

GASTOS PROGRAMADOS /REAL SOBRE APORTES FIA

GASTO PROGRAMADO	Programado	Real										
	Jul-03	Jul-03	Ago-03	Ago-03	Sep-03	Sep-03	Oct-03	Oct-03	Nov-03	Nov-03	Dic-03	Dic-03
RECURSOS HUMANOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profesionales	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	475.675	465.675
Técnicos	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	363.854	727.708
Consultores	133.000	0	133.000	1.062.254	133.000	0	133.000	0	133.000	405.000	4.254	0
Administrativos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAQUINARIAS y EQUIPOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adquisición de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valorización de Uso de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos Computacionales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Infraestructura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOVILIZACIÓN, VIÁTICOS Y COMBUSTIBLES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Viajeros Nacionales o Alojamiento y Comida	1.678.000	320.800	75.600	215.600	0	46.700	0	73.480	378.000	558.400	0	465.100
Viajeros Internacionales o Alojamiento y Comida	0	0	0	0	0	2.004.738	1.638.000	0	0	0	0	0
Pasajes	500.000	31.300	0	1.232.356	0	0	1.246.000	243.212	0	493.642	0	17.790
Combustibles	178.200	165.482	48.600	39.700	48.600	33.227	48.600	48.685	48.600	110.472	48.600	10.519
Pelejes	4.840	3.000	0	0	0	3.000	0	0	0	9.000	0	12.000
MATERIALES y SUMINISTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herramientas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Instrumentos de Laboratorio	0	412.329	0	251.916	0	0	0	312.600	0	34.875	0	872.398
Materiales Yarios	3.442.500	686	0	4.399	1.000.000	0	0	188.848	0	851	0	0
SERVICIOS DE TERCEROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Análisis de Laboratorio	801.600	0	0	0	0	21.984	0	0	0	339.000	0	0
ACTIVIDAD DE CAPACITACIÓN O TALLERES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Días de Campo	0	0	0	0	0	0	33.000	33.000	53.000	0	0	53.000
GASTOS GENERALES y de ADMINISTRACIÓN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Consumos Básicos (Luz, Agua, Teléfono, Gas)	29.160	20.845	29.160	50.197	29.160	9.987	29.160	7.491	29.160	8.323	29.160	22.673
Fotocopias	6.480	3.050	6.480	42.660	6.480	3.700	6.480	48.570	6.480	15.900	6.480	6.245
Materiales de Oficina	32.400	24.242	10.800	128.835	32.400	37.298	10.800	4.599	140.400	4.575	10.800	27.350
Mantenimiento de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMPREVISTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imprevistos del Proyecto	0	0	0	0	18.563	0	65.097	0	65.097	0	65.092	0
TOTALES	7.846.729	1.821.413	1.143.189	3.967.446	2.187.722	3.004.143	2.051.868	1.796.614	1.833.288	2.318.847	1.387.769	2.689.458

GASTOS PROGRAMADOS /REAL SOBRE APORTES FIA

GASTO PROGRAMADO	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real	Programado	Real
	Ene-04	Ene-04	Feb-04	Feb-04	Mar-04	Mar-04	Abr-04	Abr-04	May-04	May-04	Jun-04	Jun-04
RECURSOS HUMANOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Profesionales	493.293	0	493.293	493.293	493.293	794.394	493.293	589.389	493.293	589.389	493.293	493.293
Técnicos	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330
Consultores	617.746	0	84.000	0	0	504.000	782.902	84.000	420.000	84.000	0	84.000
Administrativos	0	0	0	0	166.500	0	166.500	0	166.500	148.950	166.500	0
MAQUINARIAS y EQUIPOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adquisición de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valorización de Uso de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos Computacionales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Infraestructura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOVILIZACIÓN, VIÁTICOS Y COMBUSTIBLES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Viajeros Nacionales o Alojamiento y Comida	156.800	0	0	0	0	44.900	0	232.360	0	41.120	0	18.400
Viajeros Internacionales o Alojamiento y Comida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasajes	0	0	0	0	0	12.940	0	41.260	716.800	0	0	0
Combustibles	50.400	0	50.400	0	50.400	421.315	50.400	10.200	50.400	52.000	50.400	62.590
Pelejes	0	0	0	0	0	6.000	0	7.200	0	5.400	0	9.000
MATERIALES y SUMINISTROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herramientas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Instrumentos de Laboratorio	673.030	457.666	0	807.865	0	404.747	0	97.023	0	41.624	0	170.693
Materiales Yarios	0	1.440	2.380.000	3.350.697	0	1.500	0	7.881	0	7.800	2.380.000	9.621
SERVICIOS DE TERCEROS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Análisis de Laboratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACTIVIDAD DE CAPACITACIÓN O TALLERES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Días de Campo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GASTOS GENERALES y de ADMINISTRACIÓN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Consumos Básicos (Luz, Agua, Teléfono, Gas)	30.240	23.012	30.240	9.643	30.240	0	30.240	10.812	30.240	38.749	30.240	19.203
Fotocopias	6.720	0	6.720	16.724	6.720	2.040	6.720	6.915	6.720	16.740	6.720	700
Materiales de Oficina	33.600	0	11.200	8.286	33.600	77.159	11.200	6.205	33.600	4.865	11.200	2.135
Mantenimiento de Equipos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMPREVISTOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imprevistos del Proyecto	53.510	0	53.510	0	53.510	0	53.510	0	53.510	0	53.510	0
TOTALES	2.482.649	899.448	3.496.833	5.064.838	1.719.993	2.925.227	1.273.193	1.814.678	2.012.393	1.321.967	3.859.198	1.182.985

GASTOS PROGRAMADOS /REAL SOBRE AFORTES FIA

GASTO PROGRAMADO	Programado	Real	Programado	Real	Total	Real	Difer										
	Jul-04	Jul-04	Ago-04	Ago-04	Sep-04	Sep-04	Oct-04	Oct-04	Nov-04	Nov-04	Dic-04	Dic-04	Total	Total	Total	Total	
RECURSOS HUMANOS																	
Profesionales	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	493.293	17.124.310	17.114.310			10.000
Técnicos	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	377.330	754.660	13.139.171	13.139.171			0
Conductores	504.000	0	84.000	520.000	84.000	120.000	84.000		504.000			0	420.000	4.497.000	4.042.126		454.874
Administrativos	166.500	0	166.500	0	166.500	0	166.500		166.500			166.500	1.665.000	145.950			1.519.050
MANTENIMIENTO Y EQUIPOS																	
Adquisición de Equipos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Equipos de Laboratorio		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manutención de Equipos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos Computacionales		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uso de Equipos de Laboratorio		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INFRAESTRUCTURA																	
Uso de Instalaciones		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOBILIZACIÓN, VIÁTICOS Y COMBUSTIBLES																	
Viáticos Autorizados o Almacenamiento y Comida		21.700		44.242	117.600	43.720	117.600	135.200	117.600	14.500		92.800	4.057.840	3.512.342			745.498
Viáticos no autorizados o Alojamiento y Comida		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.630.000	2.004.738			-365.738
Pasajes		0	0	7.100	0	34.000	0	39.410	0	600		460.931	3.130.400	2.930.430			199.970
Combustibles	50.400	13.000	50.400	395.494	77.280	0	77.280	69.444	77.280	45.223	50.400	51.798	2.214.240	2.660.747			-446.507
Peajes		32.000		36.500	9.360	0	9.360	21.400	9.360	1.200		7.500	24.400	187.200			-162.720
ANTERIORES Y SUBMISTROS																	
Juramentos		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.297	0			2.297
Insumos de Laboratorio		187.469		3.408		18.297		2.277.540		120.244			2.391.071	12.997.995			-10.606.924
Materiales Técnicos		38.405		40.605		30.930		2.580.000					205.654	20.891.252			9.959.796
SERVICIOS DE TERCEROS																	
Análisis de Laboratorio		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	600.000	1.039.552			540.552
ACTIVIDAD DE CAPACITACIÓN TALENTO																	
Días de Campo		0	0	0	0	0	150.000	0	0	0	0	684.960	280.040	725.960			366.940
GASTOS GENERALES Y DE ADMINISTRACIÓN																	
Consumo Básico (Luz Agua, Teléfono, Bajas)	38.240	56.424	38.240	22.824	30.240	20.520	30.240	31,487	30.240	3.500	30.240	18.066	1.049.760	1.238.250			-238.490
Ferrocarril	6.720	0	6.720	6.960	6.720	34.080	6.720	55.020	6.720	86.840	6.720	27.620	235.230	474.976			-241.696
Mantención de Oficina	33.200	18.200	11.200	43.864	33.600	8.915	67.200	140.920	145.600	104.120	11.200	137.800	1.263.600	1.059.945			204.555
Mantenimiento de Equipos	572.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	672.000	0			672.000
IMPREVISTOS																	
Imprevistos del Proyecto	53.510	0	5.580	0	0	0	0	0	53.500	0	0	0	647.458	0			647.458
TOTAL	2.307.834	1.237.828	1.238.212	1.838.072	1.388.922	1.814.081	3.903.522	3.638.028	3.378.431	1.262.208	1.207.972	2.506.142	76.816.622	72.056.746			4.759.876

9. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO:

9.1 ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Felmer, R., Muñoz, G., Zúñiga, J., Recabal, M. 2005. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microbiol.* 2005 Jun 15;108(1-2):39-47. (ISI). ANEXO.

Felmer, R., Zúñiga, J., Recabal, M., Chávez, R.. 2005. Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. Artículo aceptado en la revista *Archivos de Medicina Veterinaria* (ISI). ANEXO.

Felmer, R., Zúñiga, J., Recabal, M. 2005. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. Artículo aceptado en la revista *Archivos de Medicina Veterinaria* (ISI). ANEXO.

Felmer, R., Zúñiga, J., Recabal, M. 2003. Use of DNA from milk tank for diagnose and typing of bovine leukosis virus. Proceeding In: *Gene Based Technologies Applied to Improved Animal Health and Production in Developing Countries.* Viena, Austria. 6th-10th October, 2003. pp: 153-154. ANEXO.

Zúñiga, J., Felmer, R., Floody, H., Ståhl, K., Alenius, S. Bulk milk based immunosurveillance for brucellosis, leucosis, BVD and IBR in dairy herds from the south of Chile. *Preventive Veterinary Medicine* (ISI). Artículo en preparación.

Zúñiga, J., Felmer, R., Miranda, H., López, A.. Distribución de brucelosis, leucosis, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina en una muestra de lecherías de la IX Región, a partir del análisis espacial de datos serológicos. *Archivos de Medicina Veterinaria* (ISI). Artículo en preparación.

9.2 PRESENTACIONES ORALES A CONGRESOS NACIONALES O INTERNACIONALES

Felmer, R., Muñoz, G., Zúñiga, J. Floody, H. "Identificación de variantes genéticas del virus de la leucosis bovina en Chile y su relación filogenética con cepas descritas en el mundo". XXIX Reunión Anual de SOCHIPA. Villarrica 13-15 de Octubre 2004. Libro de resúmenes pp 197-198. ANEXO.

Sauterel, C., Felmer, R. Zúñiga, J. "Evaluación de un método per para el diagnóstico diferencial de cepas de campo y vacunales (RB51 y S19) de *Brucella melitensis* biovar abortus". XXIX Reunión Anual de SOCHIPA. Villarrica 13-15 de Octubre 2004. Libro de resúmenes pp 203-204. ANEXO.

Recabal, M., Felmer, R., Zuñiga, J. "Utilizacion de la prueba ELISA y PCR anidado para la deteccion del virus de la leucosis enzootica bovina en muestras de sangre y leche". XXVIII Reunión Anual de SOCHIPA. Talca 15-17 de Octubre 2003. Libro de resúmenes pp 171-172. ANEXO.

Zuñiga, J., Felmer, R., Gaete, N. Floody, H. "Vigilancia de enfermedades infecciosas del bovino basada en el análisis serológico sistemático de la leche del estanque predial". XXIX Reunión Anual de SOCHIPA. Villarrica 13-15 de Octubre 2004. Libro de resúmenes pp 201-202. ANEXO.

9.3 CHARLAS EN SEMINARIOS O CURSOS NACIONALES O INTERNACIONALES.

Felmer, R. "Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico de enfermedades". En Seminario: Sistema de Vigilancia de Enfermedades en el rebaño lechero de la IX región. Carillanca, Jueves 16 de Diciembre de 2004. ANEXO.

Felmer, R. "Partial sequencing of env gene of bovine leukemia virus from Chilean samples and phylogenetic analysis". In: Workshop Knowledge discovery in genomic databases: a PASI on data mining applications for genomics and bioinformatics. Montevideo, Uruguay. 9-20 de Febrero 2004. ANEXO.

Felmer, R. "Utilización de Biotecnología en la Detección de Enfermedades en el Ganado Bovino". Encuentro-Taller de Investigación Científica y Tecnológica en el Sector Silvoagropecuario Nacional, USACH, Santiago. 23-24 de Noviembre 2003. ANEXO.

Zuñiga, J. "Vigilancia de enfermedades bovinas basado en ELISA: Su aplicación en rebaños lecheros de la IX Región". En Seminario: Sistema de Vigilancia de Enfermedades en el rebaño lechero de la IX región. Carillanca, Jueves 16 de Diciembre de 2004. ANEXO.

9.4 PRESENTACIÓN DE POSTERS.

Felmer, R., Zuñiga, J., Recabal, M., Muñoz, G. "Use of DNA from milk tank for diagnose and typing of bovine leukaemia virus". Gene Based Technologies Applied to Improved Animal Health and Production in Developing Countries. Viena, Austria. 6th-10th October, 2003. Poster ANEXO.

Felmer, R., Zuñiga, J. Y Floody H. Detección de anticuerpos a patógenos bovinos en muestras de leche de estanques prediales mediante prueba de ELISA indirecta. CEPAL, Santiago, Junio 2002. ANEXO.

Recabal, M., Felmer, R., Zuñiga, J. "Utilizacion de la prueba ELISA y PCR anidado para la deteccion del virus de la leucosis enzootica bovina en muestras de sangre y leche". Jornadas de Medicina Veterinaria 17 de Noviembre 2004. ANEXO.

9.5 TESIS DE PREGRADO

9.5.1 UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA Y PCR-ANIDADO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE

Objetivo general

Comparar los resultados obtenidos mediante tres técnicas (AGID, ELISA y PCR) en el diagnóstico de VLB en un rebaño lechero de la IX Región con presencia de la enfermedad y hacer una caracterización molecular de algunas de las cepas identificadas en este predio.

Objetivos específicos:

- Determinar el porcentaje de animales positivos y el nivel de concordancia logrados con cada una de las pruebas utilizadas en el estudio con respecto a la prueba AGID.
- Determinar los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA indirecto en muestras de suero y leche de un rebaño lechero con historial clínico de Leucosis y compararlos con los establecidos para la prueba oficial de diagnóstico (AGID).
- Determinar los valores de sensibilidad y especificidad del método PCR anidado en muestras de sangre y leche y compararlos con la prueba (AGID).
- Tipificar mediante PCR-RFLP cepas de VLB provenientes del rebaño en estudio.

Tesis de Grado como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria, de la Universidad Católica de Temuco.

Alumno: Srta. Marcela Elisa Recabal Torres

Profesor Guía: Dr. Ricardo Felmer, Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca.

Profesor Co-guía: Sr. Javier Zúñiga, Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca.

9.5.2 DIAGNÓSTICO DE *BRUCELLA ABORTUS* EN MUESTRAS DE LECHE Y SANGRE MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Objetivo general

Implementar un método rápido de detección directa de *Brucella* en muestras de leche y sangre basado en PCR que pueda ser utilizado como prueba confirmatoria de infección en Bovinos.

Objetivos específicos.

- Evaluar diferentes alternativas de extracción de ADN desde leche y sangre que resulten en una alta eficiencia para la recuperación de ADN del patógeno.
- Implementar la técnica de PCR a partir de cultivos bacterianos para diferenciar cepas vacunales de cepas de campo.
- Evaluar la técnica PCR en muestras biológicas.

Tesis de Grado como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria, de la Universidad Católica de Temuco.

Alumno: Sr. Cristian Julian Sauterel Rodriguez

Profesor Guía: Dr. Ricardo Felmer, Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca.

Profesor Co-guía: Sr. Javier Zúñiga, Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca

9.5.3 ANÁLISIS ESPACIAL DE LA PREVALENCIA DE BRUCELOSIS, LEUCOSIS, DIARREA VIRAL BOVINA Y RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA, EN REBAÑOS LECHEROS DE LA IX REGIÓN

Objetivo general

Realizar una descripción, evaluación y análisis espacial de la presencia de enfermedades transmisibles tales como Brucelosis, Leucosis, IBR, DVB, en una muestra selectiva de rebaños lecheros que cuentan con estanques de enfriamiento en la novena región de la Araucanía.

Objetivos Específicos

- Estimar la seroprevalencia de Brucelosis, Leucosis Enzoótica Bovina, diarrea viral e IBR en lecherías de la IX Región en base al análisis de anticuerpos en los estanques prediales.
- Analizar la distribución espacial de la prevalencia de estas enfermedades mediante sistemas de información geográfica (SIG).

Tesis de Grado como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera.

Alumno: Srta. Ada Elizabeth López Emparan

Profesor Guía: Sr. Horacio Miranda, Universidad de la Frontera.

Profesores Co-guías: Dr. Ricardo Felmer y Javier Zúñiga, Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca.

Nota: Esta tesis se encuentra en fase de redacción por parte de la alumna por lo que no se adjunta en este Informe.

9.6 VISITAS TÉCNICAS

- Visita técnica de 32 estudiantes de Medicina Veterinaria más dos docentes de la Universidad de Concepción. Carillanca, Octubre 2002.
- Visita técnica de 30 estudiantes de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción. Carillanca, Marzo 2003.
- Visita técnica de 8 estudiantes y 1 académicos de Periodismo de la Universidad Diego Portales. Carillanca, Octubre 2003.
- Visita técnica de una delegación de 30 estudiantes de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción, campus Chillán y 2 Académicos. Carillanca, Marzo 2004.

- Visita técnica de 30 alumnos del Liceo Agrícola de Chol/Chol y 4 profesores. Carillanca, Agosto 2004.
- Reunión técnica con personal directivo de UNICAL, Septiembre 2004.
- Reunión técnica con personal del SAG, Temuco IX Región. Diciembre 2004.

9.7 ARTÍCULOS DIVULGATIVOS.

“Rebaños sanos: Clave para un mejor futuro”. Campo Sureño, Temuco, 24 de Junio de 2002. pp 10-12.

“Sanidad Animal”, Artículo Divulgativo Edición Especial Aniversario, Revista del Campo Sureño, 31 Mayo 2004. pp18.

“Establecen sistema de vigilancia para enfermedades bovinas”. Campo Sureño, N° 1012. Temuco, 17 de Diciembre de 2004.

10. 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.

El análisis de impactos logrados se remite a lo solicitado en carta UP-N° 0492.

a) Número de unidades de negocio que puedan haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios relacionados a la tecnología desarrollada (monitoreo, diagnóstico y/o control de enfermedades).

La unidad ejecutora inició la creación de una unidad de negocios que tendrá por objetivo la venta de servicios relacionados al monitoreo, diagnóstico y control de enfermedades infecciosas en bovinos de leche, empleando para ello las tecnologías y competencias adquiridas gracias a la ejecución del proyecto. No se conocen iniciativas similares iniciadas en la región como efecto de la realización del proyecto.

b) Antecedentes completos y detallados del número y tipo de usuarios que solicitó, solicita y solicitará los servicios y/o productos de diagnóstico generados.

Debido a que la oferta de servicios de monitoreo, diagnóstico y/o control aún no se oficializa, en este análisis se entiende por usuario a personas naturales o jurídicas que consultaron por la disponibilidad de servicios específicos y que tenían la clara intención de contratarlos para resolver un problema sanitario que los afectaba. Se excluyen los beneficiarios del proyecto, los que recibieron servicios de monitoreo (317 lecherías), diagnóstico (40 lecherías) y control total o parcial (3 lecherías). Las estimaciones de solicitud futura de servicios específicos se incluyen en el Capítulo 6, Fichas Técnicas y Análisis Económico, de este informe.

Servicio	Tipo usuario	Solicitudes	Análisis/año
Monitoreo	Planta Lechera	1	450
	Productor	2	30
Diagnóstico	Productor	3	4200

Servicio	Tipo usuario	Solicitudes	Programas/año
Control	Productor	3	3

c) Ventas y/o ingresos anuales en pesos que puedan haberse generado con la entrega de los servicios y/o productos de diagnóstico, monitoreo y/o control de enfermedades.

Considerando precios de venta estimados de acuerdo a análisis de costos especificados en Capítulo 6, Fichas Técnicas y Análisis Económico de este informe, las ventas anuales por concepto de los servicios de monitoreo y diagnóstico demandados (Punto 2) se habrían elevado a \$9.884.160 y \$378.750 por concepto de control.

d) Nuevas capacidades y/o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas (número de tesis o residentes, nivel o grado).

El proyecto permitió establecer en la unidad ejecutora, un equipo profesional de diagnóstico serológico y molecular que cuenta con la participación de dos bioquímicos y un químico laboratorista. Este equipo posee capacidades tanto en la ejecución de técnicas de diagnóstico serológico y molecular, como en la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico, especialmente de aquellas basadas en análisis moleculares. La calidad de las investigaciones desarrolladas generó oportunidades de formación de pregrado para 3 alumnos de medicina veterinaria, quienes en su calidad de tesis llevaron adelante temas relacionados al diagnóstico serológico y molecular y al monitoreo de enfermedades de alto impacto en la producción lechera de la región. Para detalles referirse al Capítulo 9 Difusión de los Resultados del Proyecto.

e) Nuevos empleos generados por efecto del proyecto y tiempos de dedicación (JH).

Durante la ejecución del proyecto se contrató al Sr. Horacio Floody Armstrong, Químico Laboratorista, a jornada completa para desempeñarse en actividades de laboratorio y terreno. Finalizado el proyecto esta persona pasó a formar parte de la planta de personal de Laboratorios de la Unidad de Biotecnología de INIA Carillanca.

f) Número de publicaciones científicas aceptadas y publicadas y ranking de la revista correspondiente (por ejemplo ISI).

Se publicaron los siguientes artículos:

R. Felmer, G. Muñoz, J. Zúñiga, M. Recabal. 2005. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microbiol.* 2005 Jun 15;108(1-2):39-47. (Índice ISI 1.5)

R. Felmer, J. Zúñiga, M. Recabal, R. Chávez. 2005. Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. Artículo aceptado en la revista *Archivos de Medicina Veterinaria* (Índice ISI 0.05)

R. Felmer, J. Zúñiga, M. Recabal. 2005. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. Artículo aceptado en la revista *Archivos de Medicina Veterinaria* (Índice ISI 0.05)

g) Número y tipo de eventuales patentes generadas.

No se generaron patentes.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- a) El proyecto satisfizo los objetivos planteados originalmente y tal como se explicó anteriormente, durante el desarrollo se vio la necesidad de incorporar otras herramientas para el diagnóstico de las enfermedades como son las técnicas de identificación molecular (PCR, RT-PCR), debido a que se complementan con los métodos serológicos como el ELISA.
- b) Es necesario que la Institución apoye decididamente esta línea de trabajo, para asegurar que la base tecnológica que se ha implementado, pueda proyectarse a resolver los problemas en salud animal que aquejan a los productores de la Región.
- c) Es importante destacar la relevancia de los resultados del proyecto y las proyecciones que estos tienen, en relación a la continuidad de las actividades más allá del cierre de este proyecto. Por esto mismo, es necesario destacar la necesidad de que las fuentes de financiamiento, tales como el FIA, puedan incorporar mecanismos de apoyo a proyectos de investigación estratégicos de largo plazo, para asegurar que los resultados generados de iniciativas como estas tengan finalmente una incorporación efectiva en el sector productivo del país.

12. OTROS ASPECTOS DE INTERES

Es importante destacar el acercamiento realizado durante este proyecto con productores, veterinarios de terreno, agentes público y privados e investigadores de las Universidades, todo lo cual ha permitido desarrollar una base sólida para trabajar en el tema de salud animal en la Región. A esto se suma el acercamiento y los contactos realizados fuera del país, lo que ha permitido, entre otras cosas, materializar la realización de trabajos en colaboración como los que se han iniciado recientemente con la Universidad de Ciencias Agropecuarias (SLU) de Suecia, para estudiar aspectos genéticos y moleculares relacionados al virus de la Diarrea viral bovina (VDB). Sin duda todo este esfuerzo, permitirá proyectar esta línea de investigación más allá del término de este proyecto.

P13. ANEXOS

Anexo

Artículo Original enviado a Archivos de Medicina Veterinaria

Artículos originales

Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche.

Comparative study of a nested PCR, ELISA and AGID tests in the detection of bovine leukaemia virus infection in serum, blood and milk samples.

R. FELMER, B.Q., PhD.; J. ZÚÑIGA, B.Q.; M. RECABAL, M.V.

Unidad de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Carillanca. Casilla 58-D Temuco, Chile. E-mail: rfelmer@carillanca.inia.cl

SUMMARY

Different methods available for the detection of bovine leukaemia virus (BLV) infection were evaluated. The assessed methods were AGID in serum, ELISA in serum and milk, and PCR in blood lymphocytes. AGID test identified a smaller number of positive animals (75/126) compared to PCR and ELISA tests (100/126). Three positive animals by AGID were negative by PCR and 28 of the 51 negative samples by AGID were positive by PCR. The sensitivity of PCR with respect to AGID was 96%, whereas the specificity was 45% (*kappa* 0.45). All positive animals by AGID were also positive by ELISA in serum and milk samples, whereas 25 negative animals by AGID were considered positive by the ELISA test, in both biological samples. Thus, sensitivity of the ELISA with respect to AGID was 100%, whereas specificity was 51% (*kappa* 0.55). The smaller sensitivity of AGID is not due to false positive reactions of ELISA and PCR tests, but rather to a greater sensitivity of these, which suggests a revision of AGID in those countries in which it is still used as the official method in the eradication programs of leucosis.

Palabras claves: ganado, leucosis, ELISA, PCR.

Key words: cattle, leukaemia, ELISA, PCR.

INTRODUCCIÓN

La leucosis enzoótica bovina es una neoplasia linfoproliferativa maligna, causada por el virus de la leucosis bovina (VLB), un retrovirus de la familia Retroviridae (Van Regenmortel y col., 2000). La principal característica de esta enfermedad es una fuerte respuesta inmunológica que deja una huella de anticuerpos durante toda la vida del animal (Burny y col., 1988). La forma adulta de la enfermedad se manifiesta con curso clínico lento, desarrollando un período de incubación de 1 a 5 años por lo que afecta fundamentalmente a los animales mayores de 2 años de edad (Johnson y col., 1985). El ganado infectado puede permanecer clínicamente asintomático durante toda su vida y sólo un 30% desarrolla linfocitosis persistente (LP), la que se caracteriza por una expansión policlonal de linfocitos B infectados. A su vez, un porcentaje incluso menor de animales (0,1-10%), eventualmente desarrolla tumores linfoides, la forma clínica fatal de esta enfermedad (Burny y col., 1985).

La infección por VLB estimula una fuerte reacción inmune humoral en contra de las principales proteínas virales gp51 y p24 que constituyen la base para la detección mediante pruebas serológicas (Portetelle y col., 1989). Dentro de estas, la inmunodifusión en gel de agar (AGID) ha sido la prueba oficial para la detección de anticuerpos contra VLB en los últimos 30 años. Recientemente, se han desarrollado y evaluado una serie de métodos enzimoimmuno ensayos (ELISA), algunos de los cuales son actualmente reconocidos como métodos oficiales en EEUU, Canadá y otros países (Simard y col., 2000). Sin embargo, independiente del método serológico empleado, la principal desventaja de estas pruebas es su incapacidad para discriminar anticuerpos maternos pasivos de una infección activa, los que pueden persistir durante los primeros 6 meses de vida del animal (Burridge y col., 1982). Además, estos métodos no proporcionan evidencia de la infección en su etapa temprana, esto es antes de la seroconversión, que para esta enfermedad en particular puede tardar hasta 14 semanas en presentarse (Dinter, 1989). En cambio, las pruebas de detección directa, como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), permiten un diagnóstico confiable en las etapas iniciales de la enfermedad y se pueden aplicar a la detección del virus en animales menores de 6 meses, evitando así reacciones falso positivas, causadas por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes, los que no desarrollan una respuesta inmune normal (Fechner y col., 1996).

Aunque con algunas discrepancias, diversos autores han demostrado una menor sensibilidad de AGID respecto de las pruebas diagnósticas ELISA y PCR (Eaves y col., 1994; Fechner y col., 1996; Trono y col., 2001). Dado que diversos factores pueden afectar la concordancia entre estas pruebas como: la secuencia elegida como blanco para la amplificación y el método para purificar ADN en la PCR, el antígeno utilizado en los métodos serológicos o las características de la población animal en estudio, entre otros, el objetivo de este estudio fue comparar el método AGID que se utiliza en Chile frente a un ELISA indirecto comercial en muestras de suero y leche, y una prueba PCR anidado en linfocitos sanguíneos para la detección de la infección por el VLB.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de las muestras biológicas y procesamiento. Muestras de leche, sangre y suero fueron recolectadas desde 126 animales de un predio de la Comuna de Freire, Temuco. Las muestras de leche (60 ml) se obtuvieron por ordeña manual en frascos conteniendo bicromato de

potasio (0.1% p/v) como preservante. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutainer de 7 ml usando EDTA-potásico (1.5 mg/ml de sangre) como anticoagulante, mientras que las muestras de suero se recolectaron en tubos Vacutainer de 10 ml sin anticoagulante. Las muestras de leche fueron descremadas mediante centrifugación por 10 minutos a 3.500 r.p.m. y la fracción clarificada se conservó a -20°C para su posterior análisis en nuestro laboratorio mediante ELISA, mientras que la fracción de células somáticas se utilizó para la extracción de ADN.

Aislamiento de ADN. El pellet de células somáticas correspondiente a 60 ml de leche, se utilizó para la extracción de ADN de acuerdo a un protocolo estándar que consistió en una lisis celular (Tris-HCl, 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM, Proteinasa K 1 mg/ml y SDS 1%) e incubación a 55°C durante toda la noche. Los restos celulares se precipitaron y separaron mediante la adición de NaCl 5 M y centrifugación a máxima velocidad por 10 minutos. El ADN se recuperó finalmente de la fase acuosa mediante precipitación con etanol y se resuspendió en tampón T.E. Para las muestras de sangre se utilizó un procedimiento similar adicionando una etapa preliminar de hemólisis de los eritrocitos con una solución de NH_4Cl al 0.85%.

Diagnóstico serológico. La detección de anticuerpos a VLB en las muestras de leche y suero se realizó mediante la técnica de inmunoenzimo ensayo indirecto (ELISA-i) empleando un kit comercial (SVANOVA, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector ELISA (Labsystems, Multiskan EX) a 450 nm y utilizando para la interpretación de los resultados una relación de densidad óptica corregida (DO muestra/DO control positivo) igual o superior a 6%. Una alícuota de las muestras de suero fueron también enviadas a un laboratorio externo acreditado, para su análisis mediante el método oficial de AGID.

Diagnóstico viral mediante PCR. El virus se detectó directamente desde ADN purificado de la fracción de leucocitos de leche y sangre mediante un PCR anidado empleando dos pares de partidores correspondientes a una región altamente conservada del gen *env* viral (Beier y col., 2001). La primera reacción se realizó en un volumen final de 30 μl conteniendo 20-100 ng de ADN, 0.2 μM de cada partidor, 75 μM dNTP, 3 μl de tampón PCR 10X, (Promega), 1.5 mM MgCl_2 y 0.75 U de Taq DNA Polimerasa. En la segunda reacción se utilizó como templado 3 μl del producto de la primera amplificación. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) y los perfiles térmicos incluyeron una etapa de denaturación inicial a $94^{\circ}\text{C}/5$ minutos, seguido por 40 ciclos de: $94^{\circ}\text{C}/30$ segundos, $57^{\circ}\text{C}/30$ segundos y $72^{\circ}\text{C}/1$ minuto, para terminar con una extensión final a $72^{\circ}\text{C}/5$ minutos. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas, excepto que la temperatura de annealing se aumentó a 68°C .

Análisis estadístico. Para determinar los parámetros de sensibilidad, especificidad y concordancia (valor *kappa*) se utilizaron tablas de contingencia (2x2) empleando el programa computacional Win Episcope 2.0. Todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

La prueba AGID identificó un menor número de animales positivos que las pruebas de PCR en sangre, ELISA en suero y ELISA en leche (Figura 1). De 126 animales analizados, AGID detectó 75 animales positivos, lo que equivale al 60% del total. Por otro lado, PCR detectó un 25% más de positivos que AGID (100/126). Tres animales positivos a AGID fueron negativos según la prueba PCR en sangre y 28 de las 51 muestras negativas a AGID fueron positivas a PCR (Tabla 1). La concordancia porcentual obtenida entre ambas pruebas fue de 75% mientras que el valor estadístico *kappa* fue de 0.45, considerándose moderado. La sensibilidad diagnóstica de PCR con respecto a AGID fue de 96% mientras que la especificidad fue de 45%.

El método ELISA, aplicado tanto en suero como en leche, permitió detectar un total de 100 animales positivos (80%), lo que equivale a un 25% más de animales positivos que la prueba AGID (Tabla 2). Todos los animales positivos a AGID fueron también positivos a ELISA aplicado tanto en suero como en leche, mientras que 25 animales negativos a AGID fueron consignados como positivos a ELISA, en ambas muestras biológicas. De esta forma, la concordancia entre ambas pruebas fue de 80% con un valor *kappa* de 0.55 y los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron 100 y 51%, respectivamente.

El mismo análisis se realizó considerando a la prueba PCR en sangre como el método de referencia y comparando a los métodos AGID, ELISA en suero y ELISA en leche (Tabla 3). En este caso, el valor *kappa* de 0.86 indica una buena concordancia entre PCR y ELISA (tanto en suero como en leche), manteniéndose la concordancia descrita en la Tabla 1 para PCR y AGID.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el uso de un método de PCR anidado como prueba directa y los métodos AGID y ELISA como pruebas indirectas para la detección de VLB en un rebaño lechero con alta prevalencia de la infección. De acuerdo a nuestros resultados, el PCR en sangre y el ELISA en suero y leche detectaron un mayor número de animales positivos (25%) que AGID. Todas las muestras negativas a ELISA, tanto en suero como en leche, fueron también negativas a AGID. Sin embargo, 3 muestras negativas a PCR fueron positivas a AGID y ELISA, situación que se podría explicar por la ausencia de VLB en linfocitos sanguíneos (Eaves y col., 1994), una infección restringida a órganos linfoides (Klintevall y col., 1994) o las variaciones de la secuencia nucleotídica de algunos aislados del virus, que podrían inducir a errores en la hibridación de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, disminuyendo consecuentemente la sensibilidad del PCR (Marsolais y col., 1994; Fechner y col., 1997). Finalmente, no podemos descartar que, a pesar de haber utilizado una etapa de hemólisis y lavado de eritrocitos, persistan trazas de inhibidores que afecten la sensibilidad del PCR (Panaccio y Lew 1991).

En forma interesante, la prueba de PCR en sangre identificó 3 muestras positivas, que sin embargo fueron negativas en las pruebas serológicas empleadas, sugiriendo la presencia de animales inmunotolerantes o con baja respuesta inmunológica a VLB en el rebaño analizado. Para clarificar esta situación, se re-muestrearon estos animales al año siguiente y se repitieron los análisis con las pruebas de ELISA en suero y PCR en sangre. Lamentablemente, uno de los animales había sido eliminado del predio, sin embargo los otros 2 aún permanecían por lo que fue posible repetir el análisis. El resultado de ambas muestras (datos no mostrados) fue similar al obtenido durante el primer análisis, es decir, ELISA confirmó el valor negativo obtenido anteriormente mientras que PCR confirmó el resultado positivo en ambos animales. Este resultado confirma los hallazgos realizados previamente por algunos autores (Fechner y col.,

1997) quienes habían sugerido la presencia de animales inmunotolerantes a VLB, observación que es siempre cuestionada al argumentarse que se debería a una mayor sensibilidad del PCR, lo que permitiría detectar animales infectados antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica o que se debería simplemente a una baja carga de exposición del virus (Kaaden y col., 1982). De esta forma, estos resultados resaltan la importancia de incorporar en los programas de control y erradicación de VLB, un diagnóstico complementario del virus con alguna técnica directa como puede ser PCR.

Cuando las pruebas de ELISA en suero, ELISA en leche y PCR en sangre fueron comparadas con respecto a AGID, el método oficial en Chile para el diagnóstico serológico de VLB, la especificidad diagnóstica obtenida fue baja (51, 51 y 45%, respectivamente). Sin embargo, esta situación no se debe a reacciones falso positivas de estas pruebas sino más probablemente a la mayor sensibilidad de las mismas respecto a AGID (Eaves y col., 1994). De la misma forma, la concordancia de las distintas pruebas empleadas, medida por el valor *kappa*, se puede considerar como regular cuando AGID se utilizó como referencia. Estos resultados contrastan cuando se utiliza el PCR como método de referencia, ya que en este caso se obtuvo una buena concordancia de esta técnica con ELISA, con un valor *kappa* entre ambas pruebas de 0.86.

Nuestros resultados se comparan favorablemente con los resultados obtenidos por Fechner y col., (1996) y más recientemente Trono y col., (2001) quienes detectaron un total de 17.7 y 24.8% más de animales positivos al comparar un método de PCR con AGID, respectivamente. Sin embargo, contrastan con lo obtenido por Nagy y col. (2003) quienes determinaron una sensibilidad del PCR respecto a ELISA de sólo un 67%, a diferencia de nuestros resultados donde PCR fue muy similar en su capacidad para detectar animales positivos que el ELISA empleado (sensibilidad de 97%). En nuestro caso, el mejor resultado que se obtuvo con PCR se debería fundamentalmente a la adición, durante el proceso de extracción de ADN, de una etapa de hemólisis de los eritrocitos con NH_4Cl , ya que está descrito el efecto inhibitorio de residuos de hemoglobina sobre la Taq polimerasa (Panaccio y Lew 1991). Además, el PCR desarrollado por nosotros correspondió a un PCR anidado lo cual aumenta la sensibilidad y especificidad del método. Otro factor importante y que puede afectar la correlación de ambas técnicas tiene que ver con el recuento de linfocitos y la carga de linfocitos infectados de los animales, aunque este dato se desconoce en cada uno de los estudios realizados.

Una de las ventajas del PCR es su capacidad para detectar el virus en terneros infectados que recibieron calostro desde madres seropositivas. Además, mediante PCR se pueden determinar infecciones recientes, entre 2-4 semanas más temprano que mediante AGID (Naif y col., 1992; Kelly y col., 1993) y puede constituir por tanto un gran aporte en los programas de erradicación, especialmente en aquellos rebaños con una baja prevalencia de animales infectados.

La prueba AGID en suero o el ELISA en suero o leche han sido reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) para el diagnóstico de VLB (OIE, 2001). Debido a la simplicidad y sus ventajas prácticas y económicas, la prueba AGID ha tenido una rápida incorporación como método de diagnóstico oficial en muchos países. Sin embargo, la baja sensibilidad demostrada por nosotros y otros autores, sumado a la aparición de mejores herramientas de diagnóstico de la enfermedad, que permiten alcanzar mayores niveles de sensibilidad y especificidad, debieran hacer reconsiderar la utilización de esta prueba como método de diagnóstico oficial.

CONCLUSIÓN

Aunque la decisión de qué prueba utilizar para el diagnóstico de VLB va a depender finalmente de factores tanto técnicos como económicos, la principal conclusión es que el uso de ELISA o PCR en lugar de AGID, permite detectar un mayor número de animales infectados por VLB. Además, dada la probabilidad de encontrar animales inmunotolerantes, se recomienda utilizar una combinación de ELISA y PCR cuando el objetivo es erradicar la infección de un rebaño.

RESUMEN

Se evaluaron distintos métodos actualmente disponibles para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina (VLB). Los métodos empleados fueron AGID en suero, ELISA en muestras de suero y leche y PCR en linfocitos sanguíneos. De un total de 126 animales analizados, AGID identificó un menor número de animales positivos (75) comparado con las pruebas PCR y ELISA aplicadas en muestras de suero y leche (100). Tres animales positivos a AGID fueron negativos a PCR y 28 de las 51 muestras negativas a AGID fueron positivas mediante PCR. La sensibilidad diagnóstica de PCR con respecto a AGID fue de 96% mientras que la especificidad fue de 45% ($kappa$ 0.45). Todos los animales positivos a AGID fueron también positivos a ELISA aplicado tanto en suero como en leche, mientras que 25 animales negativos a AGID fueron consignados como positivos a ELISA, en ambas muestras biológicas. De esta forma, la sensibilidad diagnóstica de ELISA respecto a AGID fue de un 100% mientras que la especificidad fue de 51% ($kappa$ 0.55). La menor sensibilidad observada de AGID, no es debido a reacciones falso positivas de ELISA y PCR, sino más bien a una mayor sensibilidad de estas últimas, lo que sugiere reconsiderar la utilización del método AGID en aquellos países en que aún se utiliza como método oficial en los programas de erradicación de leucosis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Programa de Biotecnología, Ministerio de Agricultura, Chile (Proyecto BID-PI-C-2001-1- P-035). Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por Horacio Floody y agradecen además, la colaboración anónima y desinteresada del productor de la IX Región que facilitó el muestreo de sus animales.

BIBLIOGRAFÍA

BEIER, D., P. BLANKENSTEIN, O. MARQUARDT, J. KUZMAK. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 114: 252-256.

BURNY, A., C. BRUCK, Y. CLEUTER, D. COUEZ, J. DESCHAMPS, D. GREGOIRE, J. GHYSDAEL, R. KETTMANN, M. MAMMERICKX, G. MARBAIX. 1985. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52: 133-44.

BURNY, A., Y. CLEUTER, R. KETTMANN, M. MAMMERICKX, G. MARBAIX, D. PORTETELLE, A. VAN DEN BROEKE, L. WILLEMS, R. THOMAS. 1988. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet. Microbiol.* 17: 197-218.

BURRIDGE, M., M. THURMOND, J. MILLER, M. SCHMERR, M. VAN DER MAATEN. 1982. Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am. J. Vet. Res.* 10: 1866-7.

DINTER, Z. 1989. Enzootic bovine leukosis, diagnostic virology. In: A review of methods at the National Veterinary Institute, ed. Moreno-Lopez J, pp. 115-122. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.

EAVES, F., J. MOLLOY, C. DIMMOCK, L. EAVES. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.* 39: 313-21.

FECHNER, H., A. KURG, L. GEUE, P. BLANKENSTEIN, G. MEWES, D. EBNER, D. BEIER. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 10: 621-30.

FECHNER, H., P. BLANKENSTEIN, A. LOOMAN, J. ELWERT, L. GEUE, C. ALBRECHT, A. KURG, D. BEIER, O. MARQUARDT, D. EBNER. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 237: 261-9.

JOHNSON, R., C. GIBSON, J. KANEENE. 1985. Bovine leukaemia virus: a herd-based control strategy. *Prev. Vet. Med.* 3: 339-34.

KAADEN, O., S. LANGE, W. ROMANOWSKI, H. MARRE, J. PFEILSTICKER, R. ROSELIUS. 1982. Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. *Zentralbl Veterinarmed B.* 29: 269-74.

KELLY, E., M. JACKSON, G. MARSOLAIS, J. MORREY, R. CALLAN. 1993. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 54: 205-9.

KLINTEVALL, K., A. BALLAGI-PORDANY, K. NASLUND, S. BELAK. 1994. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* 3: 191-204.

MARSOLAIS, G., R. DUBUC, J. BERGERON, J. MORREY, E. KELLY, M. JACKSON. 1994. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 297-301.

NAGY, D., J. TYLER, S. KLEIBOEKER, A. STOKER. 2003. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1: 983-5.

NAIF, H., R. DANIEL, W. COUGLE, M. LAVIN. 1992. Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 30: 675-9.

OIE, ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. 2001. Manual of standards diagnostic tests and vaccines 2000, pp. 1-18.

PANACCIO, M., A. LEW. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res.* 19: 1151.

PORTETELLE, D., D. COUEZ, C. BRUCK, R. KETTMANN, M. MAMMERICKX, M. VAN DER MAATEN, R. BRASSEUR, A. BURNY. 1989. Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH₂ part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology.* 1: 27-33.

SIMARD, C., S. RICHARDSON, P. DIXON, C. BELANGER, P. MAXWELL. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.* 64: 101-6.

TRONO, K., D. PEREZ-FILGUEIRA, S. DUFFY, M. BORCA, C. CARRILLO. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 26: 235-48.

VAN REGENMORTEL, M., C. FAUQUET, D. BISHOP, E. CARSTENS, M. ESTES, S. LEMON, J. MANILOFF, M. MAYO, D. MCGEOCH, C. PRINGLE, D. WICKER. 2000. Family Retroviridae. In: *Virus Taxonomy; Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 369-362.

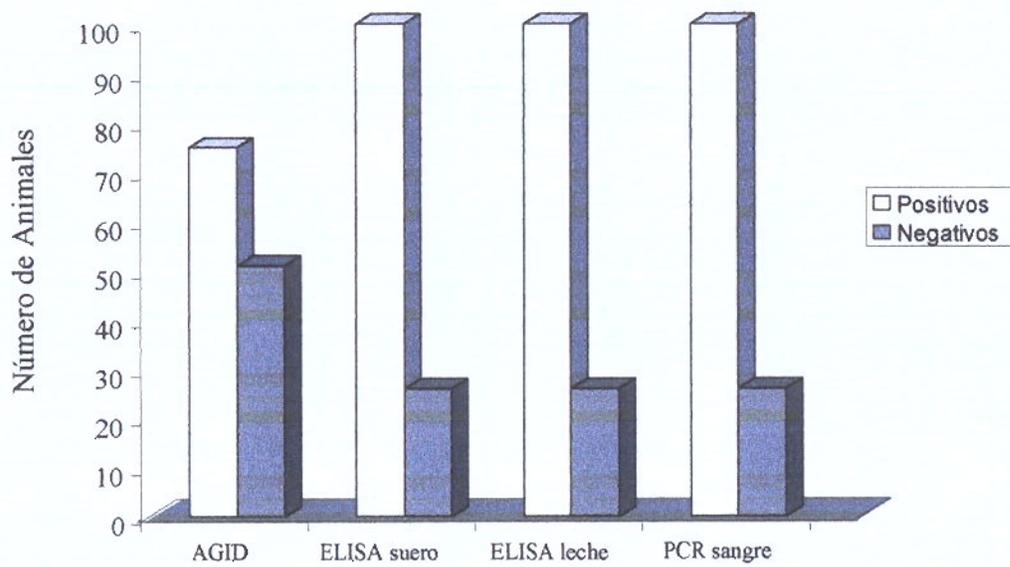


Figura 1. Análisis comparativo de las distintas pruebas analíticas.

Número de animales positivos y negativos identificados con cada una de las pruebas AGID, ELISA suero, ELISA leche y PCR en sangre.

Positive and negative animals identified by the tests AGID, ELISA in serum, ELISA in milk and PCR in blood.

Tabla 1. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del PCR en sangre en relación a AGID.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between PCR and AGID test.

PCR sangre	AGID		
		+	-
+	72	28	100
-	3	23	26
Total	75	51	126
Sensibilidad:		96%	
Especificidad:		45%	
Concordancia: <i>kappa</i>		0.45	

Tabla 2. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del ELISA tanto en suero como en leche en relación a AGID.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between ELISA and AGID test.

ELISA	AGID			
		+	-	Total
+		75	25	100
-		0	26	26
Total		75	51	126
Sensibilidad:		100%		
Especificidad:		51%		
Concordancia: <i>kappa</i>		0.55		

Tabla 3. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia de AGID, ELISA en suero y ELISA en leche en relación a la prueba de PCR en sangre.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between AGID, ELISA, and PCR in blood.

Prueba usada como Referencia	Prueba Alternativa	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor kappa
PCR sangre	AGID	72	88	0.45
	ELISA suero	97	88	0.86
	ELISA leche	97	88	0.86

Anexo

Comunicación científica enviada a Archivos de Medicina Veterinaria

COMUNICACIONES

Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche.

Diagnose and typing of bovine leukaemia virus by means of a PCR-RFLP test from DNA extracted from somatic cells of milk.

R. FELMER, B.Q., PhD.; J. ZÚÑIGA, B.Q.; M. RECABAL, M.V.; R. CHÁVEZ, B.Q., PhD.

Unidad de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-CRI Carillanca. Casilla 58-D Temuco, Chile. E-mail: rfelmer@carillanca.inia.cl

SUMMARY

We assessed the suitability of using DNA isolated from milk somatic cells for the diagnose and molecular typing of bovine leukaemia virus. A total of 40 bulk milk samples collected at our Milk Quality Laboratory were analysed. Thirty three of these samples were seropositive to BLV by an indirect ELISA test. The PCR confirmed the presence of the virus in all 33 seropositive samples, whereas in the remaining seronegative samples a band specific for the virus was not detected. RFLP analysis identified 2 of the 3 known subgroups of genetic variants of BLV. In the same way, individual analysis carried out in one selected PCR positive herd, confirmed the presence of more than one genetic variant within this herd, suggesting the probable re-infection with another strain of the virus. This work constitutes the first report describing the application of a PCR-RFLP test for the detection and molecular typing of BLV directly from milk. The simplicity to collect the bulk milk sample converts this assay as a convenient and economical test not only for the diagnose of the virus, but also as a convenient way to study the molecular epidemiology and distribution of the BLV infection in a given geographical area even on a national scale.

Palabras claves: PCR, leucosis, RFLP, electroforesis.

Key words: PCR, leukaemia, RFLP, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad neoplásica del sistema retículo endotelial del ganado causado por la infección con el virus de la leucosis bovina (VLB), un retrovirus de la familia *Retroviridae* (Kettmann y col., 1976; Radostits y col., 1995). Estudios genéticos han demostrado una escasa variación en este virus con respecto a otros virus de la familia *Retroviridae*, representados principalmente por los lentivirus (Willems y col., 1993; Mansky, 1998). Sin embargo, la importancia de estudiar la variabilidad genética de este y otros virus en general, radica en que permite monitorear la aparición de nuevas variantes genéticas y permite realizar estudios epidemiológicos y árboles filogenéticos para trazar el origen del virus. En 1981, Kettmann y col. estudiaron las secuencias nucleotídicas de diferentes aislados de VLB y encontraron sitios de restricción en el genoma que permitían clasificar a estos aislados en 3 principales sub-grupos; Europeo, Australiano y Norteamericano-Japonés. Esta información fue posteriormente confirmada mediante la secuenciación de 3 aislados provenientes de Bélgica, Japón y Australia corroborando la factibilidad de utilizar una prueba de RFLP (restriction fragment length polymorphism) para clasificar a este virus y estudiar la distribución de la infección en los rebaños (Coulston y col., 1990). Este mismo análisis, aunque ahora mediante PCR-RFLP, está siendo utilizado por diversos autores para estudiar la diversidad genética de VLB (Fechner y col., 1997; Beier y col., 2001; Licursi y col., 2002; Zaghawa y col., 2002; Limanskii y col., 2004). En todos estos casos, el ADN viral ha sido detectado mediante PCR a partir de la fracción de linfocitos sanguíneos. Dado que la recolección de muestras de sangre es laboriosa y requiere un grado mayor de logística (personal entrenado, visita a terreno), el objetivo del presente estudio fue evaluar la factibilidad de emplear muestras de leche, con énfasis en la utilización de leche del estanque predial, para diagnosticar y tipificar el VLB. La ventaja de este enfoque es que permitiría no sólo apoyar al diagnóstico complementario de VLB, sino además

realizar la tipificación del virus en forma rápida y conveniente para así estudiar la epidemiología y distribución de la infección en una amplia zona geográfica, incluso a nivel de país.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de las muestras y procesamiento.

Se obtuvieron muestras de leche del estanque predial directamente desde nuestro Laboratorio de Calidad de Leche de INIA-Carillanca, Temuco y correspondieron a muestras de diferentes predios de la IX Región. Muestras de leche de animales individuales se obtuvieron de un predio lechero de la comuna de Freire, con historial clínico de leucosis. Las muestras se procesaron eliminándoles la crema mediante centrifugación por 10 minutos a 3.500 r.p.m. La fracción clarificada se conservó a -20°C para su posterior análisis de anticuerpos mediante ELISA, mientras que la fracción de células somáticas se conservó a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Aislamiento de ADN.

La fracción de células somáticas correspondiente a 60 ml de leche, se utilizó para la extracción de ADN, de acuerdo a un protocolo estándar que consistió de una lisis celular a 55°C durante la noche en un tampón conteniendo Proteinasa K (Tris-HCl, 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM, Proteinasa K 1 mg/ml y SDS 1%). Los restos celulares se precipitaron y separaron mediante la adición de NaCl 5 M y centrifugación a máxima velocidad por 10 minutos. El ADN se recuperó finalmente de la fase acuosa mediante precipitación con etanol y se resuspendió en tampón T.E.

Análisis serológico.

La detección de anticuerpos a VLB en las muestras de leche, se realizó mediante la técnica de inmunoensayo indirecto (ELISA-i) empleando un kit comercial (SVANOVA, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector ELISA (Labsystems, Multiskan EX) a 450 nm y utilizando para la interpretación de los resultados una relación de densidad óptica corregida (DO muestra/DO control positivo) igual o superior a 6%.

Análisis molecular mediante PCR-RFLP.

El diagnóstico del virus se realizó mediante PCR anidado utilizando partidores correspondientes a una región altamente conservada del gen *env* viral (para detalles ver Beier y col., 2001). La aparición de una banda de amplificación de 444 pb se consideró como confirmatoria de la presencia del VLB. Para la tipificación molecular del virus mediante RFLP, se utilizaron 10 μl de producto de PCR el que se digirió con 5 U de cada de las enzimas de restricción *Bam* HI, *Pvu* II y *Bcl* I. Los productos de PCR y fragmentos de restricción fueron visualizados en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar la detección y posterior tipificación de VLB mediante la prueba de PCR-RFLP, se seleccionaron 40 muestras de leche de estanques prediales correspondientes a diferentes predios de la IX Región. De estas muestras, 33 fueron clasificadas como seropositivas mediante una prueba de ELISA, mientras que las restantes fueron clasificadas como negativas. El PCR

permitió confirmar la presencia del virus en las 33 muestras seropositivas, mientras que en las muestras seronegativas no se obtuvo una banda de amplificación (Figura 1). Este resultado permitió confirmar la factibilidad de detectar el virus directamente desde las muestras de leche del estanco predial, permitiendo realizar por primera vez la tipificación del virus mediante la prueba de RFLP a partir de estas muestras. El análisis mediante RFLP permitió asignar los productos de PCR a 2 de los 3 subgrupos de variantes genéticas descritas de VLB. La enzima *Bam* HI digirió el fragmento de PCR en 17 de las 33 muestras analizadas, obteniéndose un perfil de restricción similar al esperado para el subgrupo Belga (Rice y col., 1984), resultando en fragmentos de 326 y 128 pb, respectivamente (Figura 2). Las 16 muestras que no fueron digeridas por *Bam* HI fueron en cambio digeridas por la enzima *Pvu* II, confirmando un perfil de restricción similar al esperado para el subgrupo Australiano (Coulston y col., 1990), resultando en fragmentos de 280 y 164 pb, respectivamente. En ninguna de las muestras analizadas se obtuvo un perfil similar al del subgrupo Japonés (Sagata y col., 1985), ya que la digestión con la enzima de restricción *Bcl* I generó una banda doble de 220 y 225 pb en las 33 muestras analizadas. Estos hallazgos demuestran la presencia en nuestra Región de 2 de las 3 de variantes genéticas de VLB descritas en el mundo. No se encontraron variantes genéticas correspondientes al subgrupo Japonés, lo que refleja probablemente las prácticas de comercio animal realizadas en nuestro país en décadas pasadas, principalmente con países de Norteamérica y Europa, lugares donde existe una mayor concentración de estas variantes genéticas del virus. Aunque no podemos descartar la posibilidad de encontrar alguna variante genética similar al subgrupo Japonés en un estudio más ampliado.

Esta misma prueba se evaluó además a nivel individual, seleccionando para ello muestras de leche de 10 animales de un predio con historial clínico de Leucosis. El producto de amplificación de estas muestras fue digerido con un mayor número de enzimas de restricción, para aumentar el poder resolutivo de la técnica. De esta forma, adicionalmente a las enzimas *Bam* HI, *Pvu* II y *Bgl* I del estudio anterior, se incluyeron las enzimas *Ava* I, *Psy* I, *Taq* I, *Acc* I, *Bcl* I, y *Cvi* II. Como se observa en la Figura 3, no se encontraron diferencias en los perfiles de restricción al analizar las muestras con las enzimas *Psy* I, *Taq* I, *Acc* I, *Bcl* I, *Bgl* I y *Cvi* II, ya que los fragmentos generados fueron similares para todas las muestras analizadas. Sin embargo, las enzimas de restricción *Ava* I, *Bam* HI y *Pvu* II permitieron identificar 2 variantes genéticas de este virus en el predio, ya que el perfil de restricción de las muestras 1 y 2 fue diferente al de las muestras 3, 4 y 5. De acuerdo a los resultados obtenidos con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Pvu* II, este predio tendría las 2 variantes genéticas descritas anteriormente, es decir, las variantes genéticas correspondientes al subgrupo Belga y Australiano. Además, es interesante destacar que una nueva enzima de restricción incluida en el análisis (*Ava* I), también permitiría distinguir a estas 2 variantes genéticas, lo que ampliaría el repertorio de enzimas disponibles para estudiar la diversidad genética del virus. Este análisis permite concluir la presencia de más de una variante genética o cepa de este virus en el predio analizado, situación que refleja más probablemente una re-infección del predio con otra cepa del virus. Eventualmente, la presencia de estas 2 cepas en el mismo predio podría deberse a una mutación del virus, aunque menos probable a nuestro entender, debido a la baja tasa de mutación descrita para este virus, que no supera el 0.0009% (cambios nucleotídicos por ciclo de replicación por año; Willems y col., 1993). Este resultado resalta la importancia en la implementación de medidas de bioseguridad en un predio para evitar así la infección o re-introducción de un virus en particular.

En un estudio preliminar (datos no publicados) evaluamos este método de PCR en muestras individuales de leche y sangre de animales seropositivos a la prueba de ELISA. El PCR en leche fue positivo sólo para el 41% de las muestras que dieron positivas al PCR en sangre. Esta baja correlación entre ambas muestras se explica fundamentalmente por el menor número de linfocitos B, la célula blanco por elección, presentes en la muestra de leche (Mirsky y col., 1996). Otros factores que pueden interferir con la capacidad de detección del virus en leche tienen que ver el período de lactancia del animal, debido a que los niveles de células somáticas y linfocitos varían durante la lactancia (Asai y col., 1998), así como también varían debido a factores ambientales como la mastitis. En este estudio preliminar encontramos, no obstante, una buena correlación (100%) entre ELISA y PCR aplicados a muestras de leche de estanques prediales. Esto se explicaría por la mayor probabilidad que en un rebaño exista más de un animal infectado que contribuya con una mayor carga de linfocitos infectados.

Debido a la facilidad en la recolección de la muestra del estanque predial, la gran utilidad de esta técnica estaría en la posibilidad de realizar estudios epidemiológicos del virus en una forma rápida y conveniente. El estudio de la diversidad genética de VLB y de cualquier virus en general es importante porque permite no sólo monitorear la aparición de nuevas variantes genéticas sino además permite trazar el movimiento de animales (introducción de nuevas cepas desde otros predios o incluso países vecinos) y subtipificar el virus para estudios epidemiológicos. Además, el PCR puede detectar variantes genéticas del VLB que no reaccionan con anticuerpos en pruebas serológicas de rutina (Fechner y col., 1997; Beier y col., 1998).

En conclusión, la técnica de PCR que aplicamos en forma pionera a muestras de leche del estanque predial, podría ser de utilidad no sólo como complemento al diagnóstico de VLB, sino también como una forma conveniente de realizar la tipificación del virus en una zona determinada o incluso a nivel de país, lo cual proporciona una forma rápida y conveniente de entender la epidemiología y distribución de la infección de VLB en nuestros rebaños.

RESUMEN

Se evaluó la factibilidad de aplicar una prueba de PCR para el diagnóstico y tipificación molecular del virus de la leucosis enzoótica bovina (VLB), directamente desde muestras de leche. Se analizaron un total de 40 muestras de estanque predial, 33 de las cuales fueron seropositivas a una prueba de ELISA. El PCR confirmó la presencia del virus en el 100% de los estanques seropositivos, mientras que en las muestras seronegativas no se obtuvo una banda de amplificación. El posterior análisis de estas muestras mediante RFLP, permitió identificar la presencia de 2 de los 3 subgrupos conocidos de variantes genéticas del virus. La aplicación de esta prueba en 10 animales de un predio, permitió confirmar la presencia de más de una variante genética dentro del mismo predio, sugiriendo la probable re-infección de este predio con otras cepas del virus. Es necesario destacar que este trabajo constituye el primer reporte de la aplicación de una prueba de PCR-RFLP para la detección y tipificación de VLB directamente desde muestras de leche. De esta forma, la técnica de PCR descrita se puede utilizar no sólo como complemento al diagnóstico de VLB, sino también como una forma conveniente de realizar la tipificación del virus en una zona determinada o incluso a nivel de país, lo cual proporciona una

forma rápida y conveniente de estudiar la epidemiología y distribución de la infección de VLB en nuestros rebaños.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Programa de Biotecnología, Ministerio de Agricultura, Chile (Proyecto BID-PI-C-2001-1- P-035). Los autores agradecen además la colaboración del Laboratorio de Calidad de Leche de Carillanca y de los productores lecheros de la Región por facilitar el muestreo de sus animales y estanques prediales.

BIBLIOGRAFIA

AGRESTI, A., W. PONTI, M. ROCCHI, R. MENEVERI, A. MAROZZI, D. CAVALLERI, E. PERI, G. POLI, E. GINELLI. 1993. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res.* 3: 373-8.

ASAI, K., K. KAI, H. RIKIISHI, S. SUGAWARA, Y. MARUYAMA, T. YAMAGUCHI, M. OHTA, K. KUMAGAI. 1998. Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol.* 161: 51-61.

BEIER, D., P. BLANKENSTEIN, H. FECHNER. 1998. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 11: 408-12.

BEIER, D., P. BLANKENSTEIN, O. MARQUARDT, J. KUZMAK. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 114, 252-256.

BELAK, S. P. THOREN. 2001. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert Rev Mol Diagn.* 4: 434-43.

BURRIDGE, M., M. THURMOND, J. MILLER, M. SCHMERR, M. VAN DER MAATEN. 1982. Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am J Vet Res.* 10: 1866-7.

COULSTON, J., H. NAIF, R. BRANDON, S. KUMAR, S. KHAN, R. DANIEL. M. LAVIN. 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J Gen Virol.* 71: 1737-46.

EVERMANN, J., M. JACKSON. 1997. Laboratory diagnostic tests for retroviral infections in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1: 87-106.

FECHNER, H., A. KURG, L. GEUE, P. BLANKENSTEIN, G. MEWES, D. EBNER, D. BEIER. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 10: 621-30.

FECHNER, H., P. BLANKENSTEIN, A. LOOMAN, J. ELWERT, L. GEUE, C. ALBRECHT, A. KURG, D. BEIER, O. MARQUARDT, D. EBNER. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237, 261-9.

KELLY, E.J., M. JACKSON, G. MARSOLAIS, J. MORREY, R. CALLAN. 1993. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res.* 2: 205-9.

KLINTEVALL, K., A. BALLAGI-PORDANY, K. NASLUND, S. BELAK. 1994. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol.* 3: 191-204.

KETTMANN, R., D. COUEZ, A. BURNY. 1981. Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated proviral DNA of bovine leukemia virus. *J Virol.* 38: 27-33.

KUCKLEBURG, C., C. CHASE, E. NELSON, S. MARRAS, M. DAMMEN, J. CHRISTOPHER-HENNINGS. 2003. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest.* 1: 72-6.

LICURSI, M., Y. INOSHIMA, D. WU, T. YOKOYAMA, E. GONZALEZ, H. SENTSUI. 2002. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res.* 1: 101-10.

LIMANSKII, A., L. GEUE, O. LIMANSKAIA, D. BEIER. 2004. Typing of cattle leukemia virus circulating in the Ukraine. *Vopr Virusol.* 1: 39-44.

MAMOUN, R., M. MORISSON, N. REBEYROTTE, B. BUSETTA, D. COUEZ, R. KETTMANN, M. HOSPITAL, B. GUILLEMAIN. 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol* 64: 4180-8.

MIRSKY, M., C. OLMSTEAD, Y. DA, H. LEWIN. 1996. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J Virol.* 4: 2178-83.

RADOSTITS, O., D. BLOOD, C. GAY. 1995. Enzootic-bovine leukosis (bovine lymphosarcoma). In: Radostits O, Blood D and Gay C (Eds), *Veterinary Medicine*, 8th Edn pp: 954-965. Bailliere Tindall, London.

REICHERT, M., J. STEC. 1999. Simultaneous use of two primer pairs increases the efficiency of polymerase chain reaction assay in the diagnosis of bovine leukemia virus. *J Vet Diagn Investig.* 11: 543-547.

SAGATA, N., T. YASUNAGA, J. TSUZUKU-KAWAMURA, K. OHISHI, Y. OGAWA, Y. IKAWA. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 677-81.

WILLEMS, L., E. THIENPONT, P. KERKHOF, A. BURNY, M. MAMMERICKX, R. KETTMANN. 1993. Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastain variability. *J Virol.* 67: 1086-9.

ZAGHAWA, A., D. BEIER, I. EL-RAHIM, I. KARIM, S. EL-BALLAL, F. CONRATHS, O. MARQUARDT. 2002. An outbreak of enzootic bovine leukosis in upper Egypt: clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. *J Vet Med* 49: 123-9.



Figura 1. Amplificación mediante PCR del ADN viral extraído desde linfocitos de la leche del estanque predial.

Electroforesis en agarosa al 1.5% de productos de PCR de muestras de leche de estanques prediales seronegativas (1-7) y seropositivas (8-12) a una prueba de ELISA indirecto.

St: Estándar 1 Kb (Promega); CN: control negativo; CP: control positivo, fragmento de 444 pb del gen *env* de VLB clonado en el plasmido TOPO-TA vector (Invitrogen).

1,5% agarose gel electrophoresis of PCR products in bulk milk samples seronegative (1-7) and seropositve (8-12) by an indirect ELISA test. St: Standard, 1 Kb (Promega); CN: Negative Control; CP: Positive Control, a 444 bp *env* fragment of BLV cloned into TOPO-TA vector (Invitrogen).

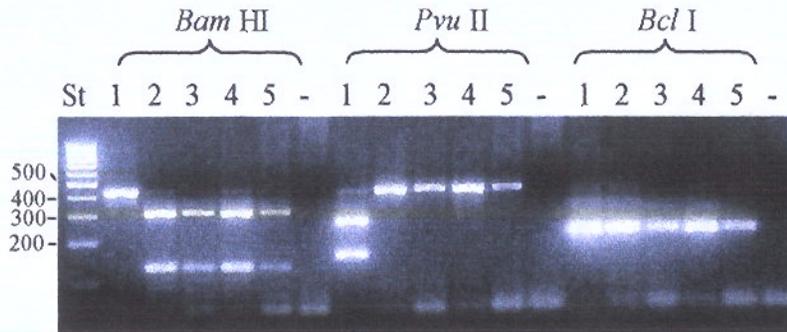


Figura 2. Análisis RFLP de muestras de ADN viral amplificadas desde linfocitos de la leche del estanque predial.

Electroforesis en agarosa al 3 % de productos de PCR digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Pvu* II y *Bcl* I, respectivamente. Carriles 1-5 corresponden a 5 diferentes muestras de estanque predial. St: corresponde al estándar de tamaño molecular 1 Kb (Promega); -: Muestra control de un predio negativo a VLB.

3% agarose gel electrophoresis of PCR amplicons digested with *Bam* HI, *Pvu* II and *Bcl* I, respectively. Lanes 1-5 correspond to 5 different herd's bulk milk samples. St: Standard 1 Kb; -: Negative herd sample.

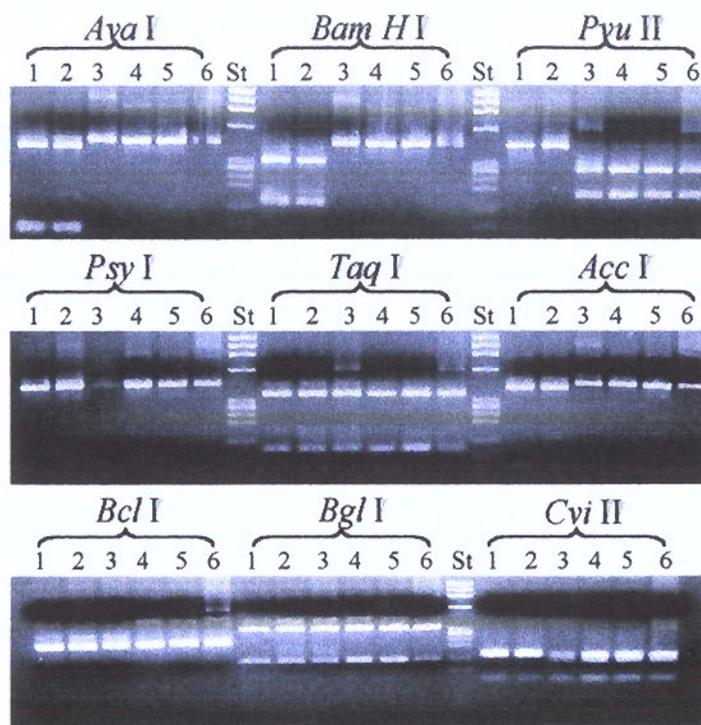


Figura 3. Análisis RFLP de muestras de ADN viral amplificadas desde leucocitos sanguíneos de animales individuales.

Electroforesis en agarosa al 3 % de los productos de amplificación de 6 diferentes muestras de animales individuales (1-6) digeridas con las enzimas de restricción como se muestra en la Figura. St: Standard 1 Kb (Promega).

3 % agarose gel electrophoresis of PCR amplicons of 6 individual samples of different cows (1-6) digested with restriction enzymes as shown in the Figure. St: Standard 1 Kb (Promega).

Anexo

Proceeding presentado en reunión FAO/IAEA

USE OF DNA FROM MILK TANK FOR DIAGNOSTIC AND TYPING OF BOVINE LEUKOSIS VIRUS

R. Felmer, J. Zuñiga, M. Recabal and H. Floody

*Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Carillanca, Unidad de Biotecnología,
Castilla 58-D, Temuco, Chile*

Abstract: With the aim of achieve a better understanding of the epidemiology of BLV infection, we investigated the suitability of milk tank samples to carry out molecular epidemiology studies of BLV in a Southern Region of Chile. As part of a serological survey for BLV antibodies carried out in 280 herds, we selected 33 strong positive samples from which, DNA was isolated to perform a BLV-specific nested PCR. Using RFLPA all 33 PCR products could be assigned to the known Australian or the Belgium subgroups. A phylogenetic tree resulting from the comparison of these sequences demonstrates the relations and differences between and within the subgroups.

Key words: *cattle, bovine leukosis, nested-PCR, phylogenetic tree*

1.1 INTRODUCTION

Bovine leukemia virus (BLV) is an exogenous retrovirus distributed worldwide. Most BLV-infected cattle remain clinically normal during their lifetime, with only 1-5 % eventually developing lymphosarcoma. However, up to one-third of BLV-infected cattle may develop persistent lymphocytosis (PL), a policlonal expansion of infected B-lymphocytes (Radostits et al., 1995). Eradication and control of the disease is based on early diagnostic and segregation of carriers. Serological tests such as agar gel immunodiffusion (AGID) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) are the tests of choice for international trade because they are easy to perform,

economically viable and capable of testing a large number of animals (Evermann and Jackson, 1997). However, serological tests do not discriminate maternal passive antibodies from an active immune response and do not provide evidence of the infection in its early stages. Direct methods, on the other hand, allow a reliable diagnosis in the initial stages of the disease or in new born calves, avoiding the false positive reactions caused by the presence of colostrum antibodies and false negative reactions caused by the immaturity of the immune system (Fechner et al., 1996). Within the direct methods, the polymerase chain reaction (PCR) is being increasingly used for the diagnosis of infection diseases. Because of its high sensitivity PCR can be used in eradication campaigns where prevalence is low and it allows to differentiate seropositive calves, which have acquired immunity by passive transfer of immunoglobulins through the colostrum. Lastly, PCR may detect variants of BLV provirus, which may not react with standard antibodies in routine serological tests (Beier et al., 1998).

1.2 MATERIAL AND METHODS

ELISA. A commercial ELISA test (SVANOVIR, Sweden) was used in the serological survey according to the manufacturer instructions.

DNA isolation. DNA samples were isolated from the leukocyte fraction of 60 ml of milk by using an "in house" protocol consisting of lysis of leucocytes followed by a salt precipitation of the DNA.

Nested PCR for BLV. The PCR was performed in a total volume of 30 μ l according to Beier et al. (2001). The first round conditions were: denaturation at 94°C for 5 minutes followed by 40 amplification cycles at 94°C for 30 s; 57°C annealing for 30 s; and 72°C for 60 s followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes (external primers 5'-tctgtgccaagtctcccagata-3' and 5'-aac aacaacctctgggaagggt-3'). For the second round of PCR, 3 μ l of product were taken from the first amplification and reamplified with the same conditions as above except that annealing temperature was increased to 68°C (internal primers 5'-cccacaagggcggcgccggtt-3' and 5'-gcg aggccgggtccagagctgg-3'). In order to visualize the PCR products, 10 μ l of each sample were run on 1,5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLPA). 10 µl of PCR products were digested with 5 U of *BclI*, *PvuII* or *Bam HI* (Boehringer Mannheim, Germany) to assign the samples to the known subgroups of BLV.

DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis. Purified PCR products, corresponding to dairy herds distributed in the "Region de la Araucanía" (Southern Chile), were cloned into pGEM T-Easy vector (Promega) for sequencing analysis. Sequences of the clones were determined using the fluorescent dye deoxy-terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer Cetus, Inc) and the ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem). Eight of the sequences obtained were aligned to 21 published sequences (GeneBank accession numbers; K02120; K02251; D00647; S83530; M35238; M35242; M35239; M35240; AF399703; AF399704; AF067081; AY078387; AF547184; AF503581; AY151262; U87872; AF399702; NC_001414; AF033818; AY185360; AF257515). Alignment of the sequences was established using the Software ClustalX (Version 1.8) and phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 2.1 (Sudhir et al., 2001). The length of the compared sequences was 444 bp.

1.3 RESULTS AND DISCUSSION

We assessed the suitability of milk tank samples as a source of DNA for a quick diagnostic and typing of BLV in dairy herds. As part of a serological survey for BLV antibodies carried out in 280 herds, we selected 33 strong positive samples from which, DNA was isolated to perform a BLV-specific nested PCR. All 33 samples gave a positive PCR reaction and further RFLP analysis allowed to assign the PCR products to 2 of the 3 known subgroups. The restriction pattern corresponding to the Belgium subgroup (Rice et al., 1984) was observed in 17 samples, while the pattern of the Australian subgroup (Coulston et al., 1990) was observed in 16 samples. No restriction pattern of the Japanese subgroup (Sagata et al., 1985) was found (Figure 1 and Table 1).

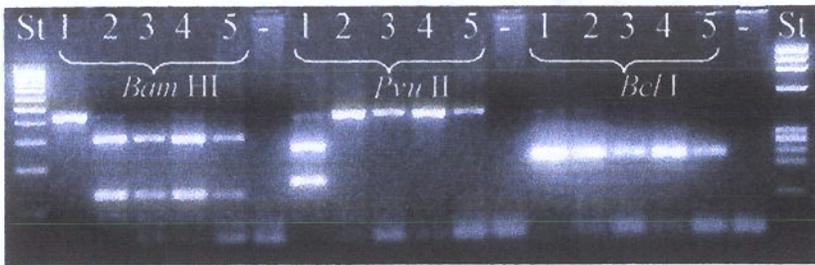


Figure 1. Restriction fragment length polymorphisms analysis of PCR amplicons for BLV. Lanes 1-5 are PCR amplicons for BLV, corresponding to 5 different herd samples digested with Bam HI, Pvu II and Bcl I, respectively. First and last lanes 1 Kb and Phi X-174 Hae III molecular markers, respectively. -Corresponds to a negative herd sample.

Table 1. Assignment of the Chilean isolates to the known subgroups of BLV proviruses based on the Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLPA) of a 444 bp *env* PCR fragment. Subgroups Belgian, Australian and Japanese were as described by Rice et al. (1985), Coulston et al. (1990) and Sagata et al. (1985), respectively.

Country	Isolates	Subgroup			
		Belgian	Australian	Japanese	Other
Chile	33	17	16	0	0

The phylogenetic analysis (Figure 2) clustered the sequences according to the known subgroups described earlier and confirmed the previous RFLPA assignment of the eight Chilean isolates analyzed to the Australian (3) and Belgian (5) subgroups. Interestingly, the Chilean clones formed separated clusters within their respective subgroups, indicating a certain degree of sequence divergence. The five Chilean clones, representing the Belgium subgroup, had some very well conserved and unique nucleotide differences. These nucleotide differences occurred at position 70 of the 444 bp amplified product, where the nucleotide pair TG was replaced by the CA pair, and at position 174 where the nucleotide A was replaced by G. These unique changes affected the deduced aminoacidic sequence, replacing the conserved residues valine and glutamine by a methionine and an arginine, respectively.

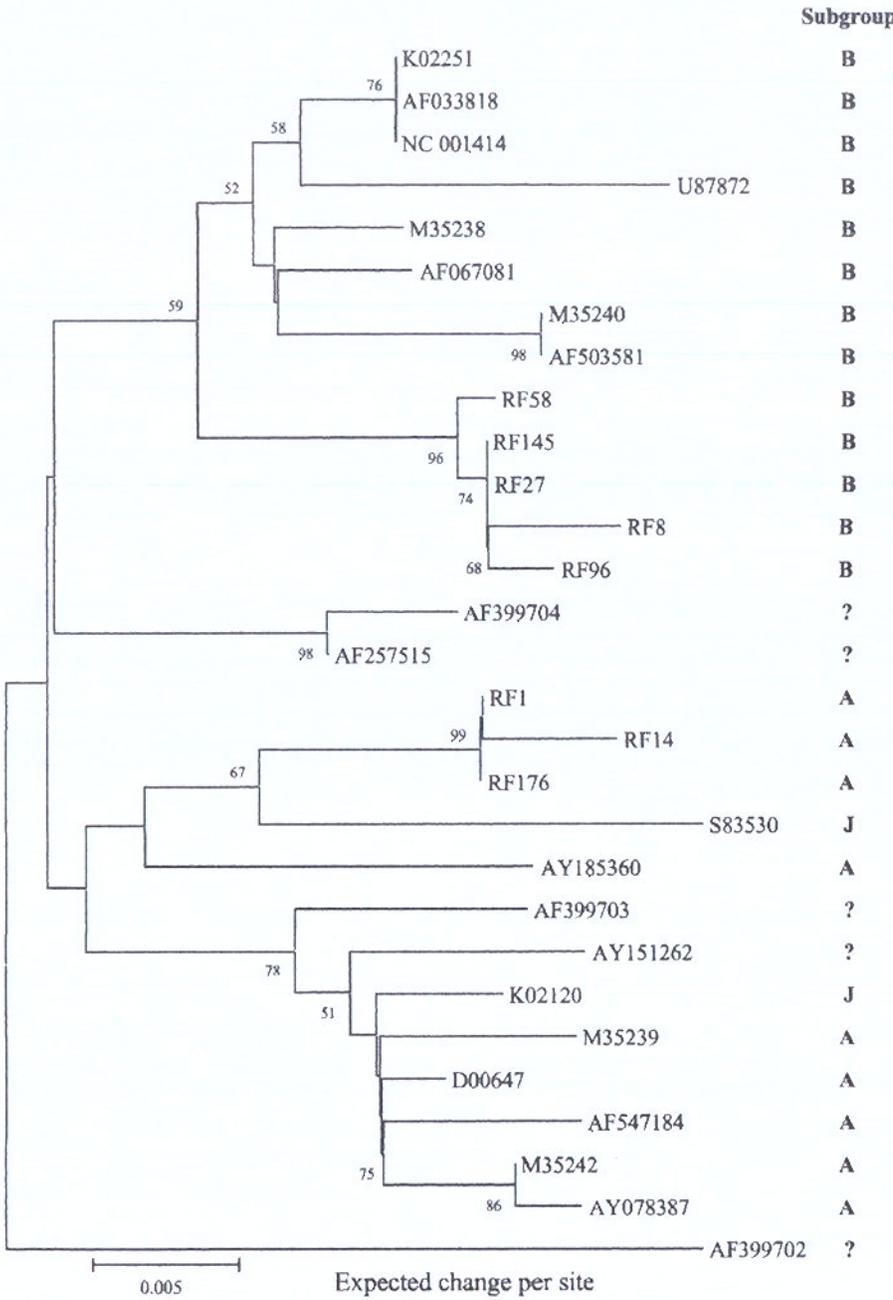


Figure 2. Neighbour Joining analysis of a 444 bp alignment of the BLV *env* gene. The Kimura-Two-Parameter model was used as substitution model. RF: correspond to the Chilean isolates while the others correspond to all *env* BLV sequences deposited in the GeneBank (September 2003). B: Belgium; A: Australian; J: Japanese; ?: Other.

These changes might have important implications on the infectivity of the virus and further analysis are required to assess this point. From a practical standpoint, they could be used to monitor external introduction of the virus.

It is assumed that the genomic variability of BLV is very low and that variations are only tolerated at some nucleotide positions without loss of infectivity and ability to integrate in the host's genome (Sagata et al., 1985) and that most of the differences in the nucleotide sequences are not followed by changes in amino acid sequences (Elwert 1997). Nevertheless, our results showed that these changes are possible. Whether they have an effect on the infectivity of the virus remain to be determined.

In conclusion, the PCR technique used in this study might be useful not only as an aid in the diagnostic of BLV from milk but also in the typing of the virus, which provides a convenient way to better understand the epidemiology and distribution of BLV infection.

1.4 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Gastón Muñoz for helping in the Phylogenetic analysis. This work was supported by grant from Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Ministerio de Agricultura, Chile.

1.5 REFERENCES

Beier D, Blankenstein P, Fechner H. 1998. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* Nov;105(11):408-12.

Beier D, Blankenstein P, Marquardt O, and Kuzmak J. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 114. 252-256.

Coulston J, Naif H, Brandon R, Kumar S, Khan S, Daniel RC, Lavin MF. 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J Gen Virol* Aug;71 (Pt 8):1737-46.

Anexo

Artículo científico enviado a Veterinary Microbiology

1
2
3 **High frequency of non-silent point mutations in the gp51 *env* fragment of bovine**
4 **leukaemia virus isolated in Chile**
5
6
7

8
9 R. Felmer,* G. Muñoz, J. Zúñiga, M. Recabal
10

11
12 Unidad de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Carillanca. Casilla 58-D,
13 Temuco, Chile.

14 Phone: 56-45-215706

15 Fax: 56-45-216112

16 *: Corresponding author: rfelmer@carillanca.inia.cl
17
18

ABSTRACT

With the aim of achieve a better understanding of the epidemiology and distribution of bovine leukaemia virus (BLV) infection in Chile, we carried out PCR-RFLP, sequencing and phylogenetic analysis of a fragment of BLV gp51 *env* gene. The proviral BLV DNA was isolated from the leukocyte fraction of thirty three serologically positive bulk milk samples collected from different geographical areas in the South of Chile. Restriction analysis allowed to classify 17 isolates within the Australian subgroup and 16 in the Belgium subgroup. DNA sequence and multiple alignment analysis of eight Chilean *env* gene fragments of BLV showed a significantly higher frequency of single and double nucleotide substitutions. Phylogenetic analysis of these sequences with 59 BLV gp51 *env* sequences available in GenBank, showed four different clusters. The groups thus identified were not related to those previously defined by restriction analysis. Chilean isolates were included in two different clusters and were genetically not related to isolates collected from neighbouring countries. Considering our results we can conclude: (i) bulk milk samples are suitable to identify the presence of BLV allowing epidemiological and genetic studies to be conducted on large geographical areas; (ii) at least four different genetic groups of BLV were identified by phylogenetic analysis.

Key words: cattle, bovine leukaemia, nested-PCR, phylogenetic analysis

1. Introduction

Bovine leukaemia virus (BLV) is an exogenous retrovirus distributed worldwide. Most BLV-infected cattle remain clinically normal during their lifetime, with only 1-5 % of infected animals older than 4 years eventually developing lymphosarcoma. However, up to one-third of BLV-infected cattle may develop persistent lymphocytosis (PL), a polyclonal expansion of infected B-lymphocytes (Radostits et al. 1995).

The complete BLV genome sequence of different isolates worldwide has been described by several authors (Rice et al. 1984; Sagata et al. 1985; Coulston et al. 1990; Dube et al. 2000). The envelope glycoproteins of BLV, and in general of any retrovirus, are crucial for the virus ability to enter the cells and are the target for neutralizing antibodies (Mamoun et al. 1990). The BLV envelope is comprised of two glycoproteins namely gp51 (a surface associated molecule) and gp35 (a transmembrane protein) both originated by posttranslational proteolytic cleavage of the gpr72 precursor protein encoded by the *env* gene.

Genetic studies of BLV have shown very little variation among isolates. In fact, the extent of nucleotide variation between different isolates was 3% distributed over the entire genome with most of these variations being confined to point mutations (Coulston et al. 1990). Amino acid sequence on the other hand, was most highly conserved in the *env* genes with only 0,71 and 0,78% variation when an Australian isolate was compared to a Japanese and Belgian isolates, respectively (Coulston et al. 1990). It has been suggested that the low genetic diversity of this retrovirus could be explained by the relatively low mutation rate. In fact, the *in vivo* mutation rate of the *env* gene was estimated in 0,009% nucleotide changes per year (Willems et al. 1993). Despite this fact, previous studies have shown diversity of BLV based on the restriction analysis and DNA sequencing of the clones isolated in different parts of the world (Mamoun et al. 1990; Molteni et al. 1996; Beier et al. 2001). These studies allowed the classification of the isolates into three main BLV subgroups (Belgium, Australian and Japanese), based on the restriction pattern obtained with the endonucleases *Bam* HI, *Pvu* II and *Bgl* I.

Although with a limited success, a number of PCR assays have been developed to detect the BLV provirus DNA in blood samples (Agresti et al. 1993; Kelly et al. 1993; Klintevall et al. 1994; Molteni et al. 1996; Fechner et al. 1997 and Reichert et al. 1999). However, with the exception of the

1 recently published work of Kuckleburg et al. (2003), none of these assays have been previously used
2 for the detection of the BLV virus directly from individual or bulk milk samples.

3 In Chile, the disease was first described in 1962 and serological surveys have confirmed its
4 widespread distribution. However, no data is available regarding the molecular diversity of the virus.
5 Therefore, the purpose of the present study was to assess the suitability of using a bulk milk sampling
6 strategy to investigate the occurrence of different BLV provirus variants in naturally infected cattle.
7 This strategy would allow a rapid evaluation of the diversity of BLV provirus in a large geographic
8 area.

11 2. Materials and Methods

12 2.1. Sampling and BLV antibody detection.

13 Bulk milk samples were collected at the Milk Quality Laboratory (INIA-Carillanca, Temuco) and
14 represented different herds distributed in south of Chile. BLV infection status was assessed by an
15 indirect ELISA test (SVANOVIR, Sweden) according to the manufacturer instructions.

17 2.2. DNA isolation.

18 DNA was isolated from the somatic cell fraction obtained from 60 ml of milk by using a modified
19 SDS/Proteinase K protocol (Higuchi et al. 1989). Briefly, pelleted cells were suspended in a lysis
20 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, 100 µg/ml Proteinase K and 1% SDS) and incubated
21 overnight at 55°C. Cellular debris was precipitated with 5M NaCl and separated by centrifugation at
22 10,000 rpm per 10 minutes. The DNA was recovered from the aqueous supernatant by ethanol
23 precipitation and suspended in 200 µl of TE.

25 2.3. BLV env fragment amplification.

26 A 444 bp fragment of the *env* gene was amplified by a nested PCR (Beier et al. 2001). Briefly, the first
27 round conditions were: denaturation at 94°C/5 minutes followed by 40 amplification cycles at 94°C/30
28 s; 57°C/ 30 s; and 72°C/60 s and a final extension step at 72°C for 10 minutes (external primers 5'-
29 TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3' and 5'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3'). For the
30 second round of PCR, 3 µl of the product were taken from the first amplification and re-amplified with
31 the same conditions as above except that annealing temperature was increased to 68°C (internal primers
32 5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGTTT-3' and 5'-GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG-3'). PCR
33 products were visualized by running 10 µl of each sample on 1.5% agarose gels stained with ethidium
34 bromide.

35 2.4. RFLP provirus typing.

36 In order to type the provirus in the PCR-positive bulk milk samples to one of the known subgroups of
37 BLV, 10 µl of the second round PCR fragment were digested with 5 U of *Bcl* I, *Pvu* II or *Bam* HI
38 (Boehringer Mannheim, Germany). Digestion products were analyzed by electrophoresis on 2.5%
39 agarose gels stained as described above.

41 2.5. DNA cloning and sequencing.

42 Second round PCR fragments were purified from agarose using QIAquick columns (QIAGEN,
43 Germany) according to the manufacturer's instructions and cloned into pGEM T-Easy vector
44 (Promega) or TOPO-TA for sequencing (Invitrogen) following the manufacturer's suggestions. Both
45 strands of the obtained clones were sequenced using universal M13 primers and the ABI PRISM Dye
46 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase (Perkin Elmer)
47 and the ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The eight sequences obtained
48 were submitted to GenBank and the accession numbers are indicated in Table 1.

2.6. Sequence analysis.

Eight Chilean BLV *env* fragment sequences (Accession numbers: AY515273; AY515274; AY515275; AY515276; AY515277; AY515278; AY515279; AY515280) were compared with 59 published *env* sequences. When comparisons were done at the protein level, the encoded proteins were deduced from the DNA sequences using the Translation tool of the ExPASy (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>; Gasteiger et al. 2003). Alignments of DNA and protein sequences were carried out using the online program MultiAlin, (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>; Corpet, 1988). Identity values were determined using the BioEdit program (Hall, 1999).

2.7. Phylogenetic analysis.

Phylogenetic analysis was carried out using the MEGA2.1 program (Kumar et al. 2001). DNA sequences were aligned by the ClustalX program (Thompson et al. 1997) and the distance matrix were analyzed by the neighbor-joining method (Kimura 2-parameter model, transition to transversion rate: 2.0) with 1000 bootstrap replicates. Maximum parsimony analysis was also performed with random addition trees option turned on 10 and 100 bootstrap replicates.

3. Results

3.1. Amplification and RFLP analysis of BLV *env* fragment.

We assessed the suitability of using bulk milk samples to carry out molecular epidemiology studies of BLV provirus variants in naturally BLV infected cattle in Chile. For this purpose, 33 strong seropositive and 10 seronegative bulk milk samples were chosen at a local Milk Quality Laboratory from which, DNA was extracted to carry out a BLV specific nested PCR. All 33 seropositive samples, which represents between 50-100 cows contributing milk to each pool, amplified a product of the expected size for BLV, while milk samples negative by the immunoassay did not amplify the diagnostic band (Figure 1 A). Restriction analysis on the amplified 444 bp fragment allowed to assigned the different provirus variants to two of the three known subgroups of BLV. Figure 1 B shows an example of the generated fragments after digestion with restriction enzymes used for typing BLV provirus variants. *Bam* HI cleaved the 444 bp fragment in 17 samples as in the corresponding pattern of the Belgium subgroup (Rice et al. 1984). The other 16 samples were digested by *Pvu* II as in the corresponding pattern of the Australian subgroup (Coulston et al. 1990). *Bcl* I digestion resulted in a double band with a size between 220 and 225 bp in all 33 samples indicating the absence of isolates belonging to the Japanese subgroup (Sagata et al. 1985).

3.2. Sequence analysis.

To determine the variability among the Chilean isolates and those previously described, we selected 8 samples from well geographically distributed herds to carry out DNA sequencing on the 444 bp *env* fragment of BLV. The analysis of these sequences revealed a high number of nucleotide substitutions that were not detected by RFLP. No other variations like deletions, insertions or frameshift mutations were observed. The degree of nucleotide identity of all Chilean isolates relative to a reference strain (GenBank accession number K02120; Sagata et al. 1985) varied between 96 and 97%. On the other hand, the corresponding amino acid sequences had between 97 and 100% identity (Table 1). A total of 79 nucleotide substitutions were found in the *env* region of BLV. Nine of these substitutions (11%) were only observed in the Chilean isolates included in this study. These nucleotide substitutions caused 29 amino acid variations, 6 of them (21%) being unique to the Chilean isolates. Within these variations, we observed two substitutions at positions 5169 and 5170 that caused a dinucleotide change TG for CA and a nucleotide substitution at position 5273 that caused the nucleotide change A for G in 5 out of 8 Chilean isolates (sequences AY515273; AY515275; AY515277; AY515278 and AY515279). Both mutations yielded an amino acid change Val to Met at position 5169 and 5170 and Glu to Arg at position 5273 (Figure 2). None of the other characterized

1 sequences from GenBank had these amino acid changes. We also identified a dinucleotide change
2 (from GG to AC) at positions 5183 and 5184, which resulted in the amino acid change Arg to His
3 (position 121, Figure 2), although the same mutation was also observed in some of the other isolates.

4 All 67 nucleotide sequences corresponding to the gp51 BLV *env* fragment were translated to the
5 corresponding amino acid sequences. Because 42 amino acid sequences were present in more than one
6 isolate the final number of different sequences was reduced to 25 (Figure 2). Thus, these sequences
7 represent the actual variability of the encoded gp51 *env* fragment.
8

9 3.3. Phylogenetic analysis.

10 In order to evaluate the genetic relationships between the Chilean isolates and those previously
11 described, a phylogenetic analysis was conducted including all BLV *env* sequences up to date available
12 in GenBank. The analysis was carried out by the neighbor joining and maximum parsimony methods
13 obtaining trees with identical topology in both cases. As shown in Figure 3, we identified four main
14 nodes, well supported by bootstrap values, which allowed to establish four different genetic clusters to
15 group almost all BLV isolates. The groups identified were not related to the original division based on
16 restriction analysis. Belgium and Japanese types appeared concentrated in groups I and III,
17 respectively, while the Australian type appeared distributed in groups II, III and IV. The observed
18 clustering was not related to the geographical origin of the isolates either (Figure 3). Group I included
19 isolates collected in Europe, Chile and USA. This group was the most variable with a divergence of
20 3.0%. On the other hand, group II included mainly isolates collected from Argentina, although some
21 isolates from Brazil and Japan, were also observed. Group III included isolates collected in different
22 geographical areas such as Japan, America and Australia. Despite this fact, Group III was as genetically
23 homogeneous as Group II, with divergence of 1.8 and 1.3%, respectively. Group IV included three
24 isolates from Chile and one from Italy and were moderately heterogeneous with a divergence of 2.5%.
25 Two Brazilian isolates (AF399702 and AY185360) were ungrouped and corresponded to the most
26 divergent isolates (divergence value of 4.3%). However, because bootstrap values were not significant,
27 relationship between the identified groups can not be established.

28 Interestingly, Chilean isolates were not related to those collected in Argentina or Brazil. BLV
29 isolates from Argentina and Brazil were clustered in groups II and III, while Chilean isolates were
30 distributed in groups I and IV, forming independent and well supported sub-clusters, named ChA and
31 ChB, respectively (Figure 3). Both Chilean subgroups were more homogeneous than their
32 corresponding main groups. The divergence in the groups I and IV was 3.0 and 2.5%, respectively,
33 while in the subgroups ChA and ChB was 0.8 and 0.5 %, respectively. These results suggest the
34 existence of at least two populations of BLV in Chile, which would be the result of two independent
35 introduction events occurred mainly from Europe many years ago.
36
37

38 4. DISCUSSION

39
40 The first aim of this study was to assess the suitability of using bulk milk samples collected
41 at a local Milk Quality Laboratory for diagnose and typing of BLV provirus variants, which would
42 allow a fast and convenient way to study the epidemiology and distribution of BLV infection in a large
43 area. All analyzed seropositive bulk milk samples amplified a 444 bp band, which allowed to carry out
44 the RFLP analysis. We found the presence of two of the three known subgroups of BLV provirus
45 variants within the Chilean herds (Australian and Belgium subgroups). Digestion patterns, different
46 from the previously described for each enzyme were not found. The lack of isolates representing the
47 Japanese subgroup, could be related to the animal trading practices carried out in past decades, mostly
48 with European and North American countries. However, we can not rule out the possibility of finding
49 isolates belonging to the Japanese subgroup in a larger survey. Previous reports based on restriction

1 enzyme analysis and nucleotide and amino acid sequence comparisons have demonstrated that different
2 BLV variants are found in different geographical regions (Kettmann et al. 1981; Mamoun et al. 1990;
3 Coulston et al. 1990; Molteni et al. 1996; Beier et al. 2001). The previously sequenced BLV isolates
4 (Rice et al. 1984; Sagata et al. 1985; Coulston et al. 1990) demonstrated that restriction enzymes *Bam*
5 *HI*, *Bcl* I, and *Pvu* II are good markers to differentiate BLV variants (Mamoun et al. 1990). Here, we
6 further demonstrated the suitability of using DNA isolated from bulk milk samples and RFLP analysis
7 to carry out molecular epidemiology studies for BLV variants. This approach appears as a convenient
8 and economical strategy to perform studies covering a large geographic area, even on a national scale.
9 Nevertheless, because of the low resolution level of RFLP, DNA sequencing is always preferred to
10 reveal mutations at the nucleotide level. In fact, sequence analysis carried out with 8 of the Chilean
11 isolates showed a higher number of nucleotide substitutions, that would have not being revealed by
12 RFLP analysis. Alignment of these sequences with 59 *env* sequences registered in GenBank, revealed a
13 total of 79 nucleotide substitutions that caused 29 amino acid variations. Six of these variations (21%)
14 were uniquely observed within the Chilean isolates.

15 Previous analysis of amino acid composition of the *env* sequences showed some highly
16 conserved regions in different BLV variants that are essential for the virus interaction with target cells
17 (Portetelle et al. 1989; Coulston et al. 1990; Mamoun et al. 1990). In the preliminary study carried out
18 by Coulston et al. (1990) no amino acid changes could be observed between positions 89 and 201 or
19 between positions 222 and 257, when the Japanese, Australian and Belgium isolates were compared. In
20 the analysis we carried here, the region between 101 and 201 showed 25 substitutions and 5 of them
21 (20%) were unique to the Chilean isolates (Figure 2). Bruck et al. (1982a, b) identified a number of
22 epitopes on gp51 being F, G and H (occurring within the first 150 amino acids) the most important
23 because they are recognized by neutralizing antibodies against BLV (Portetelle et al. 1989). Seven
24 amino acid changes were detected in this region in 4 BLV variants studied by Portetelle et al. (1989)
25 and 4 amino acid changes were observed between the Japanese, Australian and Belgium isolates
26 studied by Coulston et al. (1990). Here, we found a total of 17 amino acid changes in a region including
27 only 50 of the 150 amino acids of the former studies, although the number of sequences we analyzed
28 was higher (67). We observed a number of relevant changes in this region in the Chilean isolates. In the
29 G epitope (position 122), an Arg was replaced by an His in 13 characterized sequences, including 5
30 Chilean isolates. In the CD8⁺-T cell response epitope (position 155-184), an Asp was replaced by a
31 Val in isolate AY515279 (position 167) and Iso was replaced by Thr in isolate AY515273 (position
32 177). In the third neutralizing domain (position 211-226), Lys replaced a Glu in isolate AY515274
33 (position 126) in a region highly conserved of BLV (Figure 2).

34 Although we could not study the serological relevance of these mutations with respect to the
35 level of humoral response in individual animals, these amino acid changes could signalize to an altered
36 antigenic or receptor binding ability, an ongoing controversial point regarding the significance of
37 mutations of BLV *env* gene in avoiding the immune surveillance of the host (Fechner et al. 1997;
38 Licursi et al. 2002). It has been generally assumed that the genomic variability of BLV is very low and
39 that most of the differences in the nucleotide sequences are not followed by changes of amino acids.
40 Nevertheless, the results showed here demonstrate that these changes occurs. Whether they have an
41 effect on the infectivity of the virus or on its ability to integrate into the host's genome remains to be
42 determined.

43 The phylogenetic analysis allowed to identify four different genetic groups of BLV. These
44 groups were not related to the original division based on restriction enzyme analysis nor were strictly
45 related to the origin of each isolate. Conserved restriction sites suitable to identify these four reported
46 groups, were not found. Thus, these groups can not be identified by other way than phylogenetic
47 analysis. Therefore, we propose the use of the sequences indicated in Figure 3 to classify new BLV
48 provirus variants. These sequences were selected because they represent extremes in the variability of
49 each group, allowing a quick and simple procedure of classification.

1 This is the first comprehensive phylogenetic study of BLV. In one of the first molecular
2 characterization of the virus, the complete *env* sequence of seven isolates collected in USA, Europe and
3 Japan were compared (Mamoun et al. 1990), allowing to identify two different subgroups,
4 corresponding to groups I and III we reported here. Licursi et al. (2003) on the other hand, employed
5 another set of sequences, that allowed them to identify 2 different groups, which corresponded to
6 groups II and III we described here. In another study, Beier et al. (2001) compared the relationships
7 between German isolates, but unfortunately the sequences were not submitted to GenBank and
8 therefore it was not possible to make a comparison.

9
10 In summary, we can conclude that epidemiological analysis based on the variations of the gp51
11 region by using DNA isolated from bulk milk is possible. Our results confirmed the occurrence of
12 different BLV provirus genotypes within the Chilean herds and that a higher level of amino acid
13 variation is observed in these isolates. Although the biological meaning of these variations is not well
14 understood at this point, further analysis on these isolates should clarify the importance of these
15 changes and the implications in the virulence of this virus. Despite the low mutation rate previously
16 described for BLV (Willems et al. 1993), we could identify 4 different groups, suggesting a certain
17 degree of genetic diversity of this retrovirus. While more BLV sequences become available from
18 geographical origin different from those studied here, the classification we found could be reinforced or
19 re-defined.

20 21 **ACKNOWLEDGEMENTS**

22
23 This work was supported by grant from "Fundación para la Innovación Agraria (FIA)", Ministerio de
24 Agricultura, Chile. (Grant N° BIOT-01-P-35).

25 26 27 **REFERENCES**

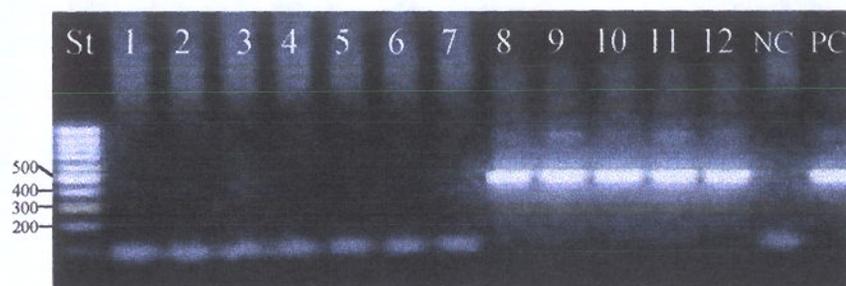
- 28 Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Marozzi, A., Cavalleri, D., Peri, E., Poli, G., Ginelli,
29 E., 1993. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at
30 birth. *Am. J. Vet. Res.* 54, 373-8.
- 31
32 Beier, D., Blankenstein, P., Marquardt, O., Kuzmak, J., 2001. Identification of different BLV
33 proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 114, 252-256.
- 34
35 Bruck, C., Portetelle, D., Burny, A., Zavada, J., 1982. Topographical analysis by monoclonal
36 antibodies of BLV-gp51 epitopes involved in viral functions. *Virology.* 122, 353-62.
- 37
38 Bruck, C., Mathot, S., Portetelle, D., Berte, C., Franssen, J., Herion, P., Burny, A., 1982. Monoclonal
39 antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope
40 glycoprotein gp51. *Virology.* 122, 342-52.
- 41
42 Camargos, M., Stancek, D., Rocha, M., Lessa, L., Reis, J., Leite, R., 2002. Partial sequencing of *env*
43 gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J. Vet. Med. B*
44 *Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49, 325-31.
- 45
46 Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16,
47 10881-10890.
- 48

- 1 Coulston, J., Naif, H., Brandon, R., Kumar, S., Khan, S., Daniel, R., Lavin, M., 1990. Molecular
2 cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison
3 with other isolates. *J. Gen. Virol.* 71, 1737-46.
4
- 5 Dube, S., Dolcini, G., Abbott, L., Mehta, S., Dube, D., Gutierrez, S., Ceriani, C., Esteban, E., Ferrer, J.,
6 Poiesz, B., 2000. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from
7 Argentina. *Virology.* 277, 379-86.
8
- 9 Fechner, H., Blankenstein, P., Looman, A., Elwert, J., Geue, L., Albrecht, C., Kurg, A., Beier, D.,
10 Marquardt, O., Ebner, D., 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the
11 serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 237, 261-9.
12
- 13 Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A., 2003. ExPASy: the
14 proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784-3788.
15
- 16 Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program
17 for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
18
- 19 Higuchi, R., 1989. Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Perkin Elmer Cetus*
20 *Amplifications.* 2, 1-3.
21
- 22 Kelly, E., Jackson, M., Marsolais, G., Morrey, J., Callan, R., 1993. Early detection of bovine leukemia
23 virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 54, 205-9.
24
- 25 Kettmann, R., Couez, D., Burny, A., 1981. Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated
26 proviral DNA of bovine leukemia virus. *J. Virol.* 38, 27-33.
27
- 28 Klintevall, K., Ballagi-Pordany, A., Naslund, K., Belak, S., 1994. Bovine leukaemia virus: rapid
29 detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet.*
30 *Microbiol.* 42, 191-204.
31
- 32 Kuckleburg, C., Chase, C., Nelson, E., Marras, S., Dammen, M., Christopher-Hennings, J., 2003.
33 Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain
34 reactions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 72-6.
35
- 36 Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, IB., Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics
37 analysis software. *Bioinformatics.* 12, 1244-5.
38
- 39 Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., Gonzalez, E., Sentsui, H., 2002. Genetic
40 heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts.
41 *Virus Res.* 86, 101-10.
42
- 43 Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., Gonzalez, E., Sentsui, H., 2003. Provirus variants of
44 bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol.* 96, 17-23.
45
- 46 Mamoun, R., Morisson, M., Rebeyrotte, N., Busetta, B., Couez, D., Kettmann, R., Hospital, M.,
47 Guillemain, B., 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus *env* gene and its relevance to the
48 structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.* 64, 4180-8.
49

- 1 Molteni, E., Agresti, A., Meneveri, R., Marozzi, A., Malcovati, M., Bonizzi, L., Poli, G., Ginelli, E.,
2 1996. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *Zentralbl*
3 *Veterinarmed B.* 43, 201-11.
4
- 5 Portetelle, D., Mammerickx, M., Burny, A., 1989. Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test
6 for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp51. *J. Virol. Methods.* 23,
7 211-22.
8
- 9 Radostits, O., Blood, D., Gay C., 1995. Enzootic-bovine leukosis (bovine lymphosarcoma). In:
10 Radostits O, Blood D and Gay C (Eds), *Veterinary Medicine*, 8th Edn pp: 954-965. Bailliere Tindall,
11 London.
12
- 13 Reichert, M., Stec, J., 1999. Simultaneous use of two primer pairs increases the efficiency of
14 polymerase chain reaction assay in the diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Diagn.*
15 *Invest.* 11, 543-7.
16
- 17 Rice, N., Stephens, R., Couez, D., Deschamps, J., Kettmann, R., Burny, A., Gilden, R., 1984. The
18 nucleotide sequence of the *env* gene and the post *env* region of the bovine leukaemia virus. *Virology.*
19 138, 82-93.
20
- 21 Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Ohishi, K., Ogawa, Y., Ikawa, Y., 1985. Complete
22 nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other
23 retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82, 677-81.
24
- 25 Sudhir, N., Kumar, K., Koichiro, T., Tamura, I., Ingrid, B., Jakobsen, G., Masatoshi, N., 2001.
26 MEGA2: Molecular Evolutionary Genetic Analysis software, Arizona State University, Tempe,
27 Arizona, USA.
28
- 29 Thompson, JD., Gibson, TJ., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D., 1997. The CLUSTAL_X
30 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.
31 *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-82.
32
- 33 Willems, L., Thienpont, E., Kerkhofs, P., Burny, A., Mammerickx, M., Kettmann, R., 1993. Bovine
34 leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability. *J. Virol.* 67, 1086-9.
35

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

A)



B)



Figure 1. PCR diagnose and RFLP analysis of BLV isolated from bulk milk. A) Amplification of a 444 bp fragment of *env* BLV from bulk milk negative (lanes 1-7) and positive (lanes 8-12) to BLV ELISA test. NC: negative control; PC: positive control (444 bp fragment of *env* BLV cloned into TOPO-TA vector (Invitrogen)). B) RFLP analysis of 5 different bulk milks (1-5) digested with *Bam* HI, *Pvu* II and *Bcl* I, respectively. -: corresponds to a BLV negative herd sample. St: standard 1 Kb (Promega).

1
2
3 **Table 1.** Nucleotide and amino acid identity of the 400 bp fragment corresponding to the gp51 *env*
4 gene sequences of a representative group of BLV sequences registered in GenBank. Values are in
5 relation to the reference strain* (K02120; Sagata et al. 1985).

GenBank accession number	Geographic Origin	Nucleotide identity with reference strain* (%)	Amino acid identity with reference strain* (%)
K02120(*)	Japan	100,0	100,0
AB099335	Japan	99,2	99,2
D00647	Australia	99,0	98,4
AB099331	Japan	99,0	99,2
AF54784	Brazil	98,7	99,2
AB099330	Japan	98,7	98,4
AY078387	USA	98,7	99,2
AY151262	Brazil	98,5	97,6
AF399703	Brazil	98,5	99,2
S8353530	Italy	97,5	98,4
K02251	Belgium	97,2	99,2
AY515276	Chile	97,0	96,8
AY515280	Chile	97,0	100,0
AY185360	Brazil	97,0	98,4
M35238	France	97,0	98,4
AF399704	Brazil	97,0	98,4
AB099306	Argentina	97,0	98,4
AY515278	Chile	96,7	97,6
AB099327	Argentina	96,7	97,6
AB099319	Argentina	96,7	98,4
AY515274	Chile	96,5	97,6
AY515277	Chile	96,5	96,8
AY515275	Chile	96,5	100,0
U87872	Germany	96,5	98,4
AB099308	Argentina	96,5	98,4
AB099320	Argentina	96,5	96,9
AY515273	Chile	96,2	98,4
AF399702	Brazil	96,0	97,6
AY515279	Chile	96,0	97,6

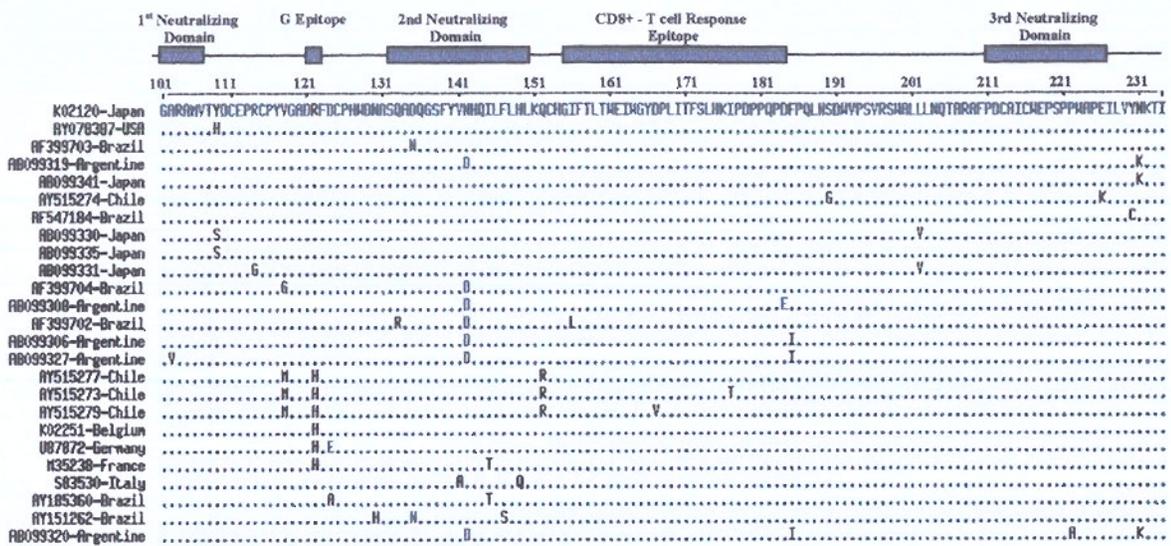
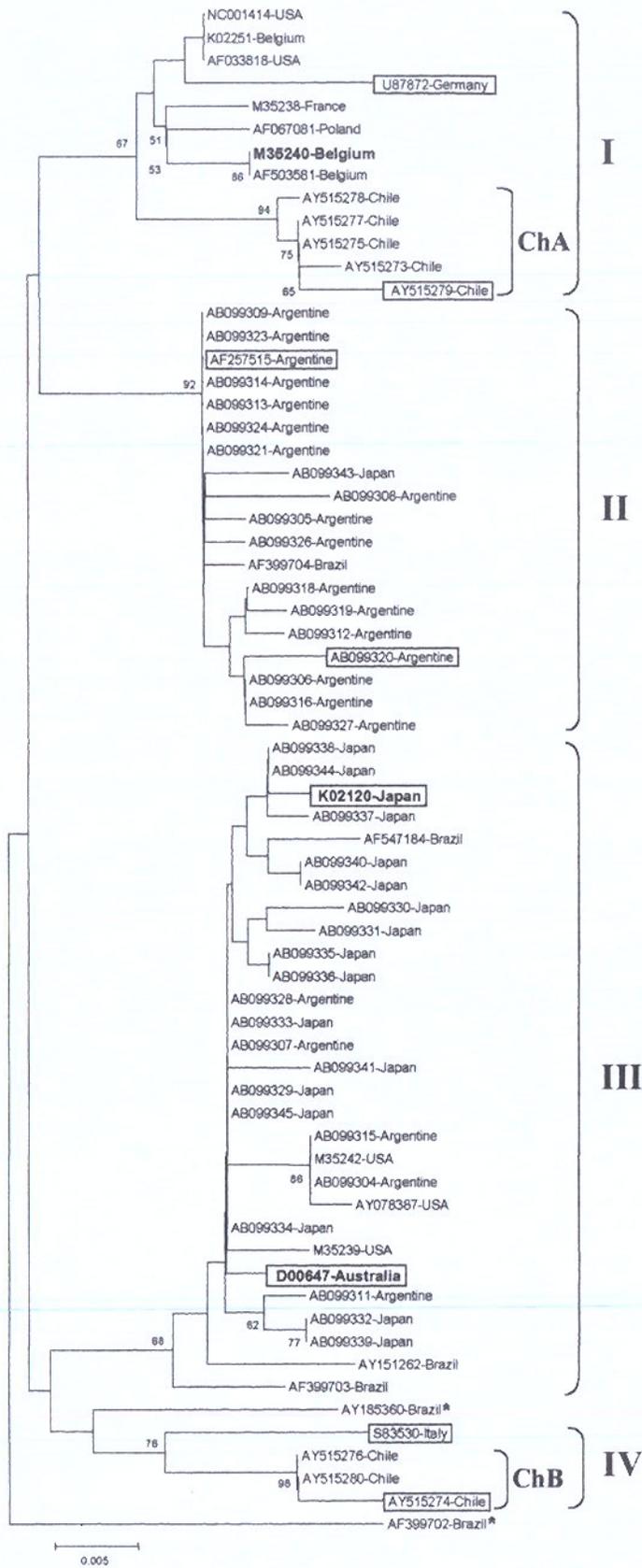


Figure 2. Amino acid sequence alignment of partial gp51 glycoprotein sequences. The amino acid sequences deduced from *env* BLV gene fragment of all 67 sequences were reduced to 25, which represent those sequences with at least one amino acid variation. GenBank accession numbers and geographical origin are indicated. The scale indicates amino acid position in the protein. Epitopes and domains previously described are indicated at the top of the figure. Conserved amino acid positions are indicated by dots.



1 **Figure 3.** Topology derived from neighbor joining analysis obtained of 400 bp *env* sequence of 67
2 BLV isolates. The GenBank accession numbers and geographical origin are indicated. Bootstrap values
3 are given at each furcation and values under 50% are not shown. Main clusters identified are indicated
4 by roman numerals. ChA and ChB indicate Chilean subgroups. *, indicates ungrouped isolates.
5 Sequences representing BLV variants previously classified as Belgium, Japanese and Australian groups
6 are shown in bold. Sequences proposed to evaluate classification of new *env* BLV variants are boxed.
7 Bar indicates the expected changes per site.

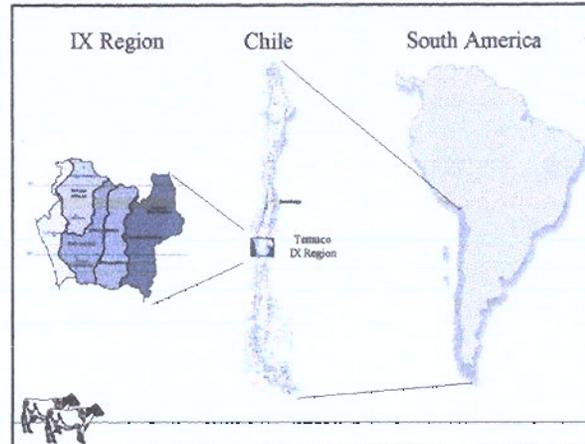
Anexo

Charla en curso de Bioinformática PASI 2004



Partial sequencing of *env* gene of bovine leukemia virus from Chilean samples and phylogenetic analysis.

Dr. Ricardo Felmer
Biotechnology Unit, INIA-Carillanca, Po Box 58-D, Temuco, Chile.
rfelmer@carillanca.inia.cl

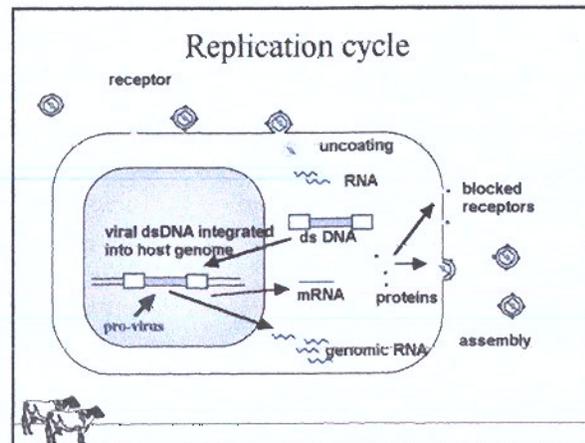
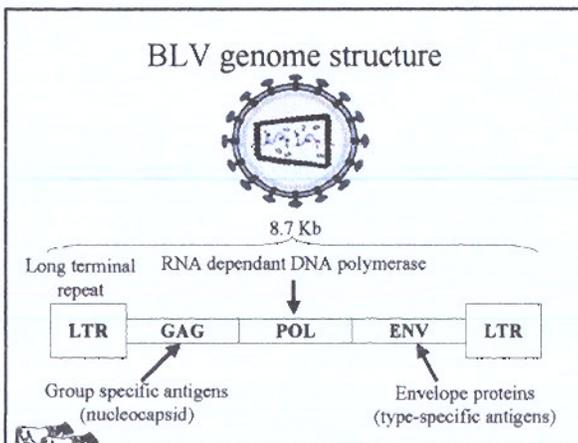
Bovine leukemia virus (BLV)

- Causative agent of enzootic bovine leukosis (EBL).
- Distributed worldwide.
- Primarily infects B cells of cattle.
- Strong long-lasting immune response.
- 1/3 of BLV-infected cattle may develop persistent lymphocytosis (PL).
- 1-5% of animals develop lymphosarcomas.
- Eradication Programs in most European countries.



Taxonomic structure of the Retroviridae family

Genera	Type species	Assigned abbreviations
<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Avian leukosis virus</i>	<i>ALV</i>
<i>Betaretrovirus</i>	<i>Mouse mammary tumor virus</i>	<i>MMTV</i>
<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Murine leukemia virus</i>	<i>MLV</i>
<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Bovine leukemia virus</i>	<i>BLV</i>
<i>Epsilon retrovirus</i>	<i>Walley dermal sarcoma virus</i>	<i>WDSV</i>
<i>Lentivirus</i>	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	<i>HIV-1</i>
<i>Spumavirus</i>	<i>Human foamy virus</i>	<i>HFV</i>

Transmission

- Transfer of blood lymphocytes
- Biting insects
- Needles, surgery equipment
- Sperm
- Milk?

Diagnosis

- Serology (AGID; ELISA)
- Direct methods (Virus isolation, PCR)

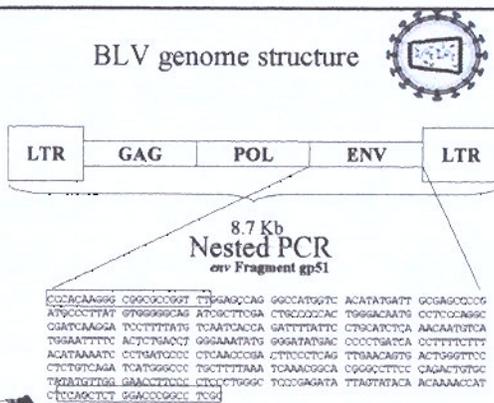


Purpose of the study

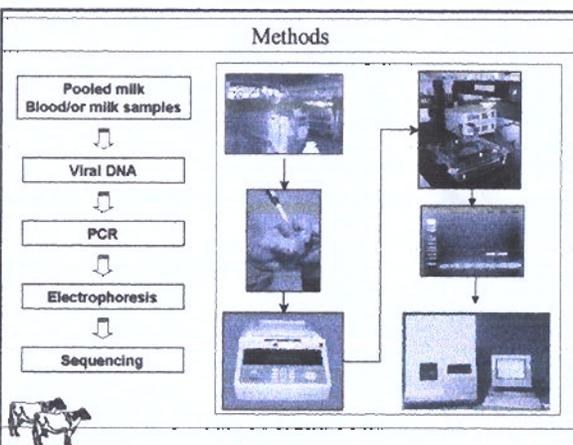
- To investigate if there are different BLV provirus variants in BLV infected cattle in Chile.
- To compare the extent of the variation of the well conserved region of the *env* gp51 gene sequence.
- To start molecular epidemiology studies.



BLV genome structure



Methods



Typing of BLV based on RFLP Analysis.



RFLP analysis of PCR amplicons for BLV. Lanes 1-5 are PCR amplicons for BLV, corresponding to 5 individual cows digested with *Bam* HI, *Pvu* II and *Bcl* I, respectively. St: 1 Kb and Phi X-174 Her III molecular markers, respectively.
-: Corresponds to a negative cow sample.

Table: Assignment of the Chilean isolates to the known subgroups of BLV proviruses based on RFLP

Country	Samples	Subgroup			
		Belgian	Australian	Japanese	Other
Chile	33	17	16	0	0

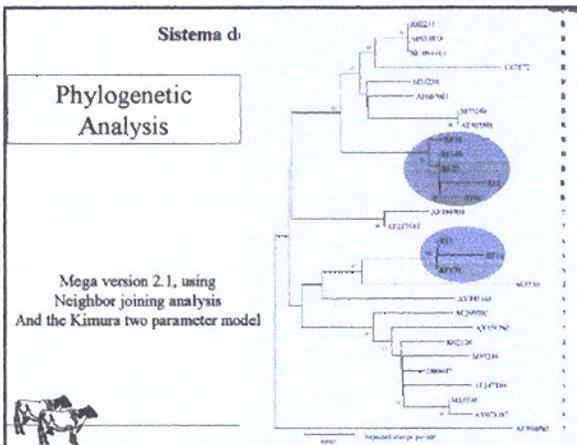
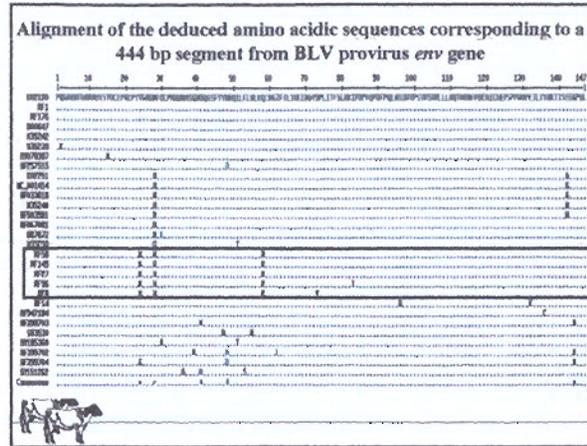
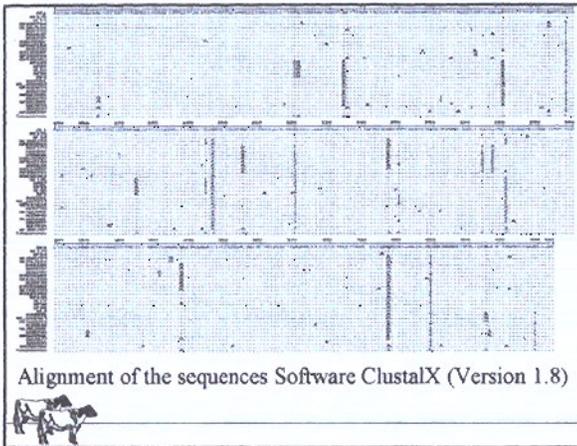


- Based on RFLP we found more than 1 BLV variant in some herds.

- One herd had 3 different variants.

- Others had a dominance of 1 variant.

This situation more likely reflect the travel of BLV infected cattle from other herds, containing different BLV provirus variants.



- We could observe two main clusters in it with chilean samples forming independent clusters in each other.
- Chilean samples formed independent cluster related to both European and japanese prototypes.
- Chilean BLV might have come from Europe and North america many years ago and developed individually.

- Three animals ELISA - PCR +
- Is this atypical course of BLV infection (characterized by decreased immunoreactivity) induced by a special BLV variant?
- Region we are searching is downstream of the region important for the formation of the Ab-inducing epitopes. F, G and H.

- Conclusions
- There are several BLV provirus variants in cattle from Chilean herds.
 - Different BLV provirus variants can be found in different geographical areas.
 - Chilean isolates show higher nucleotide variation and higher amino acid changes.
 - Serological test are not sufficient to detect BLV infected cattle (PCR necessary)
- Future work:
 Associations of genotypes and its relation to humoral responses in host.
 Sequencing of the whole genome.
 Modeling of protein structure.



Anexo

Charla en Seminario cierre de Proyecto Diciembre 2004



**Vigilancia de enfermedades bovinas basada en ELISA:
Su aplicación en rebaños lecheros de la IX Región.**

Javier Zúñiga Rabelledo
Bióquímico, Unidad de Biotecnología, INIA-Carfisna

Carifisna, Diciembre de 2004

Desarrollo y evaluación de un sistema para el monitoreo a gran escala de enfermedades de la vaca lechera (Brucelosis, Leucosis, IBR y DBV), basado en la inmunodetección por ELISA de anticuerpos específicos presentes en muestras de leche del tanque predial.

Ricardo Felner, Javier Zúñiga y Horelio Floody
Unidad de Biotecnología, INIA-Carfisna

Proyecto FA BIO1-01-P-35, 2002-2004

Objetivo General

Establecer las bases metodológicas de un sistema de vigilancia epidemiológica para las principales enfermedades del ganado lechero basado en ELISA indirecto sobre muestras de leche de tanques prediales.

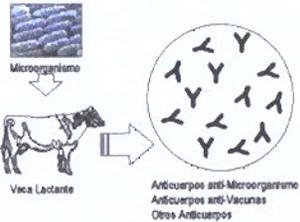
Objetivo Específicos

1. Evaluar la aplicación de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos e patógenos en muestras de leche de estanco predial.
2. Establecer la seroprevalencia de las principales enfermedades que afectan a los bovinos lecheros de la IX Región.
3. Establecer las bases para la aplicación de este sistema en MAUS programas de control y erradicación de estas enfermedades.

- Principios de la utilización del análisis de anticuerpos en la leche del estanco predial como indicador del estado sanitario de rebaños lecheros.
- Implementación del sistema en predios lecheros de la IX Región.
- Resultados.

- Principios de la utilización del análisis de anticuerpos en la leche del estanco predial como indicador del estado sanitario de rebaños lecheros.
- Implementación del sistema en predios lecheros de la IX Región.
- Resultados.

ANTICUERPOS EN LA LECHE BOVINA

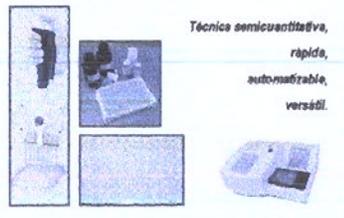


ANTICUERPOS EN EL ESTANQUE ENFRIADOR EN RELACION A LA CONDICION SANITARIA DEL REBAÑO*

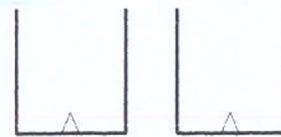
Condición del Predio	Predio Libre	Reproducción	Descontaminación	Sensanteante	Erradicación
Vacas Lechando					
Anticuerpos en el Estanco Enfriador	Nulos	Apreciables	Altos	Variables	Nulos

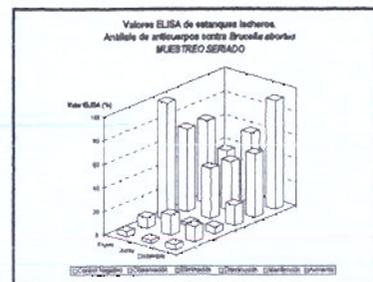
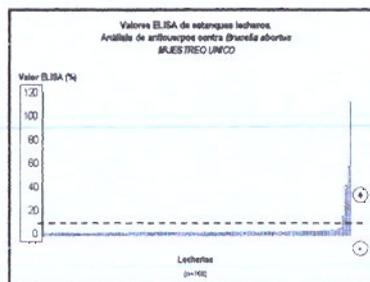
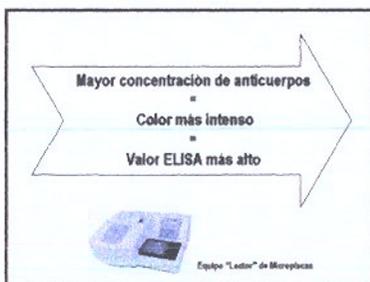
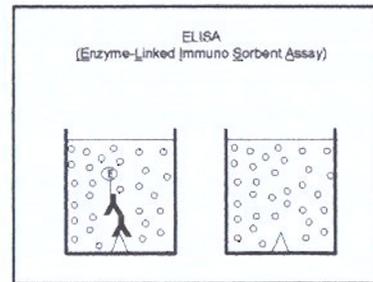
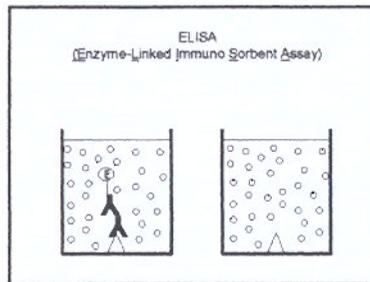
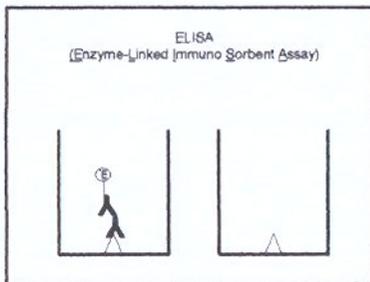
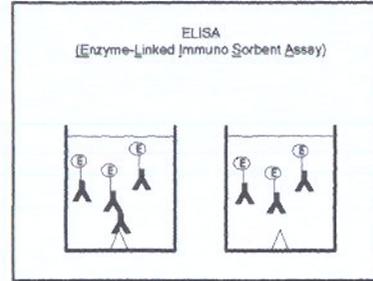
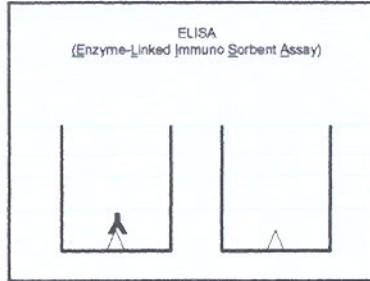
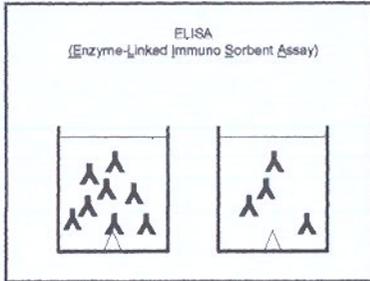
Vaca No Infeccionada Vaca Infeccionada

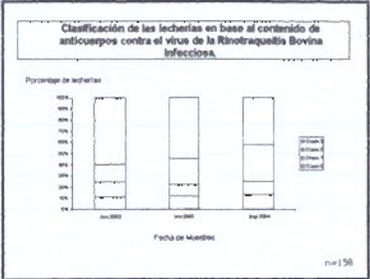
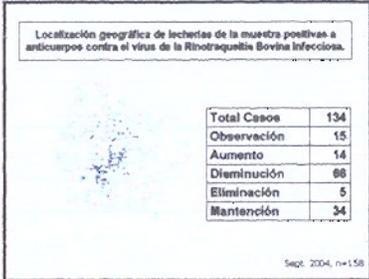
MEDICIÓN DE ANTICUERPOS EN LA LECHE DEL ESTANQUE ENFRIADOR A TRAVÉS DE LA PRUEBA ELISA



ELISA
(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)







Ficha Centro de Acopio A

| Fecha | Lechería | Comuna | Región | Provincia |
|----------|------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|
| 15/06/04 | Lechería 1 | Antofagasta | IV | Antofagasta |

Ficha Centro de Acopio B

| Fecha | Lechería | Comuna | Región | Provincia |
|----------|------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|-------------|--------|-------------|
| 15/06/04 | Lechería 1 | Antofagasta | IV | Antofagasta |

Conclusiones

- La situación de las cuatro enfermedades en la muestra de lecherías hacia fines de 2004 es distinta en cuanto a seroprevalencia, siendo brucelosis la menos prevalente y LEB, DVB e BR muy frecuentes.
- El análisis serológico de las muestras de leche de estancias predileas ecoplasta al análisis geográfico, permite la rápida identificación de rebaños con las patologías mencionadas.
- El sistema presentado tiene gran potencial para convertirse en un Sistema de Vigilancia para enfermedades infecciosas del bovino susceptibles de diagnóstico a través de la leche del estanco predile.

- Empresas e Instituciones Participantes**
- > Calín S.A. (Ex Parmalat)
 - > Sogrole
 - > Sotlat S.A.
 - > Servicio Agrícola y Ganadero
 - > Universidad de la Frontera
 - > Swedish University of Agricultural Sciences
 - > INIA Carilanca, Unidad de Biotecnología
 - > Fundación para la Innovación Agraria

- Colaboradores**
- > Mary Franca Christen Med. Vet. INIA-Carilanca
 - > Nelba Gaeta C. Ing. Agrónomo INIA-Carilanca
 - > Francisco Ampuero Med. Vet. SAG IX Región
 - > Waldo Bello Med. Vet. SAG IX Región
 - > César Hidalgo Med. Vet. SAG IX Región
 - > Patricia Avalos Med. Vet. Dr. SAG La Aguirre
 - > Norberto Bülandeck Med. Vet. Dr. Universidad San Sebastián
 - > Horacio Miranda Med. Vet. MSc. Universidad de la Frontera
 - > Stefan Alenius Med. Vet. PhD U. de Co. Agropecuarias (SLU), Suecia
 - > Karl Stahl Med. Vet. PhD U. de Co. Agropecuarias (SLU), Suecia

- Testistas**
- > Cristian Saubert Med. Vet. Universidad Católica de Temuco
 - > Ada López Ing. Agrónomo Universidad de La Frontera

Resultados ELISA estanco

Fono 215706 Anexo 305

Proyecto FIA BIOT-01-P-35, 2002-2004

Anexo

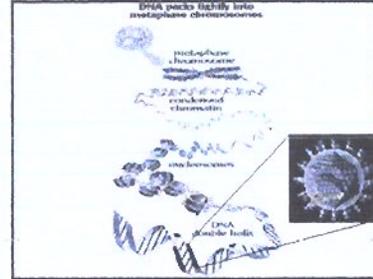
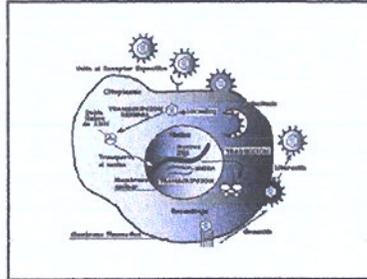
Charla en Seminario cierre de Proyecto Diciembre 2004

GOBIERNO DE CHILE
Ministerio de Educación

Aplicación de Herramientas Moleculares en el Diagnóstico de Enfermedades.

Ricardo Felmer D., Bioquímico, PhD
Unidad de Biotecnología, INIA-CRU Curilanco, Casilla 58-D, Temuco, Chile
rfelmer@curilanco.inia.cl

Proyecto FIA Biot 01-P-35



Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Ciclo básico de amplificación

ADN

Primer

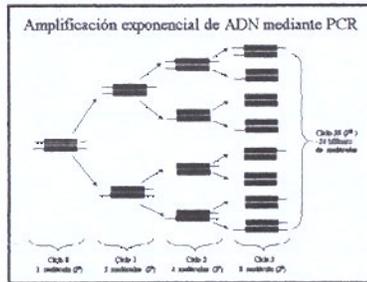
Polimerasa

Reactivos

Pase 1: Desnaturalización
1 min a 94°C

Pase 2: Apareamiento
45 seg a 55°C

Pase 3: Extensión
1 min a 72°C



Diagnóstico molecular de un virus basado en PCR

Muestra

Extracción de ADN

Reacción de PCR

Electroferesis

Fotografía

Resultado

Aplicaciones de la técnica de PCR

- Medicina forense y criminalística.
 - paternidades
 - identificación individuos
- Salud humana y veterinaria.
 - Diagnóstico de enfermedades infecciosas
 - Detección mutaciones
 - Diagnóstico de enfermedades genéticas (BLAD)
- Producción animal.
 - Genotipificación (R-caseta)
 - Mapas genéticos
- Investigación básica.
 - Expresión de genes
 - Filogenia, relaciones evolutivas.

Importancia del PCR en el diagnóstico viral

- Permite detectar un virus cuando la respuesta inmunológica es débil (ELISA en la zona gris).
- Permite diferenciar Ac maternas de una infección activa en animales jóvenes.
- Permite detectar un virus en material tóxico (semen) o en muestras de tejido fijadas en formalina.
- Al final de un programa de erradicación cuando la prevalencia es baja.

Epidemiología Molecular para el Control de Enfermedades

PCR

Electroferesis

Sequenciación

Comparación de secuencias con bases de datos (GenBank)

Árbol Filogenético

Diagrama epidemiológico

Aplicaciones de la Epidemiología Molecular

- > Permite monitorear la aparición de nuevas variantes genéticas de un virus.
- > Permite subtipificar el virus para estudios epidemiológicos.
- > Proporciona información filogenética del origen evolutivo de un virus.
- > Sirve para trazar el movimiento de animales.



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA

Estudio 1
Diagnóstico molecular del virus de la leucosis bovina (VLB) mediante PCR y su relación filogenética con cepas descritas en el mundo.

Proyecto FIA Biot 01-P-35

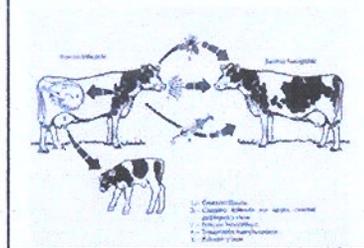
Introducción

- Enfermedad**
- > Distribución mundial
 - > Animales mayores de 2 años de edad
 - > Respuesta inmune humoral permanente
 - > 30% desarrolla Linfocitosis persistente (LP)
 - > 1-5 % desarrolla tumores

Agente causal

- > Retrovirus de la familia *Retroviridae*
- > Virus RNA de cadena simple
- > Infecta principalmente linfocitos B induciendo la transformación tumoral de la célula huésped

Mecanismos de transmisión de la Leucosis



Pruebas de Diagnóstico de Laboratorio

- > Hematología
 - Detección de animales con linfocitosis persistente
- > Métodos serológicos
 - AGID (Agar gel inmunodifusión)
 - ELISA
- > Detección directa del virus o componentes virales
 - Aislamiento viral
 - PCR

Objetivo del estudio

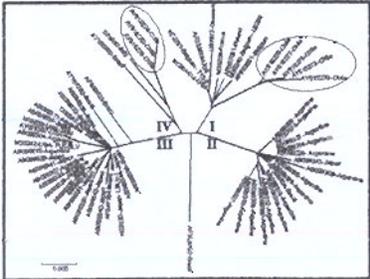
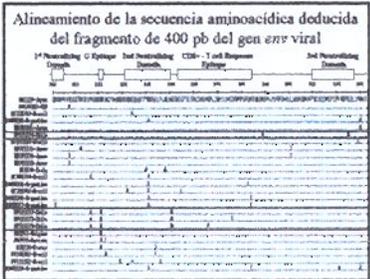
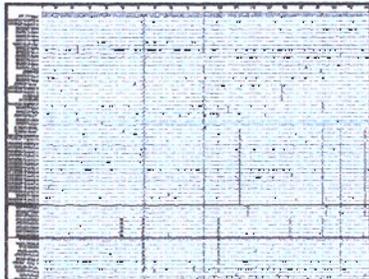
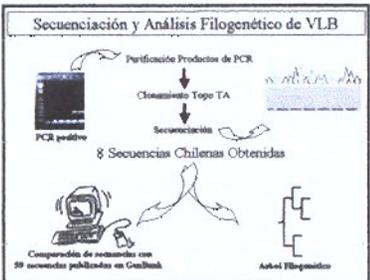
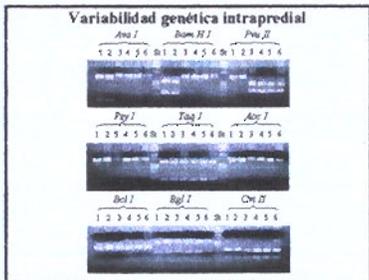
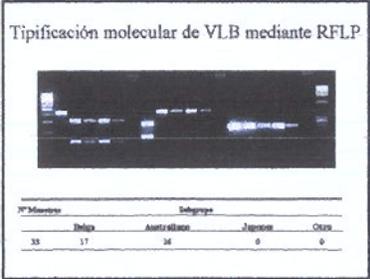
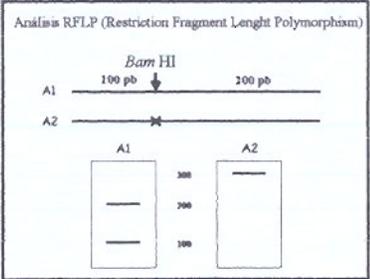
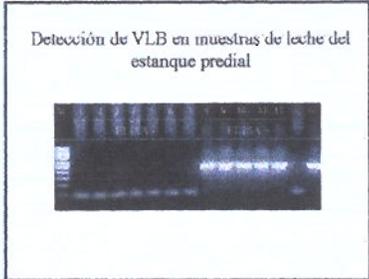
Evaluar la factibilidad de aplicar una prueba de PCR a muestras de leche, para el diagnóstico y tipificación molecular del virus de la leucosis bovina (VLB).

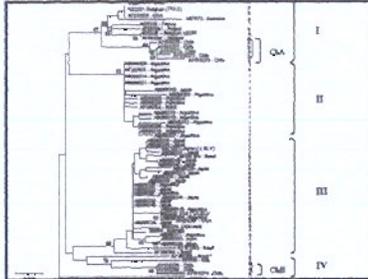
- Investigar la presencia de diferentes variantes genéticas de VLB en nuestros rebaños.
- Iniciar estudios acerca de la epidemiología molecular del virus.



Deteción de BLV mediante PCR anidado

1.- Rebaño con antecedentes. Muestras de suero de 7 animales positivos a ELISA >1.0 Valor PP





Conclusiones

- Es posible utilizar leche del estanque preal para diagnosticar y tipificar el virus de la leucosis bovina.
- Existen diferentes variantes genéticas de VLB en los rebaños analizados.
- Las secuencias Chilenas tienen una mayor divergencia genética y las mutaciones encontradas resultan en cambios aminocídicos en la proteína gp51 no descritas anteriormente.
- Existen 4 grupos filogenéticos de VLB con las secuencias Chilenas contenidas en 2 clusters independientes.

COMERCIO DE CHILE
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Estudio II

Estudio comparativo de PCR como prueba directa versus ELISA y AGID como pruebas indirectas para la detección del virus de la leucosis bovina.

Marcela Recabal
Estudiante de Medicina Veterinaria
Universidad Católica de Temuco

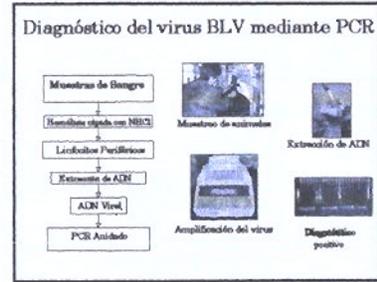
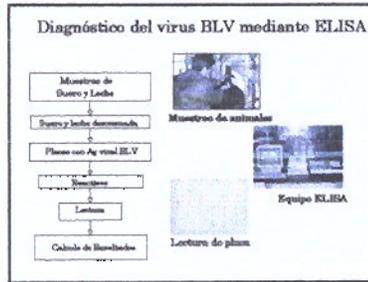
Objetivo General

➤ Establecer la correlación entre diferentes pruebas de diagnóstico para el virus de la leucosis bovina en muestras de leche y suero.

MATERIALES Y METODO

MATERIALES

- **Animales:** 126 Vacas lecheras de un predio de la Comuna de Freire.
- **Muestras:** Sangre, suero y leche.
- **AGID:** Muestras de suero fueron analizadas en un laboratorio externo acreditado.



Detección del virus de la leucosis bovina mediante distintos métodos analíticos.

	+	-	Total
AGID	75	51	126
ELISA suero	100	26	126
ELISA leche Test 1	100	26	126
ELISA leche Test 2	97	29	126
PCR sangre	100	26	126

ELISA	IDGA			Total
	+	-		
	+	75	26	
-	5	21	26	
Total	75	51	126	
Sensibilidad: 100%				
Especificidad: 51%				
Concordancia kappa: 0.55				

PCR sangre	IDGA			Total
	+	-		
	+	72	28	
-	3	23	26	
Total	75	51	126	
Sensibilidad: 96%				
Especificidad: 45%				
Concordancia kappa: 0.45				

Mayo 2003

	AGID	ELISA (Leche)	ELISA (Suero)	PCR (Sangre)
ID 2885	-	-	-	+
ID 4192	-	-	-	+
ID 2888	-	-	-	+

Junio 2004

	ELISA (Leche)	PCR (Sangre)
ID 2885	-	+
ID 4192	-	+
ID 2888	?	?
(Eliminada)		

CONCLUSIONES

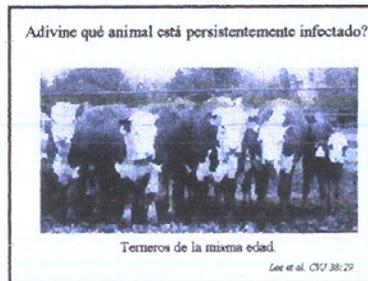
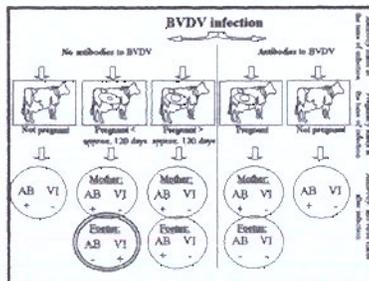
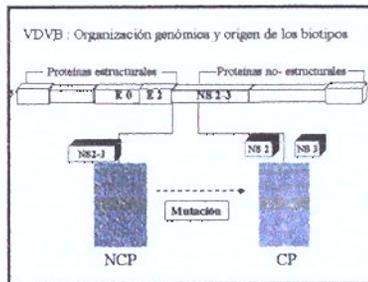
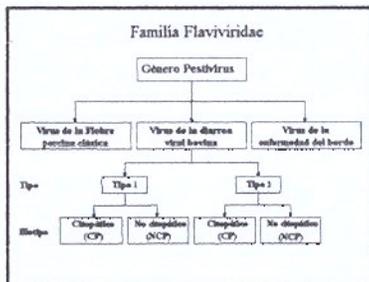
• Las pruebas de PCR en sangre y el ELISA en suero y leche detectaron un mayor número de animales positivos (25 %) que la prueba IDGA.

• La menor especificidad diagnóstica obtenida por el ELISA y PCR, no es debido a reacciones falso positivas de estas pruebas sino más probablemente a la mayor sensibilidad de las mismas.

• No es suficiente detectar a los animales infectados sólo mediante pruebas serológicas y los métodos directos, tales como el PCR deben ser utilizados en forma complementaria ya que aportan información adicional acerca de la infección en un predio.


Estudio III
Estudios moleculares relacionados al virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB).

Proyecto FIA Biot 01-P-35



Pruebas de Diagnóstico de Laboratorio

► Métodos serológicos

- Neutralización viral (NV)
- ELISA

► Detección directa del virus o componentes virales

- Aislamiento viral (VI)
- Citometría de flujo (FACS)
- ELISA de captura (ELISA antígeno)
- RT-PCR

Antecedentes

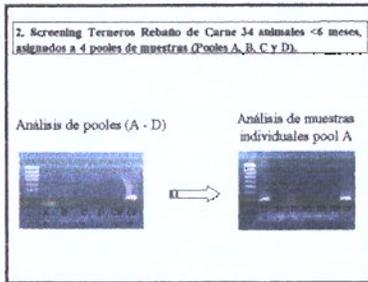
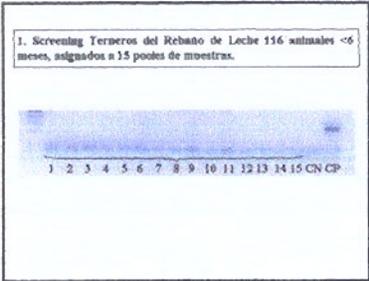
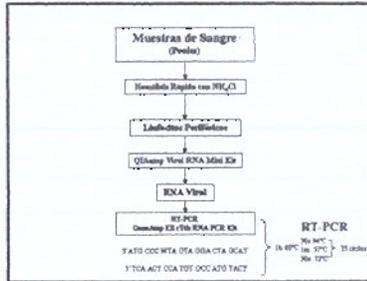
Dic 2002

> Varios terneros de entre 1 y 5 meses mueren en un periodo de menos de 1 mes, presentando alguno de los siguientes signos:

- Diarrea moderada
- Neumonía aguda
- Temperatura elevada

> ELISA Estanteque pretrial >1.5 Valor PP

En base a la sintomatología se sospechó de diarrea viral y se aplicó prueba RT-PCR para detectar el virus en terneros del lote afectado.



3.- Portador identificado y aislado.

Ternero Persistentemente Infectados (PI)

PI Puede Infectar > 90% del ganado en 4 meses (House et al., 1993)

ID Muestra	07 Feb 2003		04 Abr 2003	
	S/P	Reacción	S/P	Reacción
13	1.87	+	0.89	+
400	1.07	+	1.16	+
486	2.08	+	1.77	+
488	0.80	+	1.81	+
490	0.06	-	1.67	+
496	3.37	+	2.32	+
600	0.98	+	1.09	+
604	2.25	+	1.78	+
608	0.04	-	1.31	+
511	1.84	+	1.81	+
513	1.18	+	1.28	+
514	1.27	+	2.01	+
517	2.84	+	1.08	+

Conclusiones

- Se estableció un método RT-PCR para el diagnóstico molecular de DVB
- Es posible utilizar este método en pools de muestras para detectar terneros persistentemente infectados (PI).
- Un ternero PI es la principal fuente de infección en un rebaño por lo que deben extremarse las medidas para evitar su ingreso en un rebaño susceptible.

CONSEJO DE ORELE

Estudio IV

EVALUACION DE UN MÉTODO PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE CEPAS DE CAMPO Y VACUNALES (RR51 - S19) DE *B. abortus*

Cristian Sauterel
Estudiante de Medicina Veterinaria
Universidad Católica de Temuco

Objetivo General

> Implementar un método de PCR capaz de diferenciar cepas vacunales de las cepas de campo.

INTRODUCCIÓN

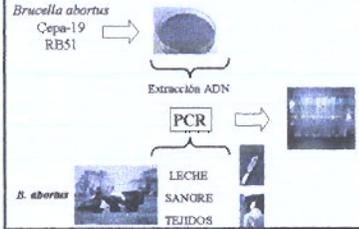
- La brucelosis bovina es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas, a través de alteraciones reproductivas, siendo el aborto el signo visible y más importante de la enfermedad.
- Es una enfermedad zoonótica.
- Cultivo microbiológico

Tiempo ← → Peligroso

Pruebas de Diagnóstico de Laboratorio

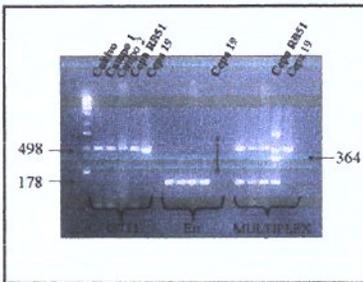
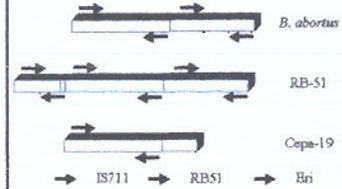
- Cultivo bacteriano
- Fijación de complemento
- Rosa bengala
- Prueba del anillo (Ring test)
- Fluorescencia polarizada
- ELISA
- PCR

Materiales y Métodos

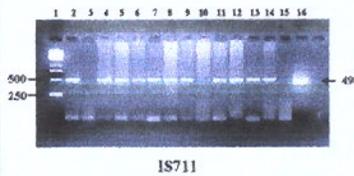


Detección de *B. abortus* mediante PCR y diferenciación de cepas vacunales de cepas de campo

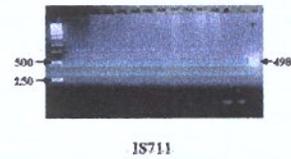
(Bricker y Hötzel (1996) National Veterinary Services Laboratories (USA))



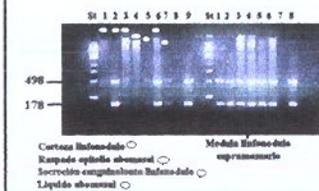
Detección de *B. abortus* en muestras de leche



Detección de *B. abortus* en muestras de sangre



Detección de *B. abortus* en muestras de matadero



Conclusiones

- El ensayo PCR fue capaz de diferenciar cepa de campo y cepas vacunales (RBS1-S19) en muestras de cultivo de *B. abortus*.
- El ensayo PCR detectó *B. abortus* en muestras de leche y médula de linfonódulo supramamario de vaca.
- No fue posible detectar *B. abortus* en muestras de sangre.

Agradecimientos



Anexo

Charla en Seminario/Taller USACH INIA


**Utilización de Biotecnología en la
 Detección de Enfermedades en el
 Ganado Bovino**

*Ricardo Felmer D.
 Bioquímico, PhD
 Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca*



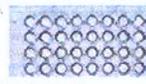
Biotecnología Animal

Salud Animal

- > Diagnóstico y epidemiología de enfermedades.
- > Producción de vacunas
 - Vacunas recombinantes (ADN).
 - Vacunas trazadoras (marcadoras).
 - Vacunas en forrajeras (plantas transgénicas)
 - Ac monoclonales en leche de animales transgénicos



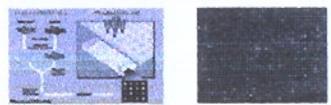
Pruebas de Diagnóstico de Laboratorio

- > Detección de la respuesta inmune.
 - > Prueba de neutralización
 - > AGID
 - > ELISA, microELISA
 (Indirecta, detección de "huecos" del patógeno)
 
- > Detección directa del virus.
 - > Aislamiento viral
 - > Inmunohistoquímica
 - > ELISA de capturas
 - > PCR
 (Directa, detección del patógeno)
 



Sistema de Monitoreo Propuesto

> ChIP-Based: Protein-array, Oligo-array




Enfermedades en bovinos asociadas a:

- > Disminución de la producción.
- > Pérdidas por muertes, abortos y malformaciones.
- > Aumento de lapso interparto.
- > Inmunodepresión.
- > Barreras a la exportación.



Programas de Control/Eradicación basados en:

- > Identificación de rebaños positivos (Vigilancia).
- > Aplicación de medidas de control y erradicación.
- > Programa de certificación de la condición de predios libres.

Identificación de rebaños positivos caracterizado por:

- > Empleo de técnicas diagnósticas con baja sensibilidad.
- > Aplicables a muestras de suero, a nivel individual.
- > Bajo potencial de automatización.



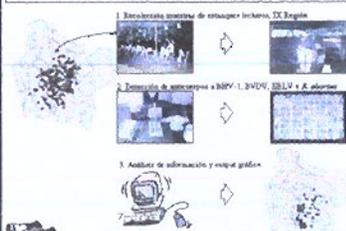
**Requerimientos de un sistema
 de monitoreo y vigilancia epidemiológica**

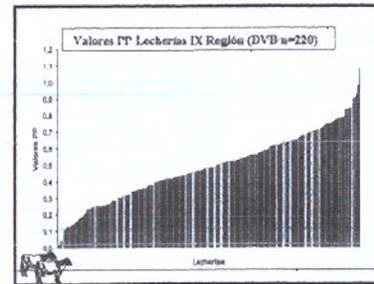
- > Mayor sensibilidad y especificidad
- > Mayor capacidad de análisis
- > Más rapidez
- > Posibilidad de automatización
- > Costos aceptables

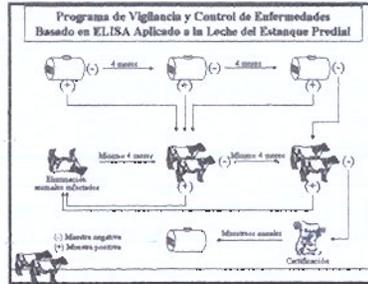
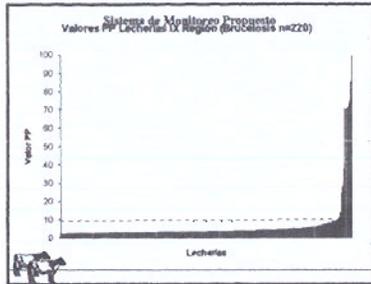


Monitoreo de enfermedades en bovinos basado en ELISA:

1. Recolección muestra de suero de lecherías, IX Región
2. Identificación de sueros con BVD, IBRD, BVD y 4 otros
3. Análisis de información y report gráfico

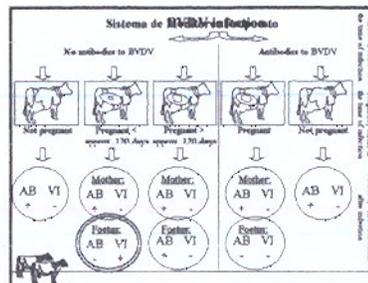
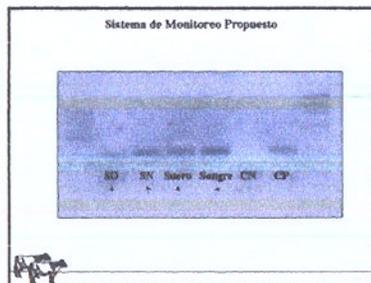
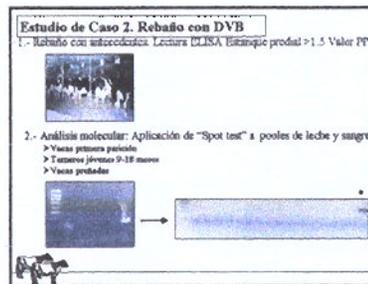
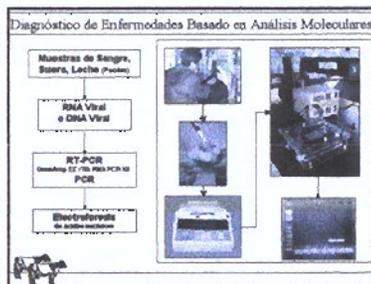




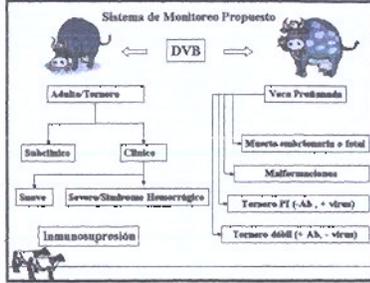
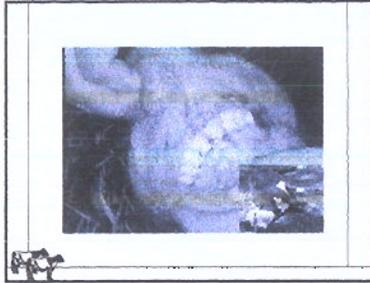


Estado de Caso 1. Rebaño con Brucellosis

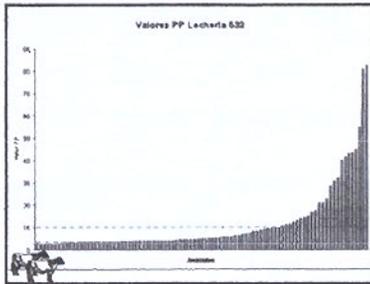
Muestra	VALORES		VALORES
	ELISA	ELISA	
101	0.00	0.00	0.00
102	0.00	0.00	0.00
103	0.00	0.00	0.00
104	0.00	0.00	0.00
105	0.00	0.00	0.00
106	0.00	0.00	0.00
107	0.00	0.00	0.00
108	0.00	0.00	0.00
109	0.00	0.00	0.00
110	0.00	0.00	0.00
111	0.00	0.00	0.00
112	0.00	0.00	0.00
113	0.00	0.00	0.00
114	0.00	0.00	0.00
115	0.00	0.00	0.00
116	0.00	0.00	0.00
117	0.00	0.00	0.00
118	0.00	0.00	0.00
119	0.00	0.00	0.00
120	0.00	0.00	0.00
121	0.00	0.00	0.00
122	0.00	0.00	0.00
123	0.00	0.00	0.00
124	0.00	0.00	0.00
125	0.00	0.00	0.00
126	0.00	0.00	0.00
127	0.00	0.00	0.00
128	0.00	0.00	0.00
129	0.00	0.00	0.00
130	0.00	0.00	0.00
131	0.00	0.00	0.00
132	0.00	0.00	0.00
133	0.00	0.00	0.00
134	0.00	0.00	0.00
135	0.00	0.00	0.00
136	0.00	0.00	0.00
137	0.00	0.00	0.00
138	0.00	0.00	0.00
139	0.00	0.00	0.00
140	0.00	0.00	0.00
141	0.00	0.00	0.00
142	0.00	0.00	0.00
143	0.00	0.00	0.00
144	0.00	0.00	0.00
145	0.00	0.00	0.00
146	0.00	0.00	0.00
147	0.00	0.00	0.00
148	0.00	0.00	0.00
149	0.00	0.00	0.00
150	0.00	0.00	0.00
151	0.00	0.00	0.00
152	0.00	0.00	0.00
153	0.00	0.00	0.00
154	0.00	0.00	0.00
155	0.00	0.00	0.00
156	0.00	0.00	0.00
157	0.00	0.00	0.00
158	0.00	0.00	0.00
159	0.00	0.00	0.00
160	0.00	0.00	0.00
161	0.00	0.00	0.00
162	0.00	0.00	0.00
163	0.00	0.00	0.00
164	0.00	0.00	0.00
165	0.00	0.00	0.00
166	0.00	0.00	0.00
167	0.00	0.00	0.00
168	0.00	0.00	0.00
169	0.00	0.00	0.00
170	0.00	0.00	0.00
171	0.00	0.00	0.00
172	0.00	0.00	0.00
173	0.00	0.00	0.00
174	0.00	0.00	0.00
175	0.00	0.00	0.00
176	0.00	0.00	0.00
177	0.00	0.00	0.00
178	0.00	0.00	0.00
179	0.00	0.00	0.00
180	0.00	0.00	0.00
181	0.00	0.00	0.00
182	0.00	0.00	0.00
183	0.00	0.00	0.00
184	0.00	0.00	0.00
185	0.00	0.00	0.00
186	0.00	0.00	0.00
187	0.00	0.00	0.00
188	0.00	0.00	0.00
189	0.00	0.00	0.00
190	0.00	0.00	0.00
191	0.00	0.00	0.00
192	0.00	0.00	0.00
193	0.00	0.00	0.00
194	0.00	0.00	0.00
195	0.00	0.00	0.00
196	0.00	0.00	0.00
197	0.00	0.00	0.00
198	0.00	0.00	0.00
199	0.00	0.00	0.00
200	0.00	0.00	0.00
201	0.00	0.00	0.00
202	0.00	0.00	0.00
203	0.00	0.00	0.00
204	0.00	0.00	0.00
205	0.00	0.00	0.00
206	0.00	0.00	0.00
207	0.00	0.00	0.00
208	0.00	0.00	0.00
209	0.00	0.00	0.00
210	0.00	0.00	0.00
211	0.00	0.00	0.00
212	0.00	0.00	0.00
213	0.00	0.00	0.00
214	0.00	0.00	0.00
215	0.00	0.00	0.00
216	0.00	0.00	0.00
217	0.00	0.00	0.00
218	0.00	0.00	0.00
219	0.00	0.00	0.00
220	0.00	0.00	0.00



ID Muestra	STIA2003		SIAH-2003	
	SP	Siendón	SP	Siendón
13	1.47	+	0.99	+
480	1.01	+	1.18	+
483	1.08	+	1.77	+
488	0.98	+	1.61	+
490	0.06	-	1.07	+
495	1.37	+	3.82	+
500	0.89	+	3.00	+
508	1.35	+	1.76	+
509	0.04	-	1.51	+
511	1.36	+	1.51	+
513	1.18	+	1.28	+
514	1.37	+	1.01	+
517	1.84	+	1.08	+

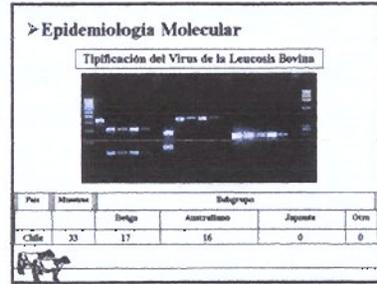


Otras aplicaciones de la biotecnología



Problema Lechería 632 (10 epidemiológicos)

País	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100



Secuenciación

1 CACAA GAGC GGGG GGGT GAGC CAGG CAGT GTCG ATAG ATTC
 51 GAGC GAGG GCGT TATG GAGG GAGT GAGT GAGT GCGC CAGT
 101 GAGC ATTC TCGA GCGG ATCA TATC GCTT ATTC AATC CAGC
 151 TTTA TTTC GCGC TCGA GAGC TATG GATC TTAG TCGA CCGC
 201 GAGC ATTC GAGT GAGC CCGA TATC TTTC TTAC ATAA ATTC
 251 TATC CCGC GAGC GAGC TATC GATC GAGC ATTC TATC TATC
 301 CCGC GAGC ATTC GCGC GCGC GCGC GCGC GCGC GCGC GCGC
 351 GAGC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC
 401 TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC TATC

Alineamiento Secuencias Nucleotídicas

Alineamiento de Secuencias Aminoácidas

Anexo

Poster presentado en Symposium FAO/IAEA

Use of DNA from Milk Tank for Diagnostic and Typing of Bovine Leukosis Virus

Felmer R., Zúñiga J., Recabal M. and Floody H. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Unidad de Biotecnología - Casilla 58-D, Temuco - Chile. Contact: rfelmer@carillanca.inia.cl

INTRODUCTION

Bovine Leukemia Virus (BLV) is an oncogenic retrovirus distributed worldwide. Most BLV-infected cattle are clinically normal during their lifetime, with only 1-5% eventually developing lymphosarcoma. However, up to one-third of BLV-infected cattle may develop persistent lymphoplasia (PL), a neoplastic expansion of infected T-lymphocytes (Radostits et al., 1995). Eradication and control of the disease is based on early diagnostic and seroprevalence of infected animals (such as agar gel diffusion assay (AGID). Serological tests such as agar gel assay (AGISA) are the best of choice for international trade because they are easy to perform, economically viable and capable of testing a large number of animals. However, serological tests do not determine maternal passive antibodies from an alive immune response and do not provide evidence of the infection in the early stages of infection. New methods for the detection of BLV antibodies in milk have been developed, such as the use of monoclonal antibodies and filter negative reactions coated by the immaturity of the immune system (Fischer et al., 1996). Within the direct methods, the polymerase chain reaction (PCR) is being increasingly used for the diagnosis of infectious diseases. Because of its high sensitivity PCR can be used in epidemiological campaigns where samples are difficult to obtain. However, the use of PCR in samples which have acquired immunity by passive transfer of immunoglobulins through the colostrum. Lastly, PCR may detect variants of BLV proviruses, which may not react with standard antibodies in routine serological tests.

OBJECTIVE

With the aim of achieve a better understanding of the epidemiology of BLV infection, we investigated the variability of milk tank samples in our country and the epidemiology studies of BLV in the Southern Region of Chile.

METHODS

SEROLOGICAL SURVEY FOR ANTIBODIES TO BLV IN MILK TANKS

PREPARE DNA FROM POSITIVE MILK TANKS

PCR AMPLIFICATION OF A 444 bp FRAGMENT OF THE BLV *env* GENE

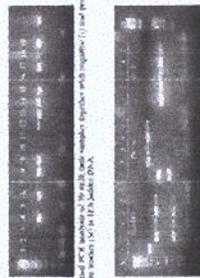
RELP ANALYSIS OF THE AMPLIFIED FRAGMENT TO TYPE THE SEQUENCE

CLONING, SEQUENCING AND SEQUENCE ANALYSIS OF SELECTED CLONES

PHYLOGENETIC ANALYSIS EMPLOYING NEIGHBOUR JOINING METHOD

RESULTS

PCR Amplification and Typing of a 444 bp Fragment of the BLV Provirus *env* Gene

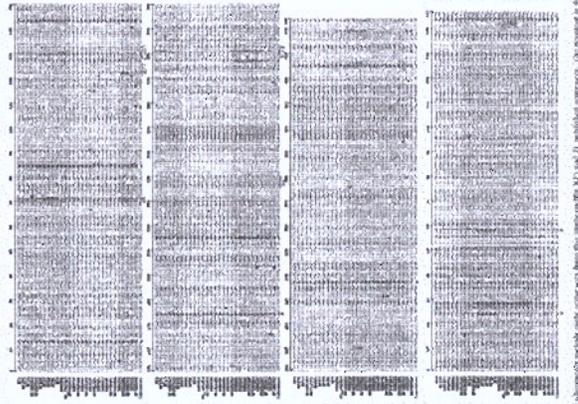


Results of the PCR amplification of the BLV *env* gene region (444 bp) from milk tank samples (1-10) and positive (11) and negative (12) controls. The size marker (100 bp) is in lane 1.

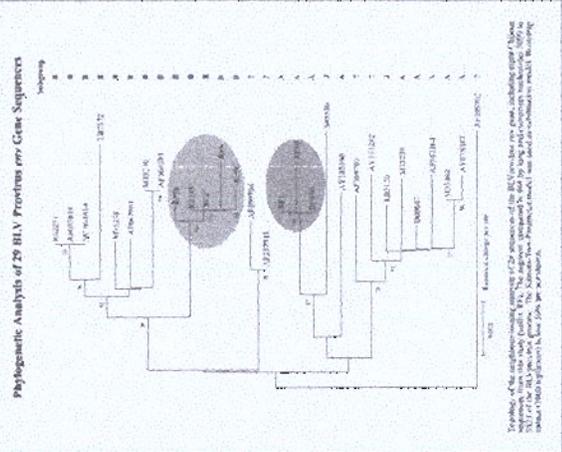
Sample	Fragment Size (bp)
1	100
2	444
3	444
4	444
5	444
6	444
7	444
8	444
9	444
10	444
11	444
12	444

Final results of the DNA typing of 11 Chilean BLV provirus isolates from the 12 Region by RFLP analysis.

Alignments for Nucleotide and Deduced Aminoacid Sequences from the BLV Provirus *env* Gene



Alignments for Nucleotide and Deduced Aminoacid Sequences from the BLV Provirus *env* Gene. The sequences were aligned using the Clustal W program. The gaps were indicated by dashes. The scale bar represents 10% divergence.



Phylogenetic Analysis of 29 BLV Provirus *env* Gene Sequences

Topology of the nucleotide sequence (29) of the BLV *env* gene from the milk tank isolates from Chile is shown. The scale bar represents 10% divergence. The gaps were indicated by dashes. The scale bar represents 10% divergence.

CONCLUSIONS

- Milk tank samples are suitable for diagnosis and typing of BLV provirus.
- Two of the known subgroups of BLV provirus are present in dairy herds of the Chilean region evaluated in this study.
- The Chilean isolates possess unique nucleotide sequences that differentiate them from other known BLV *env* sequences.

BIBLIOGRAPHY

Chadwick et al. 1996. Molecular cloning and sequencing of an avian influenza virus hemagglutinin gene DNA: comparison with other influenza A (Can. Virus) (pp. 151-157) -
 Fischer et al. 1996. Application of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukosis virus (BLV) infection in naturally infected cattle. J. Vet. Microbiol. 41: 627-636
 Siqueira et al. 1983. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus. Biochemistry 22: 511-515
 Radostits et al. 1995. Proceedings of the 10th International Symposium on Bovine O. (pp. 11-13) and
 Ory C. 1994. Veterinary Microbiology, pp. 149-160. (Intelligence Press), London
 Jahnke et al. 1995. The nucleotide sequence of the *env* gene and the putative origin of the bovine leukemia virus.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Carolina Medina for helping in the Phylogenetic analysis. This work was supported by grant from Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) through the project FONDECYT 1990001.

Anexo

Poster presentado en CEPAL Junio 2001



Detección de Anticuerpos a Patógenos Bovinos en Muestras de Leche de Tanque Predial Mediante Prueba ELISA Indirecta

Ricardo Felmer D., Javier Zúñiga R. y Horacio Floody A.

GOBIERNO DE CHILE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS

Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) CRI Carillanca, Unidad de Biotecnología.
Camino Cajón-Vilcún s/n Km 10, Casilla 58-D, Temuco, IX Región, Chile

RESUMEN

Uno de los factores que afecta a la producción lechera del país es la presencia de enfermedades que disminuyen la fertilidad y la producción de los rebaños. Entre éstas se pueden mencionar la brucelosis, leucosis, IBR y DBV.

Las pruebas diagnósticas que se utilizan en la actualidad para las diferentes patologías son confiables. Sin embargo, su naturaleza no permite aplicarlas en forma masiva al ganado lechero, sin elevar al mismo tiempo los costos de muestreo y análisis. Esto dificulta la adecuada cuantificación de prevalencias, al no contar con datos que representen a toda la masa bovina. Del mismo modo, una vez que la erradicación se produce, existe la necesidad de monitorear la salud del rebaño constantemente, a fin de detectar brotes y controlarlos a tiempo. Las características de los análisis de hoy, que requieren muestras individuales de suero de cada animal, impiden una vigilancia adecuada en toda la masa bovina susceptible.

En este contexto, el proyecto plantea introducir un sistema de vigilancia de amplia cobertura aplicado a las enfermedades señaladas, que ha sido utilizado con éxito por otras naciones para asistir sus programas de control/erradicación de las enfermedades de la vaca lechera.

El sistema está basado en la técnica ELISA, que permite detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas directamente en muestras de leche, permitiendo aplicar el sistema al monitoreo del tanque predial.

Las ventajas de contar con un sistema basado en esta tecnología son: su alta sensibilidad, gran capacidad de análisis y potencial de automatización. Estas características, sumadas a la infraestructura existente en laboratorios de control lechero, permitirán establecer planes de vigilancia de gran cobertura.

OBJETIVO GENERAL

Establecer las bases tecnológicas de un sistema de vigilancia epidemiológica para las principales enfermedades del ganado bovino, basado en ELISA indirecto sobre muestras de leche de tanques prediales

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la aplicación de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos a patógenos bovinos en muestras de leche de tanque predial
2. Establecer la prevalencia de las principales enfermedades que afectan al bovino lechero en la IX Región
3. Establecer y discutir recomendaciones para muestreo de tanques y futuros programas de control para BVDV e IBR en la IX Región basados en la tecnología propuesta

PRINCIPALES PRODUCTOS ESPERADOS

-Conocer la seroprevalencia de las principales enfermedades del ganado lechero en la IX Región. A partir de esta información será posible definir acciones prioritarias tendientes al control de estas enfermedades.

-Disponer de un sistema que permita el monitoreo permanente y a bajo costo del status sanitario del rebaño lechero.

COLABORADORES

Stefan Alénius
Francisco Ampuero M.
Norberto Butendieck B.
Mary France Christen
Carlos Concha B.
Horacio Miranda

Swedish University of Agricultural Sciences
SAG IX Región
SURLAT S.A.
Lab. Cal. Leche, INIA Carillanca
National Veterinary Institute, Suecia
Universidad de La Frontera

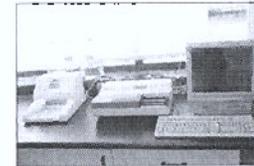
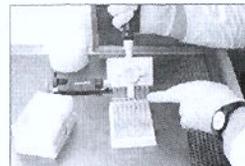
METODOLOGIA



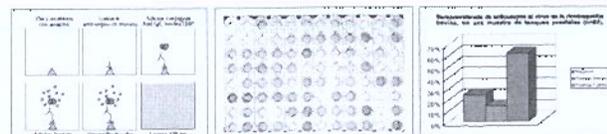
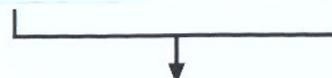
La leche de las ordeñas es acumulada diariamente en tanques enfriadores.



Muestras de leche de animales individuales o del tanque enfriador son analizadas en laboratorios de control lechero.



Muestras de tanque recibidas son analizadas en el laboratorio mediante ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti-patógeno



La prueba permite conocer rápidamente y a bajo costo, el status sanitario de los rebaños de una zona.

FINANCIAMIENTO

Fondo para la Innovación Agraria (FIA) - Programa de Biotecnología

Anexo

Poster presentado en CEPAL Junio 2001

UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA ELISA Y PCR ANIDADO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE



ELISA and nested PCR for the detection of Enzootic Bovine Leukaemia Virus in blood and milk samples

Marcela Recabal, Ricardo Felmer, Javier Zúñiga. Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca, Casilla 58-D, Temuco (m_recabal@hotmail.com)

INTRODUCCION

El virus de la leucosis bovina (VLB), es un retrovirus linfotrópico del tipo C responsable de la enfermedad conocida como Leucosis Enzoótica Bovina (LEB). La infección es usualmente subclínica y un 30-70% del ganado infectado puede desarrollar linfocitosis persistente (LP). Por otro lado, 0.1-10% de los animales desarrolla tumores linfoides, la forma clínica fatal de esta enfermedad.

Existen una serie de métodos desarrollados para la detección de VLB, cada uno con ventajas y desventajas, entre los que se pueden mencionar: Radioinmunoensayo (RIA), Inmunodifusión (ID), Inmunoabsorción enzimática (ELISA), Western blot (WB) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En Chile, al igual que en otros países, la prueba oficial para la detección de animales infectados es la inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA). Sin embargo, esta prueba carece de sensibilidad suficiente y al igual que otras pruebas serológicas, no permite la detección temprana de la infección. Tampoco es aplicable a animales menores de 6 meses, debido a la interferencia de los anticuerpos maternos. Esta situación hace necesario el desarrollo de pruebas complementarias para la detección del virus, que permitan asegurar un diagnóstico oportuno y eficiente. Debido a la sensibilidad y confiabilidad mostrada, el ELISA ha sido aceptado como prueba oficial en países como EEUU y Canadá convirtiéndose en una técnica rutinaria para el uso en el laboratorio de diagnóstico y una herramienta importante en el muestreo a gran escala. Sin embargo, al tratarse de una prueba serológica, está sujeta a las mismas restricciones que aplican para el IDGA. De esta forma, la prueba de PCR se presenta como una alternativa conveniente para detectar el ADN proviral en muestras como sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite además un diagnóstico rápido y temprano.

De esta forma, el objetivo de este estudio fue evaluar un método de PCR y ELISA para detectar la infección por BLV en muestras de sangre y leche, empleando como método de referencia la prueba IDGA.

MATERIALES Y METODOS

Animales: Se muestreó un rebaño compuesto por 126 vacas lecheras de un predio ubicado en la Comuna de Freire, Temuco IX Región.

Muestras de sangre: Las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutainer de 7 ml usando EDTA-potásico (1.5 mg/ml de sangre) como anticoagulante y en tubos de 10 ml sin anticoagulante.

Muestras de leche: Se obtuvieron 60 ml de leche mediante ordeña manual, a la que se añadió dicromato de potasio (0.1 % p/v) como preservante.

PCR anidado: El virus se detectó directamente en ADN purificado de leucocitos mediante PCR anidado, empleando dos pares de partidores correspondientes a una región altamente conservada del gen *env* del virus (Beier et al., 2001). La primera reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 30 µl conteniendo 20-100 ng de ADN, 0.2 µM de cada partidore, 75 µM dNTP, 3 µl de tampón PCR 10X, (Promega), 1.5 mM MgCl₂ y 0.75 U de Taq DNA polimerasa. En la segunda reacción se utilizó como templado 3 µl del producto de la primera amplificación. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) y los perfiles térmicos incluyeron una etapa de denaturación inicial a 94°C/5', seguido por 40 ciclos de: 95°C/30", 57°C/30" y 72°C/60", para terminar con una extensión final de 72°C/5'. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas, excepto que la temperatura de annealing se aumentó a 68°C.

ELISA: Se detectaron anticuerpos contra el VLB en muestras de suero y leche, utilizando el kit comercial SVANOVIR (Svanova, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector ELISA (Labsystems, Multiskan EX) a 450 nm.

IDGA: Las muestras de suero se analizaron en un laboratorio externo acreditado.

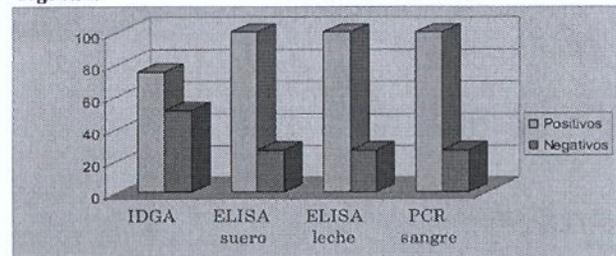
Análisis de datos: Todas las pruebas fueron comparadas en relación a IDGA y los parámetros de sensibilidad y especificidad se estimaron de acuerdo al programa WinEpiscope 2.0.

RESULTADOS Y DISCUSION

El PCR en sangre y el ELISA en suero y leche detectaron un 25% más de animales positivos que el IDGA (Figura 1). Todas las muestras negativas al ELISA, tanto en suero como en leche, fueron también negativas al IDGA. Sin embargo, 3 muestras negativas al PCR fueron positivas al IDGA y al ELISA. Esto último se explicaría por la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa en las muestras de sangre, que pueden afectar la sensibilidad de la técnica o bien debido a la ausencia de VLB en linfocitos sanguíneos.

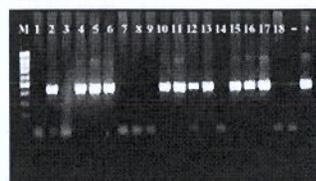
La sensibilidad del PCR y del ELISA respecto a IDGA fue de 100% y la especificidad relativa de ambos métodos fue de alrededor de 50%, lo que se explica por el menor número de casos positivos detectados por IDGA.

Figura 1.



Número de animales positivos y negativos detectados con cada una de las técnicas evaluadas.

Figura 2.



Electroforesis en agarosa al 1.5%. Carriles 1-18 corresponden a los productos de amplificación por PCR correspondientes a 18 muestras individuales.

-: Control negativo; +: Control positivo

CONCLUSIONES

- Las pruebas de PCR en sangre y el ELISA en suero y leche detectaron un mayor número de animales positivos (25 %) que la prueba IDGA.
- La menor especificidad diagnóstica obtenida por el ELISA y PCR, no es debido a reacciones falso positivas de estas pruebas sino más probablemente a la mayor sensibilidad de las mismas.
- No es suficiente detectar a los animales infectados sólo mediante pruebas serológicas y los métodos directos, tales como el PCR deben ser utilizados en forma complementaria ya que aportan información adicional acerca de la infección en un predio.

REFERENCIAS

- BEIER D, BLANKENSTEIN P, MARQUARDT, O. y KUZMAK J. 2001. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl. Munc. Tierärztl. Wschr.* 114, 252-256.
- MAMMERICKX, M., D. PORTETELLE AND A. BURNY. 1985. Application of an enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples. *Zbl. Vet. Med.* 32: 526-533.
- MANUAL OF STANDARDS FOR DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES (OIE). 2000. Edited: World Organization for Animal Health. Chapter 2.3.4. Enzootic bovine leucosis.

Anexo

Presentación de trabajo en SOCHIPA 2004

GOBIERNO DE CHILE
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
INIA

Identificación de variantes genéticas del virus de la leucosis bovina en Chile y su relación filogenética con cepas descritas en el mundo.

Ricardo Felmer, Gastón Muñoz, Javier Zúñiga y Horacio Floody
 Unidad de Biotecnología INIA-CRI Curilanca, Casilla 38-0, Temuco Chile
 rfelmer@curilanca.inia.cl

Proyecto FIA Biot 01-P-35

Introducción

Enfermedad

- Distribución mundial
- Animales mayores de 2 años de edad
- Respuesta inmune humoral permanente
- 30% desarrolla Linfocitosis persistente (LP)
- 1-5 % desarrolla tumores

Agente causal

- Retrovirus de la familia *Retroviridae*
- Virus RNA de cadena simple
- Infecta principalmente linfocitos B induciendo la transformación tumoral de la célula huésped

Objetivo del estudio

Evaluar la factibilidad de aplicar una prueba de PCR anidado a muestras de leche del estanco preñal para el diagnóstico y tipificación molecular del virus de la leucosis bovina (VLB).

- Investigar la presencia de diferentes variantes genéticas de VLB en nuestros rubaños.
- Iniciar estudios acerca de la epidemiología molecular del virus

MATERIALES Y MÉTODOS

1. **Muestras:** Muestras individuales de leche preñal positivo a Leucosis. Muestra de leche de estanco preñal desde el Laboratorio de Calidad de Leche INIA Curilanca.

2. **Extracción de ADN:** Método de SDS-Proteínasa K, aplicado a la fracción de células somáticas de la leche.

3. **Detección inmunológica:** ELISA Indirecto (Svanova, Suecia).

4. **Análisis molecular:** PCR anidado, RFLP (Bam III, Pvu II, Bcl I), Secuenciación automatizada (Perkin Elmer 310).

5. **Análisis de secuencias:**

- Almacenamiento: MultiAlin Software (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multialin/>)
- Traducción: Seq-proteins: EPPASy tool (<http://an.crpspy.org/seqprots.html>)
- Valores de Identidad: Bioedit Software
- Análisis filogenético: Mega 2.1 Software, método de neighbour-joining

PCR Anidado Fragmento env gp51

8 7 2 4

Detección de VLB en muestras de leche del estanco preñal

Tipificación molecular de VLB mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

N° Muestras	Sub-grupo			
	Brigas	Australianas	Japonesas	Otras
11	17	18	0	4

Secuenciación y Análisis Filogenético de VLB

Purificación Productos de PCR

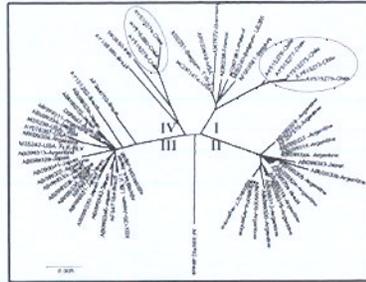
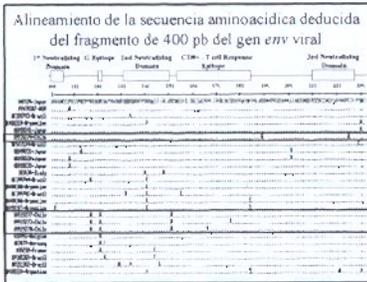
Clonamiento Tipo TA

Secuenciación

8 Secuencias Chilenas Obtenidas

Comparación de secuencias en 79 secuencias publicadas en GenBank

Arbol Filogenético



Conclusiones

- Es posible utilizar leche del estanco preclal para diagnosticar y tipificar el virus de la leucosis bovina.
- Existen diferentes variantes genéticas de VLB en los rebaños analizados.
- Las secuencias Chilenas tienen una mayor divergencia genética y las mutaciones encontradas resultan en cambios aminoacídicos en la proteína gp51 no descritas anteriormente.
- Existen 4 grupos filogenéticos de VLB con las secuencias Chilenas contenidas en 2 clusters independientes.




GOBIERNO DE CHILE
 MINISTERIO DE AGRICULTURA

EVALUACION DE UN MÉTODO PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE CEPAS DE CAMPO Y VACUNALES (RB51 – S19) DE *B. abortus*

Cristian Sauterel, Ricardo Felmer, Javier Zúñiga
 Unidad Biotecnología INIA Carillanca

Proyecto FIA Biot 01-P-35

INTRODUCCIÓN

- *B. abortus* enfermedad que afecta al ganado bovino y se caracteriza por producir grandes pérdidas económicas principalmente a través del aborto
- Diversos métodos diagnósticos
- Capacidad de diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo
- Cepa 19 y cepa RB51
- Cultivo microbiológico



Tiempo ← → Peligrosa

OBJETIVOS

Objetivo general

- Implementar un método de PCR capaz de diferenciar cepas vacunales de las de campo

Objetivos específicos

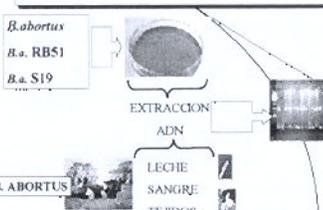
- Implementar la técnica de PCR a partir de cultivos bacterianos para diferenciar cepas vacunales y de campo
- Evaluar PCR en muestras biológicas

MATERIALES Y METODOS

B. abortus
B.a. RB51
B.a. S19

EXTRACCION
ADN

LECHE
SANGRE
TEJIDOS



Detección *B. abortus* PCR

- Cocktail Primer *Brickerly Halling (1999)*
National Veterinary Services Laboratories (USA)

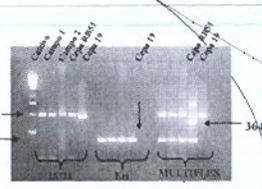
IS711

Eri



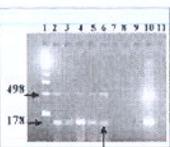
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferenciación *B. abortus* cepa campo con vacuna RB51 y Cepa 19



Determinación de la fracción de leche más adecuada para extracción de ADN

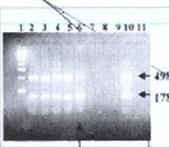
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



50 bacterias totales

Grasa leche

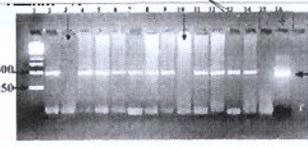
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



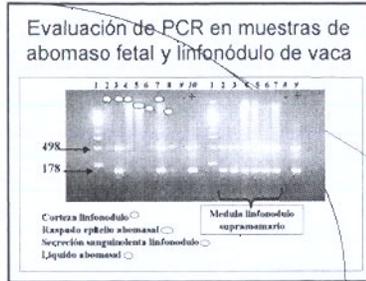
50 bacterias totales

Pellet de celulas

Detección de *B. abortus* en muestras de leche



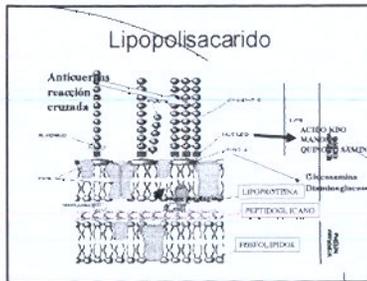
IS711



- ### CONCLUSIONES
- El ensayo PCR fue capaz de diferenciar cepa de campo y cepas vacunales (RB51-S19) en muestras de cultivo de *B. abortus*.
 - El ensayo PCR detectó *B. abortus* en muestras de leche y médula de linfónodo supramamario de vaca.
 - No fue posible detectar *B. abortus* en muestras de sangre.
 - Para muestras de leche, el límite de detección del método PCR fue de 50 bacterias en una muestra de 50 mL.



- ### AGRADECIMIENTOS
- FIA
 - Soc. Agrícola Criadero Freire
 - Servicio Agrícola y Ganadero
 - Escuela Med. Veterinaria Universidad Católica de Temuco
 - Horacio Floody
 - Minnie Villaruel
 - Renato Chavez




GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
MAI - PA

VIGILANCIA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL BOVINO BASADA EN EL ANÁLISIS SEROLÓGICO SISTEMÁTICO DE LA LECHE DEL ESTANQUE PREDIAL

J. Zúñiga R., R. Felmer D., N. Gaete C. y H. Floody A.
 Unidad de Biotecnología
 INIA Carillanca

INTRODUCCION

Control Oficial de enfermedades infecciosas en especies animales:
 se concentra en aquellas de mayor impacto socioeconómico, combinando estrategias de vigilancia epidemiológica y acciones específicas de control.

Vigilancia Epidemiológica:
 proceso regular y continuo de observación e investigación de las principales características de la presentación de una enfermedad en una comunidad.

Países Nórdicos y otros de Europa:
 monitoreo de enfermedades del rebaño lechero mediante análisis serológico de muestras de estanques lecheros.

INTRODUCCION

Sistemas de Información Geográfica SIG:
 sistemas de información integrados por información geográfica asociada a bases de datos que contienen atributos no geográficos.

como sistema de información que son, cumplen con la función de incrementar los elementos y mejorar las habilidades para tomar decisiones.

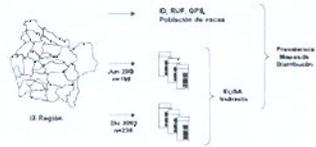
Útiles en el monitoreo de fenómenos biológicos que presentan **variación espacial;**
 descripción, explicación y predicción.

OBJETIVOS

General:
 Evaluar la aplicación de un sistema de vigilancia, basado en el análisis serológico de leche de estanques prediales y el apoyo de SIG, al monitoreo de Brucelosis, Leptosidosis, Diarrea Viral e IBR en una muestra de lecherías comerciales de la IX región.

Específicos:
 a) Establecer la seroprevalencia de las enfermedades en la muestra.
 b) Elaborar mapas base para documentar la presencia de las patologías estudiadas en el contexto geográfico.

MATERIALES Y METODO



RESULTADOS



Figura 3. Características epidemiológicas de una muestra de predios lecheros de la IX Región. (n=202) Diciembre de 2008. A. Presidencia de predios pertenecientes a los estratos de vacas en entorno doméstico. B. Frecuencia de los de vacas, estratos de la muestra representados por cada estrato de vacas en el entorno.

RESULTADOS

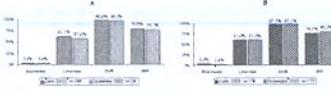


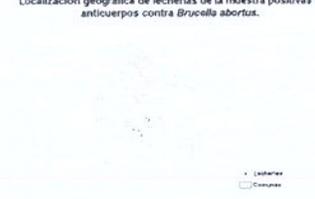
Figura 4. Seroprevalencia de Brucella y en otros marcadores de LSS, OIE e IBR en una muestra de lecherías prediales de la IX Región. A. Tablas por muestraes. B. Puntos positivos de un mismo lechero.

Localización geográfica de una muestra de 234 lecherías de la IX Región.

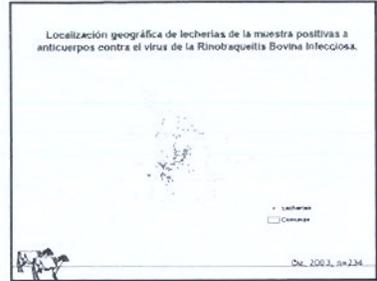
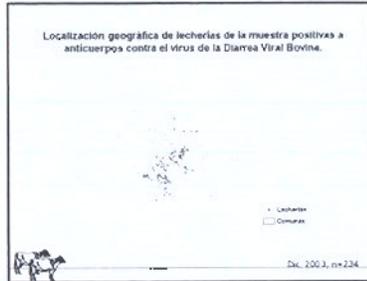
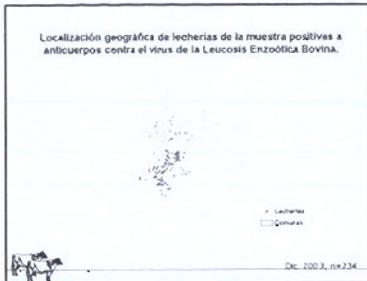


Dic. 200 3., n=234.

Localización geográfica de lecherías de la muestra positiva a anticuerpos contra Brucella abortus.



Dic. 200 3., n=234.



Conclusiones

- La situación de las cuatro enfermedades en la muestra de lecherías hacia fines de 2003 es distinta en cuanto a seroprevalencia, siendo brucelosis la menos extendida y LEB, DVB e IBR muy frecuentes.
- El análisis serológico de las muestras de leche de establos prediales acoplado al análisis geográfico, permitió la rápida identificación de relaciones con las patologías mencionadas.
- El sistema presentado tiene potencial para estructurar un Sistema de Información Geográfica que ayude la vigilancia de enfermedades infecciosas del bovino susceptibles de diagnóstico a través de la leche del establo predial.

Agradecimientos

Fondo para la Innovación Agraria.
 SAG, Unical, Soprofe, Surlat y Parmalat.
 Laboratorio de Calidad de Leche INIA Carillanca

Unidad de Biotecnología
 INIA Carillanca

GOBIERNO CHILE
Ministerio de Agricultura y Ganadería

GOBIERNO CHILE
Ministerio de Agricultura y Ganadería

UTILIZACION DE LA PRUEBA ELISA Y PCR ANIDADO PARA LA DETECCION DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE

Marcela Recabal, Ricardo Palmer, Javier Zúñiga
Unidad de Biotecnología INIA Carillanca

INTRODUCCION

- El agente causal de la Leucosis Enzoótica Bovina es un Retrovirus oncogénico de distribución mundial.
- Infecta principalmente a linfocitos B.
- Vías de transmisión: horizontal, intragénica, vertical.
- Impacto económico: índices productivos y reproductivos bajos.

INTRODUCCION

Situación en Chile:

- Primera referencia bibliográfica: Schulz (1962), en las Provincias de Talca y Bio bio.
- Programa de Control de la Leucosis Bovina
- La prueba Oficial para la detección de animales infectados es la Inmunodifusión en Gel de Agarosa (AGID).

INTRODUCCION

OBJETIVO:

Evaluar el potencial uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en muestras de sangre para la detección del virus (BLV) frente a pruebas serológicas (ELISA, AGID).

MATERIALES Y METODO

MATERIALES:

- Animales:** 126 Vacas lecheras
- Muestras:** Sangre, suero y leche
- AGID:** Muestras de suero fueron analizadas en un laboratorio externo acreditado

Diagnóstico del virus BLV mediante ELISA

Diagnóstico del virus BLV mediante PCR

RESULTADOS

- De un total de 126 animales analizados, AGID detectó el menor número de positivos.
- ELISA y PCR detectaron similar número de positivos.

RESULTADOS

Test de Referencia	Test Alternativo	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Kappa
AGID	Index PCR suero	92	91	0.94
	ELISA suero	90	92	0.91
	ELISA leche	90	90	0.90
Index PCR suero	AGID	71	91	0.81
	ELISA suero	91	91	0.92
	ELISA leche	91	91	0.91

CONCLUSIONES



- La utilización de ELISA y PCR nos permitió detectar mayor N° de animales infectados que AGID.
- Si se desconoce la situación epidemiológica del rebaño, es aconsejable utilizar tests con alta sensibilidad.
- En rebaños de alta prevalencia, los tests serológicos son buena opción para la detección de animales infectados con el virus BLV.
- Los tests ELISA y PCR son complementarios y debieran utilizarse como herramientas de apoyo en los programas de control de la Leucosis.

Agradecimientos

- FIA (Fondo para la Innovación Agraria)
- Ricardo Felmer y Javier Zúñiga
- Horacio Floody
- Braulio Soto
- INIA-Carillanca

14. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

ADONE, R., CIUCHINI, F., LA ROSA, C., MARIANELLI, G. AND MUSCILLO, M. (2001). Use of polymerase Chain reaction to identify *Brucella abortus* Strain RB51 among *Brucella* field isolates from cattle in Italy. *J. Vet. Med. B* 48, 107-113.

BEIER, D., P. BLANKENSTEIN, O. MARQUARDT, J. KUZMAK. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 114: 252-256.

BURRIDGE, M., M. THURMOND, J. MILLER, M. SCHMERR, M. VAN DER MAATEN. 1982. Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am. J. Vet. Res.* 10: 1866-7.

COULSTON, J., H. NAIF, R. BRANDON, S. KUMAR, S. KHAN, R. DANIEL. M. LAVIN. 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J. Gen. Virol.* 71: 1737-46.

DAHLBERG, J. 1988. An overview of retrovirus replication and classification. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 32: 1-35.

FECHNER, H., A. KURG, L. GEUE, P. BLANKENSTEIN, G. MEWES, D. EBNER, D. BEIER. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 10: 621-30.

FECHNER, H., P. BLANKENSTEIN, A. LOOMAN, J. ELWERT, L. GEUE, C. ALBRECHT, A. KURG, D. BEIER, O. MARQUARDT, D. EBNER. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 237: 261-9.

DREW TW, YAPP F, PATON DJ. 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 64(2-3): 145-54.

LANDIS, J., G. KOCH. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33: 159-174.