

INFORME FINAL

PROYECTO “DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA RAPIDA PARA LA DETECCION DE CYCLOSPORA, PARA SER UTILIZADA COMO MECANISMO DE PREVENCION, ASEGURADOR DE CALIDAD Y SEGURIDAD HIGIENICA EN LA COMERCIALIZACIÓN DE BERRIES”

(C98-1-A-040)

**Enero 2000
(2º versión)**

**Sargento Aldea N° 305 - Buin - Santiago Chile - Teléfono: (562) 821 5995 - Fax: (562) 821 6004
e-mail : central@fdf.cl**

INDICE

I.	ANTECEDENTES GENERALES	2
II.	RESUMEN EJECUTIVO	3
III.	TEXTO PRINCIPAL	3
1.	Resumen de La Propuesta original y modificaciones realizadas	3
2.	Cumplimiento de los objetivos del Proyecto	4
	2.1 Descripción de resultados	
	2.2 Descripción de impactos	
3.	Aspectos metodológicos del proyecto	5
	3.1 Descripción de la metodología	
	3.2 Principales problemas metodológicos enfrentados	
	3.3 Adaptaciones o modificaciones introducidas	
4.	Tareas ejecutadas	6
5.	Problemas enfrentados	6
6.	Calendario de ejecución	7
	6.1 Calendario programado / real	
	6.2 Resumen de costo (Programados/efectivos)	
7.	Difusión de los resultados obtenidos	11
8.	Conclusiones y recomendaciones	12
9.	Anexos	13
10.	Bibliografía consultada	14

I.- ANTECEDENTES GENERALES

NOMBRE	“DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA RAPIDA PARA LA DETECCION DE CYCLOSPORA, PARA SER UTILIZADA COMO MECANISMO DE PREVENCION, ASEGURADOR DE CALIDAD Y SEGURIDAD HIGIENICA EN LA COMERCIALIZACION DE BERRIES”
CODIGO	C98 - 1 - A - 040
REGION	Metropolitana
FECHA DE APROBACION	4 de noviembre de 1998
FORMA DE INGRESO AL FIA	Línea de Innovación - MP, Area -A
AGENTE EJECUTOR	Fundación para el Desarrollo Frutícola
AGENTE ASOCIADO	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile
COORDINADOR DEL PROYECTO	Asociación de Exportadores de Chile A.G.
COSTO TOTAL (\$)	26.602.727
APORTE DEL FIA: (\$) (% del costo total)	18.487.416 (69.5 %)
PERIODO DE EJECUCION	2 noviembre 1998 al 30 de diciembre de 1999

II.- RESUMEN EJECUTIVO

Este informe cubre las actividades llevadas a cabo durante el periodo total de ejecución estipulado, en el cual el proyecto avanzó satisfactoriamente de acuerdo a lo programado, habiéndose satisfecho las metas propuestas y obtenido los siguientes resultados:

- ☑ Se implementó y modificó el método PCR revisado por el FDA para la detección de *Cyclospora cayetanensis* en frambuesas.
- ☑ La sensibilidad obtenida fue de 10 a 20 moléculas del gen de *Cyclospora* y una contaminación de 0.0005 ml de heces positivas en 250 gr de frambuesas.
- ☑ Se desarrolló un paquete con los reactivos necesarios para efectuarla
- ☑ Se analizaron 32 muestras de frambuesas provenientes de diferentes productores, sin detectar la presencia de *Cyclospora*
- ☑ Se desarrolló y preparó un vídeo de capacitación del método

III.- TEXTO PRINCIPAL

1. RESUMEN

El objetivo de este proyecto es desarrollar una técnica rápida de detección de *Cyclospora cayetanensis* en frambuesas y de un paquete (kit) con los reactivos necesarios para efectuarla, a fin de que los productores y centros de embalaje cuenten con información oportuna y confiable respecto al grado de inocuidad de sus productos antes de exportarlos.

Este proyecto permite contar con una metodología rápida desarrollada especialmente para la determinación de este microorganismo en berries y contribuye a asegurar la exportación de frutillas y frambuesas frescas libres de contaminación por *Cyclospora*. Por otra parte permite identificar problemas de manejo que afecten la calidad sanitaria del agua de riego.

La metodología utilizada en la actualidad está basada en observaciones al microscopio de coprocultivos de muestras de personas enfermas que poseen una gran cantidad de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. Esta técnica requieren contar con analistas muy entrenados en la diferenciación de *Cyclospora* y en la apreciación de coloraciones, cuyas reacciones se ven interferidas por las pigmentaciones naturales de los berries.

La técnica desarrollada en el proyecto está basada en la reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), que consiste en amplificar millones de veces un gene específico de *Cyclospora* para su posterior detección e identificación por electroforesis en geles de poliacrilamida. Este método permite determinar la presencia de *Cyclospora* en muestras donde las concentraciones son bajas y no se ve afectado por interferencias de la pigmentación de los berries

Esta técnica fue desarrollada inicialmente para la detección de *Cyclospora* en humanos por análisis de heces, y posteriormente el FDA revisó este procedimiento para el análisis de frambuesas. Para alcanzar los objetivos del proyecto se implementó la técnica revisada por el FDA, con modificaciones para facilitar el procedimiento y aumentar su sensibilidad.

Las etapas contempladas en el desarrollo del proyecto se detallan en la página 2 del anexo informe final emitido por el INTA, donde a la vez se indica que no se realizaron cambios importantes en las actividades programadas excepto en las relacionadas con la fecha en que se llevó a cabo la técnica para la discriminación entre *Cyclospora* y *Eimeria*.

2. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS

2.1 Resultados

El trabajo se realizó en el laboratorio de bioingeniería del Instituto Tecnológico de Alimentos (INTA), donde se efectuaron las siguientes actividades:

- Implementación de la detección de *Cyclospora cayetanensis*. por PCR
- Obtención de los reactivos requeridos, incluyendo los oligonucleótidos específicos para la prueba
- Obtención de muestras positivas de *Cyclospora* en el extranjero. Heces positivas desde Perú y una bacteria conteniendo un plasmido donde se ha insertado el gene de *Cyclospora* que se detecta en la prueba desde estados Unidos.
- Se determinó la sensibilidad de la técnica para detectar al plasmido de la bacteria que contiene el gene de *Cyclospora*. La sensibilidad obtenida es de 500 a 1.000 moléculas por ml de muestra final.
- Determinación de la amplificación en muestras de heces positivas. La sensibilidad en este caso fue de 0.05 microlitros de la muestra de heces positivas para *Cyclospora*
- Determinación de la sensibilidad en muestras de frambuesas contaminadas artificialmente, con 50 μ l de heces conteniendo *Cyclospora*. La sensibilidad obtenida fue de 0.5 μ l en 250 gr de frambuesas.
- Perfeccionamiento para aumentar la sensibilidad, utilizando geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata. Con esta técnica se aumento la sensibilidad 40 veces aproximadamente.
- El método se perfeccionó analizando 21 muestras de frambuesas frescas y 4 muestras de frambuesas congeladas de exportación sin detectar la presencia de *Cyclospora cayetanensis*.
- Discriminación entre *Cyclospora* y *Eimeria* por hibridación.
- Definición del kit de reactivos y elaboración de un protocolo para su uso.
- Emisión de un vídeo de capacitación y difusión del método
- Transferencia del método a empresas exportadoras de berries.

El detalle de cada uno de los puntos anteriormente enunciados se encuentra detallado en el anexo paginas 3 a la 6.

2.2 Impactos Observados

El método desarrollado en este proyecto se podrá utilizar en controles rutinarios para verificar la ausencia de *Cyclospora* en berries destinados al mercado externo, o verificar en zonas productivas la ausencia de este microorganismo.

Se cuenta con un kit de reactivos para llevar a cabo el análisis, el que incluye:

- Reactivos específicos para PCR
- Nucleotidos
- Primer
- Enzima Taq
- BSA
- Reactivos para electroforesis y tinción
- Control positivo

El uso del método desarrollado en el proyecto permitirá contar con información que demuestre que las diferentes partidas analizadas no están contaminadas con *Cyclospora* y así asegurar la calidad e inocuidad de los berries exportados.

Como este es un proyecto en el cual una de sus cláusulas es la confidencialidad, no se ha difundido a la opinión pública.

3. ASPECTOS METODOLOGICOS

3.1 Descripción de la metodología

a- Detección de *Cyclospora* en frambuesas

La *Cyclospora* se separa de las frambuesas mediante un lavado cuidadoso, para luego concentrarla por centrifugación hasta extraer su DNA. Posteriormente se amplifica un gen específico del rDNA de *Cyclospora* por PCR, a través de una serie de enzimas que realizan las reacciones, dando como resultado final una copia fiel del genoma entero. Posteriormente se realiza una electroforesis en geles, donde el rDNA migra en el gel sometido a un campo eléctrico, quedando distribuido de acuerdo a su tamaño. Posteriormente el gel es teñido con nitrato de plata. La lectura se realiza comparando la lectura con marcadores especialmente diseñados como control positivo, los que contienen la secuencia correspondiente al vector PCR2.1 (obtenido en Palo Alto California).

En el anexo, páginas 7 a la 13 se detalla la metodología utilizada en el proyecto.

b- Detección de Cyclospora en agua

El procedimiento a seguir para la detección de Cyclospora en muestras de aguas es el mismo que ha sido descrito para frambuesas, pero en este caso se deben eliminar los pasos 1 y 2 detallados en el protocolo para la obtención de DNA de Cyclospora desde frambuesas descrito en la página 9 del anexo. Es decir la muestra de agua (250 ml), es concentrada en forma directa por centrifugación (pasos 3 a 9 del protocolo detallado en el anexo).

3.2 Principales problemas metodológicos

El principal problema fue obtener muestras positivas de Cyclospora y Eimeria. Finalmente se obtuvo muestras de Cyclospora en el extranjero, pero fue imposible obtener muestras de Eimeria. (ver pagina 14 – anexo)

3.3 Adaptaciones o modificaciones

Los ensayos de diferenciación de Cyclospora y Eimeria se llevaron a cabo por hibridación para distinguir amplificadas de un mismo tamaño con diferentes secuencia de nucleotidos. La prueba se llevó a cabo con amplificadas de regiones de similar función y también de similar diferencia en secuencia de nucleotidos (ver pagina 14 – anexo).

4. TAREAS EJECUTADAS

- Obtención de los reactivos requeridos.
- Se trajeron desde Perú muestras positivas de *Cyclospora cayetanensis*.
- Se trajo desde Estados Unidos una cepa bacteriana en el que se ha insertado un plasmido con el gene específico de *Cyclospora cayetanensis* utilizado en la detección. Este gen fue introducido en la bacteria por ingeniería genética.
- Se implementó el método de Reacción de Polimerasa en Cadena revisado por el FDA.
- Se determinó la sensibilidad de la técnica en frambuesas frescas contaminadas artificialmente.
- Se perfeccionó la técnica para aumentar su sensibilidad
- Análisis de muestras de frambuesas frescas de exportación.
- Análisis de muestras de frambuesas congeladas de exportación.
- Discriminación entre Cyclospora y Eimeria por hibridación.
- Elaboración del kit de reactivos
- Elaboración de un vídeo de capacitación y promoción del método
- Transferencia a empresas exportadoras de berries asociadas a la ASOEX.

El número de empresas exportadoras de berries pertenecientes a la Asociación de Exportadores A.G. es 4 solamente. Una de ellas no se interesó en asistir a las reuniones y cursos realizados y la otra no contaba con personal idóneo para esta tarea. Por esta razón el número de empresas instruidas fue menor a lo presupuestado.

5. PROBLEMAS ENFRENTADOS

5.1 Problemas legales

Ninguno

5.2- Problemas técnicos

Ninguno

5.3- Problemas Administrativos

Ninguno

5.4- Problemas de Gestión

Como se informó en el punto 3.2, no fue posible obtener en el extranjero muestras de Eimeria, razón por la cual el método fue modificado para cumplir con el objetivo de discriminar entre muestras positivas de Cyclospora y Eimeria.

6. CALENDARIO DE EJECUCIÓN

6.1 - Calendario programado/real

a- Por objetivos

Tarea	Programada	Real
Desarrollo método rápido para detección de Cyclospora.	Ensayos de laboratorio efectuados al 30 ene.99	30 ene '99
Verificación sensibilidad y aplicación comercial del método.	30 muestras al 30 dic. 99	32 muestras al 30 de dic. 99
Capacitar a técnicos para efectuar análisis a muestras comerciales durante las temporadas de cosecha y embalaje.	4 técnicos capacitados 15 ago.99	4 técnicos capacitados 7 oct.99
Charlas acerca de Cyclospora y metodologías de detección a empresas embaladoras y exportadoras.	4 empresas instruidas	3 empresas instruidas oct.99

b- Por objetivos específicos

Actividad	Fecha programada	Fecha de ejecución
Obtención y elaboración de reactivos y materiales necesarios para la metodología	2 al 30 nov. 1998	30 nov. 1998
Implementación del método PCR en muestras de heces	15 dic. al 30 en 1999	Dic. 1998
Implementar método de discriminación entre Cyclospora y Eimeria	15 al 30 abr. 1999	15 oct. Al 15 nov. 1999
Determinar lavados más eficientes en frambuesas frescas	15 al 30 ene 1999	15 al 30 ene 1999
Determinar la sensibilidad del método en frambuesas frescas	20 al 30 ene 1999	20 al 30 de ene 1999
1 ^{er} Programa toma de muestras para test de validación	15 feb. al 01 mar. 1999	marzo 1999
Elaboración de procedimientos	10 jun. al 7 jul. 1999	jul. 1999
Capacitación del personal para control rutinario	15 jul. al 15 ag. 1999	15 ag. al 15 de sep. 1999
Investigación bibliográfica acerca de Cyclospora	15 jul. al 15 ag. 1999	15 jul. al 15 ag. 1999
Determinar lavados más eficientes en frambuesas congeladas	1 al 30 jul. 1999	Jul.-ago. 1999
Determinar la sensibilidad del método en frambuesas congeladas	1 al 15 ag. 1999	ag. 1999
2 ^{do} Programa toma de muestras para test de validación	20 al 30 nov. 1999	Nov. 1999
2 ^{da} Ejecución test de validación	5 al 30 dic. 1999	Nov.-dic. 1999
1 ^o Análisis de resultados	1 al 30 abril 1999	Abril 1999
2 ^o Análisis de resultados	15 dic. 99 al 10 ene 2000	Dic. 1999
Verificación resultados finales. Informe final	15 dic. 99 al 15 en 2000	14 dic. 99 al 4 ene 2000.

PROGRAMADO / REAL APORTES TOTALES

ITEM	Nov-98		Dic-98		Ene-99		Feb-99		Mar-99		Abr-99	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	160.740	160.740	160.740	160.740
Jefe Técnico Proyecto	168.000	150.000	168.000	150.000	168.000	150.000	168.000	150.000	175.560	150.000	175.560	150.000
Subcontrato Inta	2.084.559	846.000	2.084.559	1.020.000	2.084.559	5.638.413	2.084.559	0	677.713	0	677.713	0
Material Muestra	0	0	0	0	122.853	0	0	0	385.132	0	190.190	0
Muestreo	0	0	0	0	163.800	161.390	0	0	125.191	128.676	125.191	0
Transferencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Administración	88.615	83.457	88.615	87.592	88.615	98.797	88.615	109.896	47.396	96.298	47.396	50.784
Comunicaciones	15.000	10.658	15.000	9.332	15.000	12.593	15.000	8.648	15.675	7.510	15.675	6.228
Imprevistos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preparación Prop.	852.550	852.550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	3.362.543	2.096.484	2.509.993	1.420.743	2.796.646	6.215.012	2.509.993	422.364	1.587.407	543.223	1.392.465	367.752

ITEM	May-99		Jun-99		Jul-99		Ago-99		Sep-99		Oct-99	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740
Jefe Técnico Proyecto	175.560	150.000	175.560	150.000	175.560	150.000	175.560	175.560	175.560	175.560	175.560	175.560
Subcontrato Inta	677.713	5.836.764	677.713	0	677.713	0	677.713	0	677.713	0	677.713	0
Material Muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestreo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transferencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.160.100	1.115.100
Administración	47.396	55.091	47.396	51.051	47.396	58.639	47.396	65.690	47.396	65.665	47.396	58.708
Comunicaciones	15.675	6.028	15.675	7.252	15.675	7.053	15.675	8.272	15.675	9.668	15.675	8.747
Imprevistos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1.077.084	6.208.624	1.077.084	369.044	1.077.084	376.432	1.077.084	410.262	1.077.084	411.633	2.237.184	1.518.855

ITEM	Nov-99		Dic-99		Ene-00		Feb-00		TOTAL	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	160.740	160.740	160.748	160.748	0	0	0	0	2.222.684	2.222.684
Jefe Técnico Proyecto	175.560	175.560	175.560	175.560	0	0	0	0	2.427.600	2.227.800
Subcontrato Inta	677.713	0	677.713	0	0	0	0	1.482.352	15.115.366	14.823.529
Material Muestra	0	0	247.247	0	0	0	0	0	945.422	0
Muestreo	0	242.598	455.321	212.050	0	0	0	0	869.503	744.714
Transferencia	1.160.100	0	666.168	1.115.100	0	166.666	0	19.444	2.986.368	2.416.310
Administración	47.396	62.303	47.396	70.136	0	0	0	0	828.420	1.014.108
Comunicaciones	15.675	7.507	15.675	10.089	0	0	0	0	216.750	119.585
Imprevistos	68.680	0	68.680	0	0	0	0	0	137.360	0
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	852.550	852.550
TOTAL	2.305.864	648.708	2.514.508	1.743.683	0	166.666	0	1.501.796	26.602.023	24.421.280

PROGRAMADO / REAL APORTES FIA

ITEM	Nov-98		Dic-98		Ene-99		Feb-99		Mar-99		Abr-99	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jefe Técnico Proyecto	168.000	150.000	168.000	150.000	168.000	150.000	168.000	150.000	175.560	150.000	175.560	150.000
Subcontrato Inta	1.709.559	675.108	1.709.559	813.960	1.709.559	4.499.454	1.709.559	0	520.963	0	520.963	0
Material Muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestreo	0	0	0	0	163.800	161.390	0	0	125.191	128.676	125.191	0
Transferencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Administración	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Comunicaciones	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
Preparación Prop.	852.550	852.550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2.730.109	1.677.658	1.877.559	963.960	2.041.359	4.810.844	1.877.559	150.000	821.714	278.676	821.714	150.000

ITEM	May-99		Jun-99		Jul-99		Ago-99		Sep-99		Oct-99	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jefe Técnico Proyecto	175.560	150.000	175.560	150.000	175.560	150.000	175.560	175.560	175.560	175.560	175.560	175.560
Subcontrato Inta	520.963	4.657.738	520.963	0	520.963	0	520.963	0	520.963	0	520.963	0
Material Muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestreo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transferencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	899.645	920.627
Administración	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Comunicaciones	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
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	696.523	4.807.738	696.523	150.000	696.523	150.000	696.523	175.560	696.523	175.560	1.596.168	1.096.187

ITEM	Nov-99		Dic-99		Ene-00		Feb-00		TOTAL	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jefe Técnico Proyecto	175.560	175.560	0	0	0	0	0	0	2.252.040	2.052.240
Subcontrato Inta	520.963	0	520.963	0	0	0	1.182.917	0	12.047.866	11.829.176
Material Muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestreo	0	242.598	455.321	212.050	0	0	0	0	869.503	744.714
Transferencia	899.645	0	666.168	920.627	137.599	0	16.053	0	2.465.458	1.994.906
Administración	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Comunicaciones	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Imprevistos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	852.550	852.550
TOTAL	1.596.168	418.158	1.642.452	1.132.677	0	137.599	0	1.198.970	18.487.417	17.473.586

ppp
final al
INTA.

PROGRAMADO / REAL APORTES ASOEX

ITEM	Nov-98		Dic-98		Ene-99		Feb-99		Mar-99		Abr-99	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	153.819	160.740	160.740	160.740	160.740
Jefe Técnico Proyecto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subcontrato Inta	375.000	170.892	375.000	206.040	375.000	1.138.959	375.000	0	156.750	0	156.750	0
Material Muestra	0	0	0	0	122.853	0	0	0	385.132	0	190.190	0
Muestreo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transferencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Administración	88.615	83.457	88.615	87.592	88.615	98.797	88.615	109.896	47.396	96.298	47.396	50.784
Comunicaciones	15.000	10.658	15.000	9.332	15.000	12.593	15.000	8.648	15.675	7.510	15.675	6.228
Imprevistos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	632.434	418.826	632.434	456.783	755.287	1.404.169	632.434	272.364	765.693	264.547	570.751	217.752

ITEM	May-99		Jun-99		Jul-99		Ago-99		Sep-99		Oct-99	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740	160.740
Jefe Técnico Proyecto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subcontrato Inta	156.750	1.179.026	156.750	0	156.750	0	156.750	0	156.750	0	156.750	0
Material Muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestreo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transferencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	260.455	194.473
Administración	47.396	55.091	47.396	51.051	47.396	58.639	47.396	65.690	47.396	65.665	47.396	58.708
Comunicaciones	15.675	6.028	15.675	7.252	15.675	7.053	15.675	8.272	15.675	9.668	15.675	8.747
Imprevistos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	380.561	1.400.886	380.561	219.044	380.561	226.432	380.561	234.702	380.561	236.073	641.016	422.669

ITEM	Nov-99		Dic-99		Ene-00		Feb-00		TOTAL	
	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL	PPTO.	REAL
Personal Profesional FDF	160.740	160.740	160.748	160.748	0	0	0	0	2.222.684	2.222.684
Jefe Técnico Proyecto	0	0	175.560	175.560	0	0	0	0	175.560	175.560
Subcontrato Inta	156.750	0	156.750	0	0	0	0	299.435	3.067.500	2.994.353
Material Muestra	0	0	247.247	0	0	0	0	0	945.422	0
Muestreo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transferencia	260.455	0	0	194.473	0	29.067	0	3.391	520.910	421.404
Administración	47.396	62.303	47.396	70.136	0	0	0	0	828.420	1.014.108
Comunicaciones	15.675	7.507	15.675	10.089	0	0	0	0	216.750	119.585
Imprevistos	68.680	0	68.680	0	0	0	0	0	137.360	0
Preparación Prop.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	709.696	230.550	872.056	611.007	0	29.067	0	302.826	8.114.606	6.947.694

btolan

7. DIFUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

7.1 Reunión Comité de Berries

El día 27 de Agosto se presentó un informe del proyecto y avance obtenido a los jefes técnicos de las exportadoras de berries. En esta reunión efectuada en la Asociación de Exportadores, el Dr. Romilio Espejo (INTA), expuso los fundamentos de la metodología PCR y los resultados obtenidos hasta la fecha. A ella asistieron representantes de las siguientes instituciones: Hortifrut, Vitalberry, INTA; FIA; ASOEX y FDF.

7.2 Curso Detección Rápida de Cyclospora en Berries.

a- Sesión Teórica.

El día 1 de Octubre se llevó a cabo en el INTA una sesión, donde expusieron el Dr. Romilio Espejo, Jefe de Laboratorio de Bioingeniería del INTA y la Sra. Paulina Uribe Investigadora principal.

Los temas incorporados en esta sesión fueron:

- Cyclospora cayetanensis: ciclo reproductivo, modo de transmisión, modo de infección, sensibilidad al cloro.
- Eimeria : descripción
- Método de detección de Cyclospora utilizados en la actualidad (observación al microscopio).
- Método PCR: fundamentos, procedimiento

A esta sesión asistieron 10 personas pertenecientes a las siguientes instituciones FIA, Hortifrut, Comercial Frutícola, ASOEX y FDF

Empresa	Nº de participantes
Comercial Frutícola	2
FIA	1
FDF	4
Hortifrut	3

b- Sesión Practica.

Esta sesión del curso estaba dirigida al personal técnico de cada empresa capacitado para llevar a cabo los análisis de PCR. Se realizó en dos jornadas los días 6 y 7 de octubre en el Laboratorio de Bioingeniería del INTA, donde se siguió paso a paso cada uno de los procedimientos a seguir para llevar a cabo el análisis de detección de Cyclospora en berries por PCR.

Esta sesión fue dictada por la Sra. Paulina Uribe (INTA) y asistieron 4 personas pertenecientes a las siguientes instituciones: FIA; Hortifrut; Comercial Frutícola y FDF.

7.3 Material Audiovisual

Se elaboró un vídeo didáctico que incluye los siguientes aspectos:

- Antecedentes sobre la detección de *Cyclospora* en las frambuesas Guatemaltecas exportadas a U.S.A. y sus consecuencias económicas
- Entrevista a dos especialistas del INTA, quienes dan antecedentes generales del objetivo del proyecto y de los fundamentos del método PCR.
- Modo de transmisión de *Cyclospora*
- Método de detección utilizado en la actualidad.
- Fundamentos del método PCR
- Secuencia esquemática de cada uno de los pasos más importantes a seguir.
- Presentación del kit de reactivos, con la lista de los equipos requeridos

Este vídeo se utilizará como material promocional y de apoyo para aquellas personas que adquieran el kit y deseen implementar el método en sus laboratorios.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1- Se implementó un método sensible para la detección de *Cyclospora cayetanensis* en frambuesas
- 2- Se armaron los kit para llevar a cabo las detecciones de *Cyclospora* en otros laboratorios.
- 3- Están disponibles las herramientas necesarias para que las empresas puedan analizar partidas de frutas y determinar si está o no en ellas el parásito *Cyclospora*.
4. El kit desarrollado también puede ser utilizado para determinar la presencia de *Cyclospora* en aguas, teniendo presente que hay que introducir pequeñas modificaciones al método.

El uso del kit se debe realizar en laboratorios bien equipados por personal que posea experiencia en realizar análisis bioquímicos.

9. ANEXOS

9.1 Equipos y reactivos requeridos:

Equipos y materiales requeridos

Equipos	Costo (\$) sin IVA
Agitador orbital	722.100
Centrifuga para tubos de 50 ml (10.000 g) con rotores para tubos de 50 ml y tubos eppendorf	2.550.000
Baño termoregurable hasta 70°C	398.000
Cámara de electroforesis para geles de 8x10x0.75 cm	452.000
Fuente de poder de 150 Volts	600.000
Termociclador para PCR	2.690.000
Micropipeta de 1 µl	186.200
Micropipeta de 0.1 µl	186.200
Pipetas serológicas de 0.1 ml, 5 ml y 10 ml	30.000
Puntas de 1 µl	8.600
Puntas 0.1 µl	7.400
Tubos eppendorf de 1.5 o 2 ml	6.000
Costo total (\$)	7.836.500

Otros equipos y materiales requeridos:

Autoclave, balanza granataria, matraces de 500 ml, tubos de centrifuga de 50 ml, estufa de esterilización, timer y elementos utilizados habitualmente en un laboratorio de microbiología

Reactivos y materiales generales necesarios:

Agua destilada
Hielo seco

Reactivos y materiales específicos requeridos:

Kit Glass max (Gibco BRL, Cat. N° 15590-060)

□ Kit suministrado por el INTA

1- Paquete amplificación

CLB
TE
Agua estéril
Buffer 10X
Nucleotidos
Mg
Primer 1
Primer 2
Primer 3
Primer 4
BSA
Taq
Plasmido

2- Paquete de electroforesis y tinción

Acril-bis
TBE5X
TBE1X
APS
TEMED
Tampón de carga
Etanol- Ac. Acético 10 X
Ag NO₃ 100 X
Solución reveladora

Las instrucciones de utilización del kit se detallan en el anexo, páginas 15 a la 18.

9.2 Costo del kit de reactivos

El valor del kit para el análisis de 20 muestras es de \$ 390.000 + IVA (no incluye costos de administración de FDF). Este valor está calculado pensando en armarlo según pedido y en que éstos serán de 1 a 3 kits. Para un mayor número de pedidos el costo sería menor.

10. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Ver página 19, anexo “Desarrollo de una Técnica basada en PCR para la detección de Cyclospora”