

639.3755
L 123
1999

**INFORME FINAL
PROYECTO DE INNOVACION TECNOLOGICA**

FONTEC- CORFO

CODIGO : 97 - 1057

PROYECTO : **APLICACIÓN Y DESARROLLO DE UN SERVICIO
INTEGRAL DE DIAGNÓSTICO VIRAL PARA
SALMONÍDEOS MEDIANTE TECNOLOGÍA
DE PUNTA.**

EMPRESA GESTORA : **LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO GAM LTDA.**

FECHA : **Agosto 1999**

639.3755
L 123
1999

3012

INFORME FINAL

Código del proyecto: 97-1057

Título del proyecto: Aplicación y Desarrollo de un Servicio Integral de Diagnóstico
Viral para Salmónidos mediante Tecnología de Punta

Entidad Patrocinante: Laboratorio de Diagnóstico GAM Ltda.

Entidad Ejecutora: Laboratorio de Diagnóstico GAM Ltda.

Fecha de entrega: 31 de Agosto de 1999.

PRESENTACIÓN

En el último decenio, se constata que el país ha sabido enfrentar con éxito el desafío impuesto por la política de apertura en los mercados internacionales, alcanzando un crecimiento y desarrollo económico sustentable, con un sector empresarial dinámico, innovador y capaz de adaptarse rápidamente a las señales del mercado.

Sin embargo, nuestra estrategia de desarrollo, fundada en el mayor esfuerzo exportador y en un esquema que principalmente hace uso de las ventajas comparativas que dan los recursos naturales y la abundancia relativa de la mano de obra, tenderá a agotarse rápidamente como consecuencia del propio progreso nacional. Por consiguiente, resulta determinante afrontar una segunda fase exportadora que debe estar caracterizada por la incorporación de un mayor valor agregado de inteligencia, conocimientos y tecnologías a nuestros productos, a fin de hacerlos más competitivos.

Para abordar el proceso de modernización y reconversión de la estructura productiva del país, reviste vital importancia el papel que cumplen las innovaciones tecnológicas, toda vez que ellas confieren sustentación real a la competitividad de nuestra oferta exportable. Para ello, el Gobierno ofrece instrumentos financieros que promueven e incentivan la innovación y el desarrollo tecnológico de las empresas productoras de bienes y servicios.

El Fondo Nacional de Desarrollo Tecnológico y Productivo FONTEC, organismo creado por CORFO, cuenta con los recursos necesarios para financiar Proyectos de Innovación Tecnológica, formulados por las empresas del sector privado nacional para la introducción o adaptación y desarrollo de productos, procesos o de equipos.

Las Líneas de financiamiento de este Fondo incluyen, además, el apoyo a la ejecución de proyectos de Inversión en Infraestructura Tecnológica y de Centros de Transferencia Tecnológica a objeto que las empresas dispongan de sus propias instalaciones de control de calidad y de investigación y desarrollo de nuevos productos o procesos.

De este modo se tiende a la incorporación del concepto "Empresa - País", en la comunidad nacional, donde no es sólo una empresa aislada la que compete con productos de calidad, sino que es la "Marca - País" la que se hace presente en los mercados internacionales.

El Proyecto que se presenta, constituye un valioso aporte al cumplimiento de los objetivos y metas anteriormente comentados.

FONTEC - CORFO

1-RESUMEN EJECUTIVO

Chile hasta hace unos años no contaba con Centros Ictiopatólogicos que tuvieran métodos de diagnóstico rápidos, certeros y sensibles que permitan tomar las medidas adecuadas para el control de las enfermedades virales. Sólo existían algunos centros clínicos que utilizan la técnica tradicional de cultivo celular para la detección de determinados virus, la que demora entre 15 a 20 días en otorgar un resultado. Más aún, esta técnica no permite identificar al agente viral, sólo permite sospechar su presencia. Por este motivo y basados en años de investigación en patógenos de peces, realizada bajo la dirección de la Dra. Ana María Sandino se creó el Laboratorio de Diagnóstico GAM Ltda., con el fin de superar la deficiencia tecnológica existente en nuestro país en el campo de la Ictiopatología. Para conseguir este propósito se llevó a cabo el proyecto FONTEC, el cual consistió en el desarrollo de métodos de vanguardia para el diagnóstico de los virus de peces de mayor y menor incidencia tanto a nivel nacional como mundial, utilizando técnicas de biología molecular que disminuyen el tiempo de los análisis a sólo dos días. Con los métodos de diagnóstico desarrollados se realiza la identificación específica del patógeno en peces, tanto en tejido como en sangre y en ovas infectadas. De este modo se podrán chequear los alevines a partir del análisis del tejido, los reproductores a partir del análisis de la sangre (sin sacrificar al pez) y las ovas directamente. Es importante destacar que la sensibilidad de estos métodos incluso permite detectar el patógeno en individuos portadores asintomáticos. Además, de los agentes virales se desarrollaron métodos para la detección de las bacterias de mayor incidencia en Chile como son: *Piscirickettsia salmonis*, *Renibacterium salmoninarum* y para el protozoo *Enterocytozoon salmonis*.

Los métodos desarrollados mediante este proyecto han sido implementados a nivel comercial con mucho éxito, como se pudo comprobar durante el screening de reproductores del año 1999. El impacto de los métodos de diagnóstico desarrollados implementados a nivel productivo tienen impacto a nivel de:

- Aumento de la productividad de las empresas acuícolas debido a la disminución de las enfermedades y mortalidades mediante un diagnóstico precoz.
- Evitar la diseminación de los agentes infecciosos debido a la rapidez y sensibilidad de los métodos desarrollados.
- Tomar medidas sanitarias oportunas que para el caso de los virus es el único medio de control disponible
- Aumento de valor agregado de los peces ya que los métodos permiten certificar la ausencia de patógenos.
- Screening de reproductores a partir de sangre, ya que su inocuidad permite un monitoreo de la generación siguiente, anticipado al desove.
- Screening de reproductores, rápido, económico y estadísticamente significativo.
- Certificación de ovas.
- Movimiento de peces libres de enfermedades.
- Disminución de costos por el uso indiscriminado de antibióticos que se realiza cuando no se realiza un diagnóstico certero y oportuno.
- Ambiente, ya que se evita la diseminación de los patógenos, lo que permite tener zonas libres, debido principalmente a la rapidez y sensibilidad de los métodos.
- Calidad del diagnóstico, lo que se traduce en contar con un diagnóstico específico y no una sospecha.
- Credibilidad del diagnóstico viral.
- Programas de vigilancia epidemiológica adecuados y oportunos dentro del marco productivo.
- Contar a nivel de la acuicultura nacional con técnicas de vanguardia incluso inexistentes a nivel mundial.
- Fomentar el desarrollo tecnológico en el país.

2-EXPOSICION DEL PROBLEMA

El problema que el proyecto se propuso resolver:

Chile hasta hace algunos años era considerado un país libre de virus, pero en el último tiempo la presencia de agentes virales en Chile ha sido reconocida por algunos empresarios, debido a la aparición de enfermedades desconocidas, que han provocado altas mortalidades, causando grandes pérdidas económicas. Además, existen antecedentes que indican que se aisló virus IPN desde una trucha del Lago Llanquihue que había sido importada de EEUU (Mc Allister P.E. and Reyes X.1984 Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout imported into Chile, *Journal of Fish Diseases* 7: 319-322). Estos antecedentes implicaban que:

- 1) Probablemente este virus haya sido introducido a través de la importación de ovas, ya que se sabe que se transmite tanto vertical (asociado a las hembras portadoras que depositan ovas infectadas), como horizontalmente (se genera por medio de las heces y orina excretadas).
- 2) Estos hallazgos hayan sido producto de que el virus esté muy diseminado en algunas regiones de la zona sur y/o central y,
- 3) Este virus no haya sido detectado previamente porque Chile no disponía de la tecnología adecuada para identificarlos.

Existían evidencias que indicaban que a pesar de las certificaciones sanitarias que deberían traer las ovas importadas, se introdujeron a nuestro país algunas enfermedades por esta vía. Por este motivo existía la necesidad urgente de contar con métodos de diagnóstico específicos, altamente sensibles y rápidos que permitiesen detectar estos agentes infecciosos tanto en ovas como en peces infectados y evitar así, no sólo la diseminación de los ya existentes, sino que la introducción de nuevos agentes virales a nuestro país.

Otro punto de extrema importancia es que dentro de las pisciculturas existen individuos de gran valor comercial como los reproductores, en varias ocasiones se puede sospechar de que ellos estén infectados, pero el productor no está dispuesto a sacrificarlos para realizar un muestreo con su tejido, en pos de que la sospecha sea errónea. Es por esto que se requería desarrollar métodos que no involucrasen su sacrificio para los peces de mayor valor comercial.

Además Chile no contaba con Centros Ictiopatológicos que tuviesen métodos para el diagnóstico viral, rápidos, certeros y sensibles que permitiesen tomar las medidas adecuadas para su control, sólo existían algunos centros clínicos que utilizaban la técnica tradicional de “cultivo celular” para la detección de determinados virus. Esta técnica se basa en tomar muestras de tejido de individuos sospechosos e inocular placas con células, esto persigue propagar el virus en estas células, de modo de aumentar así el contenido vírico de las muestras. Esta técnica **no permite identificar** al agente viral, sólo **permite sospechar su presencia**, a través del efecto que genera la infección del virus en el cultivo celular (las células infectadas adquieren una forma característica cuando hay virus) y aún así, en muchas oportunidades el efecto producido puede confundirse con un efecto citotóxico causado por la inoculación con tejidos, que por sí solos pueden causar efectos tóxicos, generando así resultados erróneos. Este efecto puede tardar hasta 15-20 días en aparecer, lo que incrementa la dificultad y tiempo requeridos para reconocer al patógeno, lo que se contraponía enormemente con las necesidades de los productores.

Objetivos técnicos:

Con este proyecto se pretendió desarrollar métodos de vanguardia para el diagnóstico de patógenos de peces de alta y baja incidencia a nivel nacional y mundial, utilizando técnicas de biología molecular. Con los métodos de diagnóstico desarrollados se pretendía identificara los patógenos tanto en tejido como en sangre y ovas infectadas. De modo de poder chequearlos alevines a partir del análisis del tejido, los reproductores a partir del análisis de la sangre, sin tener que sacrificar al pez y las ovas directamente.

Tipo de innovación desarrollada:

Hace algunos años, parte de las investigaciones dirigidas por la Dra. Ana María Sandino se han enfocado al desarrollo de métodos de diagnóstico de los virus de peces de mayor incidencia a nivel mundial (IPN e IHN), con el fin de evitar la introducción de estos agentes al país. Para esto se han aplicado técnicas de biología molecular, tales como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), utilizada en el diagnóstico de patógenos humanos, puesto que obviamente en este campo el desarrollo es el más avanzado. Esta herramienta tecnológica, se basa (al igual que el cultivo celular) en aumentar el contenido vírico, pero sin la utilización de células. Este aumento de virus se logra artificialmente, mediante el uso de una enzima (polimerasa) que es capaz de amplificar fragmentos de genoma viral en tan sólo unas pocas horas, prescindiendo así del uso de cultivos celulares. Se caracteriza por ser altamente sensible, específica, **permite identificar** al agente viral de un modo **seguro y rápido**, a diferencia de los métodos tradicionales ya mencionados. Utilizando la técnica de PCR se desarrollaron nuevos métodos de diagnóstico que permiten la identificación de patógenos acuícolas, tales como:

1) Virus de alta incidencia (a nivel mundial):

IPN (Necrosis Pancreática Infecciosa):

IHN (Necrosis Hematopoyética Infecciosa)

2) Virus de baja incidencia:

Virus del Oncorhynchus masou (VOM)

Septicemia hemorrágica viral (VHS)

Necrosis eritrocítica viral (VEN)

Encefalopatía, retinopatía y/o necrosis nerviosa (SJNNV)

Viremia primaveral de la carpa (SVC)

Anemia infecciosa del salmón (ISAV)

Leucemia del salmón (SLV)

3) Bacterias y protozoos de alta incidencia en Chile:

Renibacterium salmoninarum (BKD)

Piscirickettsia salmonis (SRS)

Enterocytozoon salmonis (Microsporidio)

Los métodos desarrollados no sólo tienen la particularidad de estar basados en una técnica de vanguardia, como lo es el PCR, sino que además permiten la identificación de los patógenos tanto a partir de tejido, sangre y ovas. Cabe destacar que el diagnóstico a partir de sangre y ovas se realiza exclusivamente en DIAGNOTEC, como resultado de este proyecto, ya que ni a nivel nacional ni mundial se dispone de esta alternativa.

3-METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO

Actividad 1:

Ensayo del método de diagnóstico de IPNV en tejido de peces:

Durante 4 meses se recibieron muestras y contramuestras de alevines con y sin síntomas de la enfermedad de tres pisciculturas nacionales. Cada empresa envió 5 pools (1 pool: 5 individuos) de alevines cada quince días, y órganos esporádicamente. Estas muestras se procesaron y se analizaron mediante PCR.

Actividad 2:

Propagación y purificación de los virus IPN e IHN a partir de células infectadas:

Monocapas de células CHSE-214 y EPC se infectaron con virus IPN e IHN, respectivamente. Una vez obtenido el efecto citopático aproximadamente a los 2 y 14 días, respectivamente, las células se congelaron y descongelaron, se concentraron con Polietilen-

glicol y se sometieron a sucesivas centrifugaciones con el fin de obtener el virus parcialmente purificado. Finalmente, el inóculo fue titulado utilizando el ensayo de placas de lisis. La concentración proteica y del genoma viral se determinó espectrofotométricamente.

Actividad 3:

Desarrollo del método de diagnóstico de IHNV:

La detección de IHNV, en un principio, se realizó utilizando como templado, virus obtenido de cultivo celular. Esto nos permitió establecer las condiciones óptimas para que la reacción RT-PCR sea específica para el virus en cuestión. Lo cual se comprobó con hibridación con sondas específicas.

Actividad 4:

Infección experimental de peces y ovas con los virus de mayor incidencia:

La infección con ambos virus se realizó en peces de las especies salmón coho (33-35 peces por acuario) y trucha arcoiris (35 peces por acuario). Los alevines se infectaron bajo las siguientes condiciones:

Los peces en ayuno se sumergieron durante una hora en agua que contenía una suspensión de 10^5 PFU/ml de ambos virus. Luego se traspasaron a acuarios con agua limpia. Se mantuvo un grupo control sin infectar en cada caso. A los alevines infectados se les extrajo sangre y posteriormente fueron sacrificados para la extracción de órganos. Ambos tipos de muestra fueron utilizados para probar los métodos desarrollados.

La infección experimental de ovas se realizó mediante inyección de distintas concentraciones de virus IPN, sin embargo las ovas debieron ser utilizadas inmediatamente, puesto que el material intracelular tendía a salir al exterior.

Actividad 5:

Desarrollo de los métodos para el diagnóstico de los virus IPN e IHN en tejido, sangre y ovas:

Basándose en el método desarrollado para la detección de IPNV en tejidos y en los resultados obtenidos en la detección de IHNV a partir de cultivo celular, se desarrolló un nuevo método para la detección de IHNV en tejido.

Con el fin de diagnosticar los virus de alta incidencia en sangre y ovas, se analizaron distintas técnicas descritas para el diagnóstico de patógenos, ya sea, humanos o animales. Evaluando las limitaciones y ventajas de los métodos descritos se postuló una modificación de una técnica utilizada en medicina forense para ambos casos. Finalmente se desarrollaron métodos para sangre y ovas que fueron probados en muestras infectadas experimentalmente. Adicionalmente, para el caso de IPNV, se probó el método a partir de sangre de reproductores naturalmente infectados y de ovas naturalmente infectadas.

Actividad 6:

Estudio de la sensibilidad y especificidad de los métodos desarrollados en tejido, sangre y ovas infectadas.

La sensibilidad obtenida con el método de diagnóstico en ovas es semejante a la obtenida para sangre y tejido.

Actividad 7:

Modificaciones de las técnicas desarrolladas, de modo de diseñar métodos simples de utilizar.

En esta etapa se probó distintos protocolos para simplificar las técnicas. Se comenzó modificando el paso de extracción previo al PCR, y luego se modificaron los tiempos y volúmenes de la reacción de PCR. Con esto se logró obtener un método rápido, económico y con la máxima sensibilidad.

Actividad 8:

Identificación de las cepas más importante de los virus IPN.

Se realizó una prospección de las distintas cepas de IPNV existentes en Chile. Luego, para cada una de las cepas en estudio, se seleccionaron y diseñaron los partidores adecuados.

Actividad 9:

Propagación y purificación de los virus de menor incidencia a partir de células infectadas.

En este punto nos encontramos con que los virus de menor incidencia de importancia en el país, como SLV no se puede cultivar en células, pero esto no impidió el desarrollo del método de detección por PCR, ya que esta enfermedad se asocia a la presencia de Enterocytozoon salmonis, para el cual hemos podido desarrollar el método de PCR. Por lo tanto hemos prescindido del cultivo celular consiguiendo controles positivos desde peces infectados.

Otro virus importante en nuestro país es el caso del virus ISA. Para el desarrollo de un método de detección por PCR no se requiere el cultivo celular para propagar el virus, puesto que con la literatura existente se han podido diseñar los partidores adecuados para detectar el virus a partir de peces naturalmente infectados. Sin embargo igual se están realizando los esfuerzos para conseguir las células y el virus con el fin de desarrollar el cultivo celular, como un elemento de apoyo.

Desde hace un tiempo Chile ha comenzado la introducción de nuevas especies de peces, como Halibut, Turbot, Carpa, entre otros. Por este motivo se requirió el desarrollo de métodos de diagnóstico de los virus que afectan preferentemente a estas especies, como son: SJNNV y SVC. Esto nos llevó a desarrollar métodos de detección para ambos virus. En el caso de SJNNV, al igual que ISA y SLV no es posible su propagación en cultivo, en cambio SVC sí lo permite, por lo que se realizó propagación en cultivo celular.

Por último se cuenta con cultivo celular para la propagación de los virus VHS y OMV.

Actividad 10:

Desarrollo de métodos de diagnóstico utilizando PCR para los virus de menor incidencia.

Como se explicó en el punto anterior, se han comenzado a desarrollar los métodos por PCR para los virus de menor incidencia correspondientes a: SLV, ISAV, SJNNV y SVC. Se dispone de los métodos para la detección de VHS y OMV, pero dado su baja importancia a nivel nacional en la actualidad, no se ha solicitado aún su diagnóstico.

Actividades 11, 12 y 13:

Inoculación experimental, diagnóstico y estudio de la sensibilidad y especificidad de la detección de virus de menor incidencia a partir de tejido, sangre y ovas de peces.

Debido a que no se obtuvo autorización de las autoridades competentes para la introducción de virus supuestamente inexistentes en el país, aunque sea para uso de investigación, estas tres actividades no pudieron ser desarrolladas tal como se había propuesto inicialmente. Luego de evaluar necesidades contingentes en la industria acuícola se decidió desarrollar métodos de diagnóstico para los patógenos de mayor incidencia a nivel nacional, aunque no fuesen de origen viral en reemplazo a estas actividades. Estos corresponden a las bacterias *Renibacterium salmoninarum* (BKD) y *Piscirickettsia salmonis* (SRS).

Actividades finales:

Desarrollo de métodos de diagnóstico por PCR para la detección de *Renibacterium salmoninarum* (BKD) y *Piscirickettsia salmonis* (SRS).

Basándose en métodos previamente descritos para estas bacterias se seleccionaron y diseñaron partidores específicos para cada uno de los patógenos. Los cuales fueron probados utilizando distintas cepas de *R.salmoninarum* y distintos aislados de *P. salmonis*, los cuales fueron propagados en medio de cultivo KDM-2 y en células CHSE-214, respectivamente.

Desarrollo de un método de diagnóstico por PCR para la detección de *Renibacterium salmoninarum* (BKD) y *Piscirickettsia salmonis* (SRS) a partir de sangre y tejido de peces naturalmente infectados

Durante 3 meses se recibieron muestras y contramuestras de peces con y sin síntomas de las enfermedades. Estas muestras se procesaron y se analizaron mediante el PCR desarrollado.

Estudio de la sensibilidad del método desarrollado a nivel de campo

Con el fin de determinar la factibilidad de detectar los patógenos realizando pools de individuos sintomáticos, asintomáticos y sanos durante un screening de reproductores, se realizaron pools con distintas combinaciones de muestras.

CARTA GANTT

	Año 1												Año 2												
	MES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1) Ensayo método de IPNV en tejidos																									
2) Propagación y purificación VAI*																									
3) Desarrollo método IHNV en tejido																									
4) Infección exp. peces y ovas VAI*																									
5) Desarrollo método sangre y ovas VAI																									
6) Informe de avance N° 1																									
7) Sensibilidad y especificidad																									
8) Modificación técnicas desarrolladas																									
9) Identificación cepas IPNV																									
10) Propagación y purificación VBI*																									
11) Desarrollo método diagnóstico VBI*																									
12) Informe de avance N° 2																									
13) Diagnóstico Enterocytozoon salmonis																									
14) Diag. R. Salmoninarum y P. Salmonis																									
15) Sensibilidad a nivel de campo																									
16)) Informe Final																									

VAI*: virus de alta incidencia

VBI*: virus de baja incidencia

4-RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Como resultado del proyecto se desarrollaron métodos de diagnóstico molecular basados en la técnica de PCR para la detección de los patógenos de mayor incidencia a nivel nacional, los que corresponden a: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* y *Enterocytozoon salmonis*.

Estos métodos son capaces de detectar específicamente cada uno de los patógenos, en muestras de tejidos, sangre y ovas de peces, tanto sintomáticos como asintomáticos. La sensibilidad obtenida para cada una de las muestras fue semejante, sin embargo en sangre fue levemente superior. (VER FIGURAS 1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Lo más importante de estos logros es el contar con métodos de diagnóstico que permiten la detección directa de los patógenos a partir de sangre y ovas, lo que no había sido descrito previamente y es exclusivo de DIAGNOTEC.

La rapidez (1 a 3 días), inocuidad y sensibilidad de los métodos desarrollados da la posibilidad de aplicarlos a nivel de screening de reproductores, sin necesidad de sacrificar a los individuos e incluso realizar pools de peces de modo de que sea una alternativa económicamente factible y estadísticamente significativa. (VER TABLA 1)

Adicionalmente se desarrollaron métodos para la detección de virus de menor incidencia a nivel mundial inexistentes en Chile, con el fin de impedir la introducción de estos patógenos al país. Estos corresponden a:

Virus de la Necrosis Hematopoiética Infecciosa (IHNV)

Virus del *Oncorhynchus masou* (VOM)

Septicemia hemorrágica viral (VHS)

Necrosis eritrocítica viral (VEN)

Encefalopatía, retinopatía y/o necrosis nerviosa (SJNNV)

Viremia primaveral de la carpa (SVC)

Anemia infecciosa del salmón (ISAV)

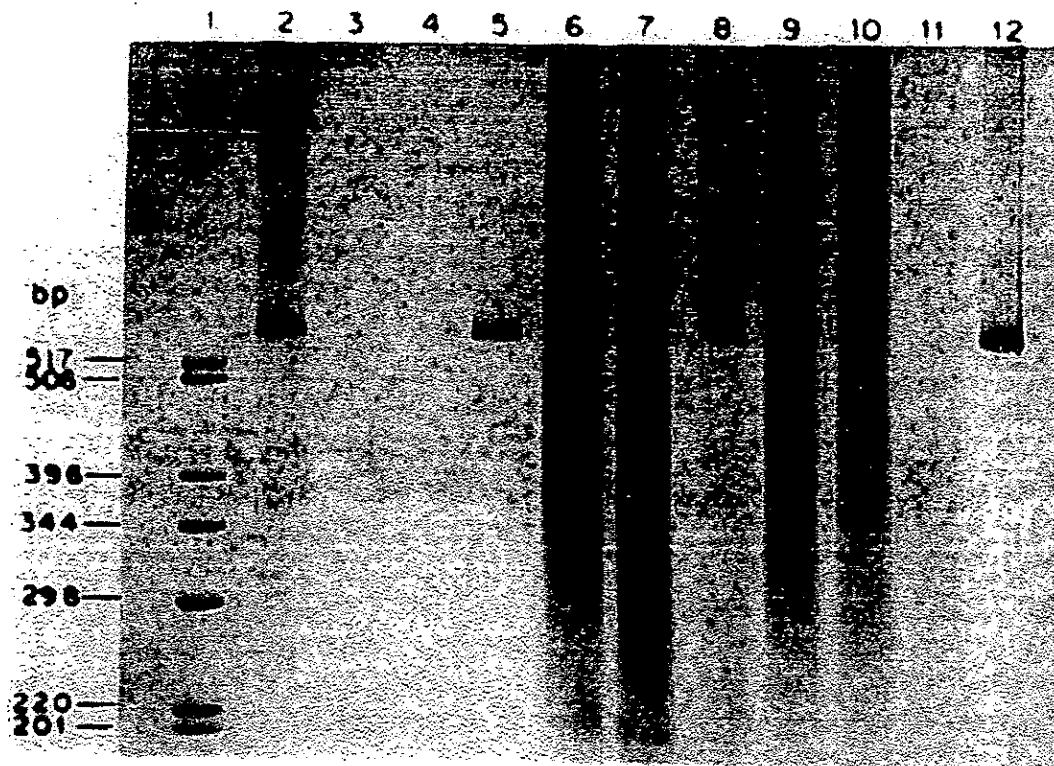


Figura 1: Detección del virus IPN en tejidos de peces sintomáticos y asintomáticos y en ovas infectadas experimentalmente. Gel de poliacrilamida al 12% donde se detectó el producto de amplificación obtenido de la reacción RT-PCR. (1) marcador de tamaño, (2) control positivo (cDNA de la proteína VP2), (3) control negativo (células no infectadas) (4) control positivo (riñón de salmón coho sano), (5 al 7) riñón de trucha, riñón de salmón coho y bazo de trucha asintomáticos, (8 al 10) muestras de bazo de salmón coho, bazo y riñón de trucha arcoiris de peces sintomáticos, (11) ovas sanas, (12) ovas infectadas experimentalmente con IPNV.

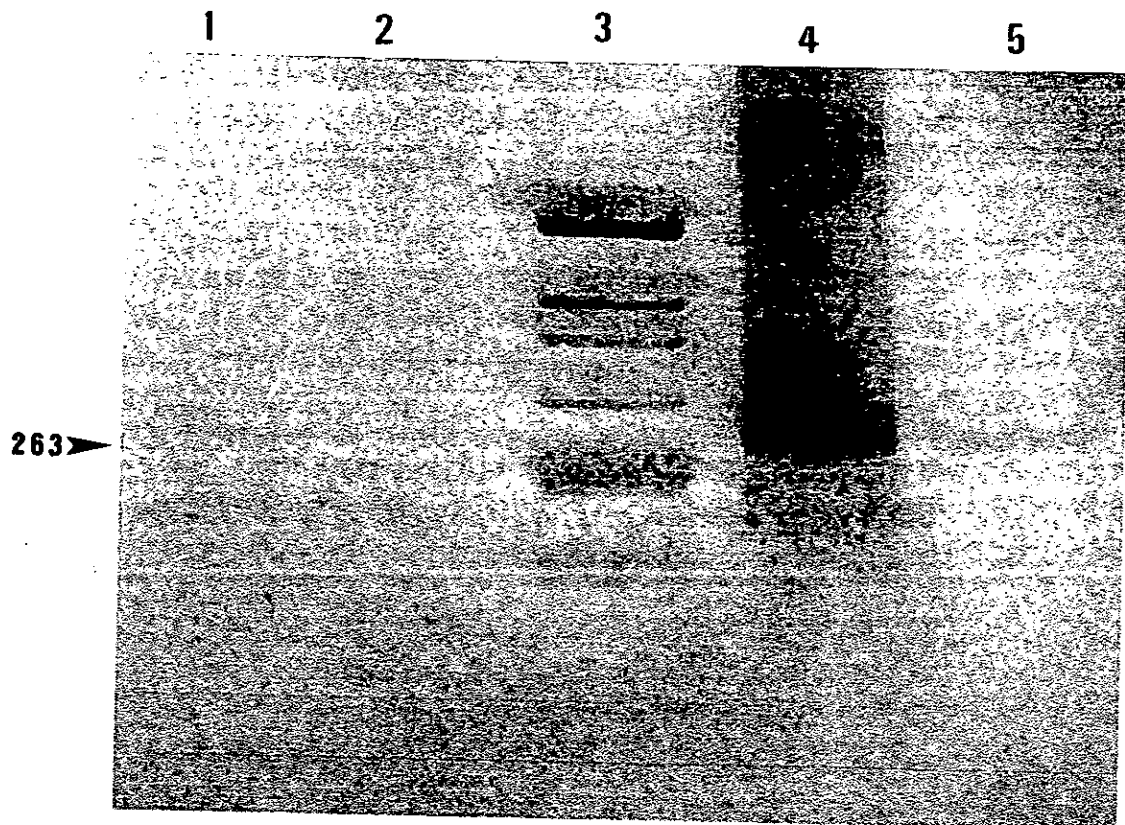


Figura 2: Detección de virus IPN en ovas infectadas naturalmente. Carril (1) ovas sanas, (2) control negativo, (3) Marcador de tamaño, (4) control positivo, (5) producto de amplificación de 263 pb obtenido de ovas naturalmente infectadas.

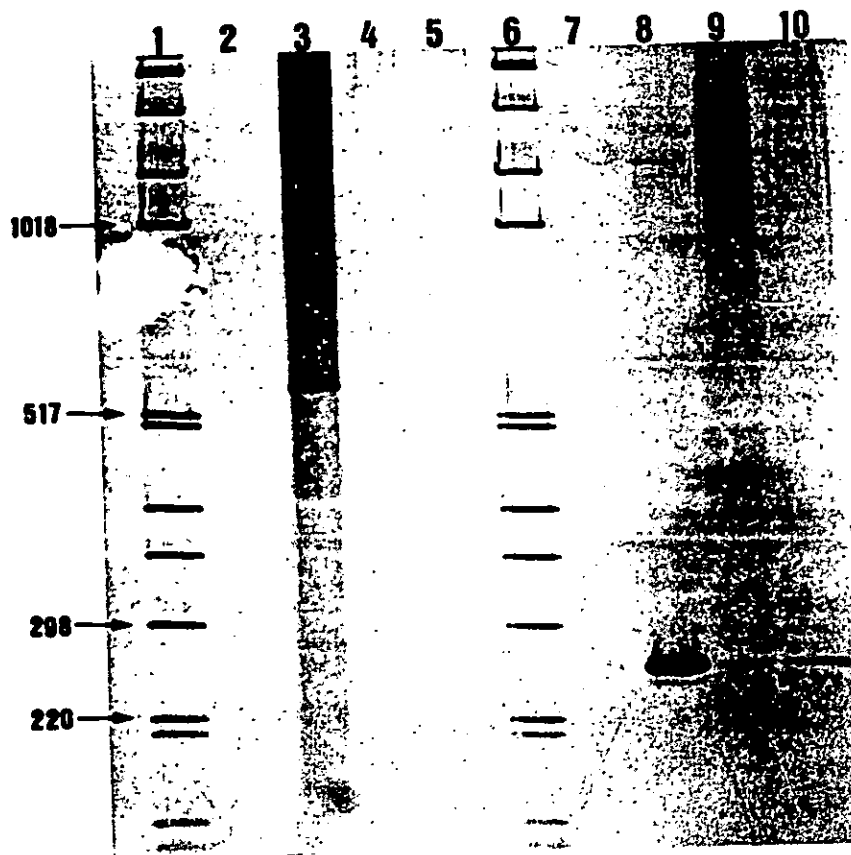


Figura 3: Detección de virus IPN en tejido y en sangre de peces infectados. Carril (1) Marcador de tamaño, (2) Control negativo, (3) Control positivo, (4) y (5) Producto de amplificación (657 bp) obtenido de tejido de peces infectados,(6) Marcador de tamaño, (7) Control negativo, (8) Control positivo , (9) y (10) Producto de amplificación (263 bp) obtenido de sangre de peces infectados.

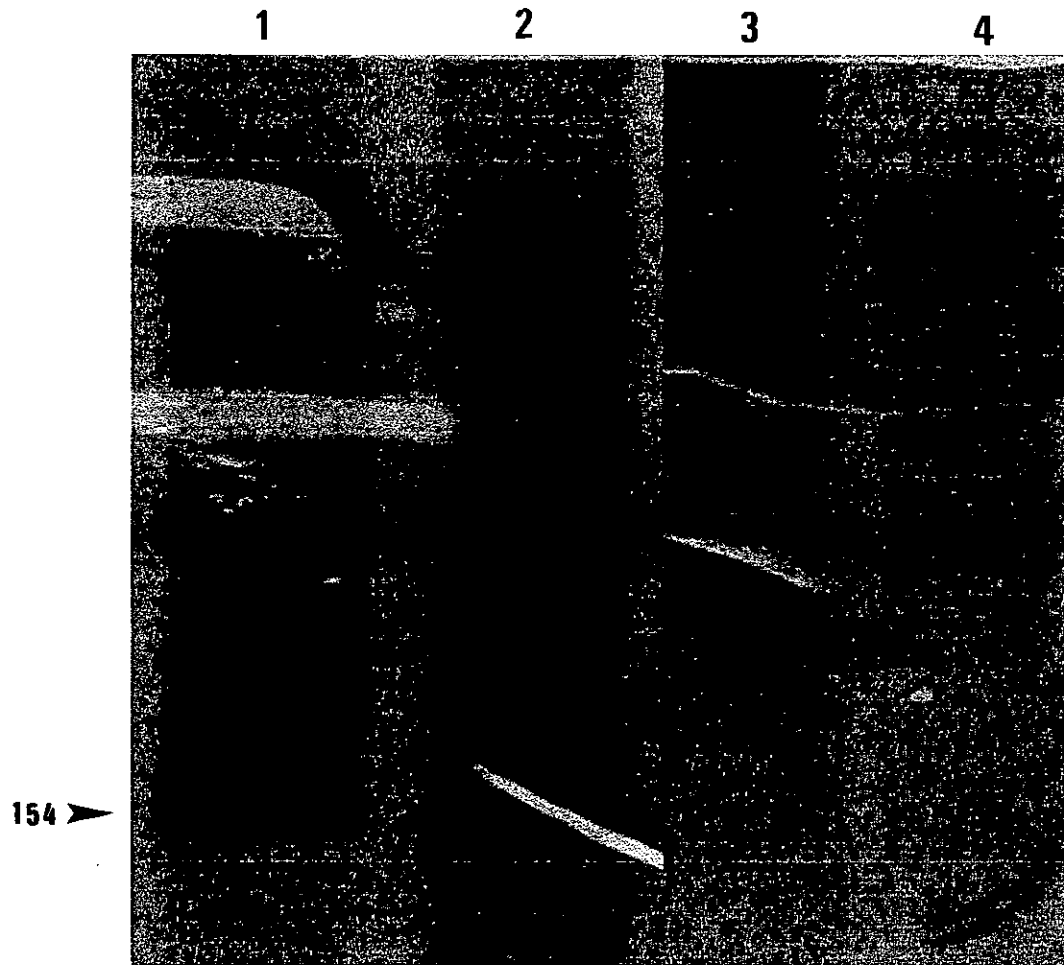


Figura 4: Detección de Enterocytozoon salmonis a partir de tejido infectado naturalmente. Carril (1) producto amplificado de 154 pb obtenido a partir de tejido naturalmente infectado, (2) control positivo, (3) control negativo, (4) marcador de tamaño

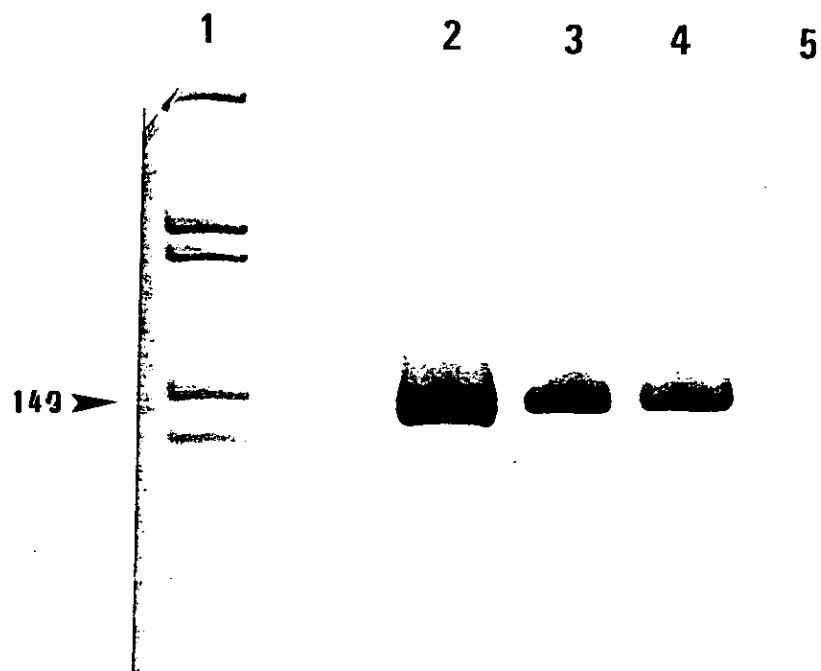


Figura 5: Detección de Renibacterium salmoninarum a partir de sangre y tejido de peces infectados naturalmente. Carril (1) marcador de tamaño, (2) producto amplificado de 149 pb obtenido a partir de sangre, (3) producto amplificado de 149 pb a partir de tejido (4) control positivo, (5) control negativo.

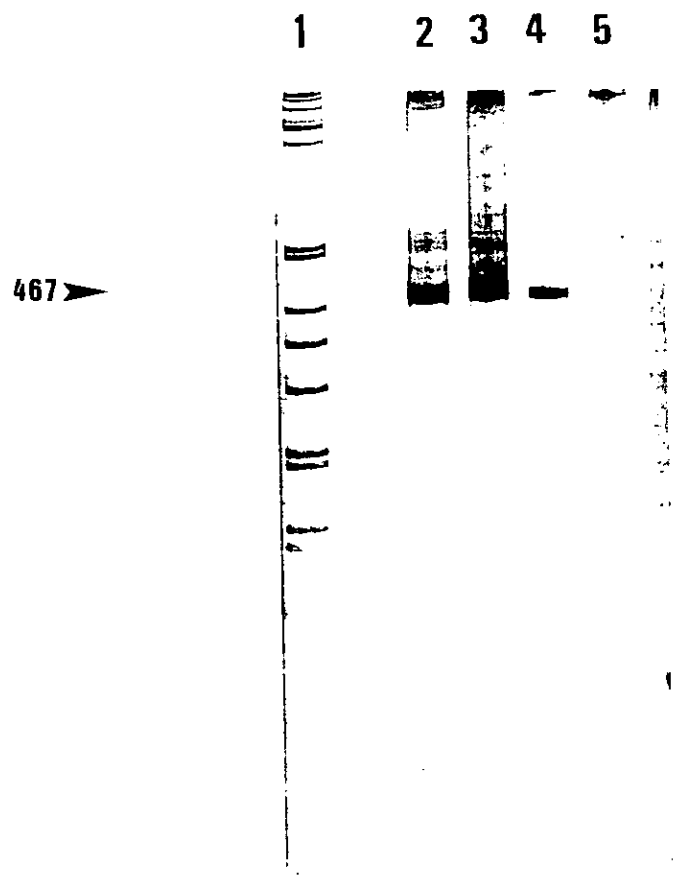


Figura 6: Detección de Piscirickettsia salmonis a partir de sangre y tejido de peces infectados naturalmente.

Carril (1) marcador de tamaño, (2) producto amplificado de 467 pb obtenido a partir de sangre, (3) producto amplificado de 467 pb a partir de tejido (4) control positivo, (5) control negativo.

TABLA 1. Detección de *R. salmoninarum* y *P. salmonis* a partir de pools de sangre de peces mediante el uso de PCR.

Tamaño pool		Composición pool		Resultados PCR			
				<i>R. salmoninarum</i>		<i>P. Salmonis</i>	
Número peces	Peces sanos	Peces infect.	Sintomáticos	Asintomáticos	Sintomáticos	Asintomáticos	
2	1	1	+	+	+	+	
3	2	1	+	+	+	+	
4	3	1	+	-	+	-	
5	4	1	+	-	+	-	

Debido a que las autoridades competentes no permitieron el ingreso de estos patógenos al país, además del PCR se implementaron las líneas celulares respectivas con objeto de propagar las muestras sospechosas provenientes de las pisciculturas nacionales.

5-IMPACTO DEL PROYECTO:

El proyecto implementado a nivel productivo tiene un impacto a nivel de:

- Aumento de la productividad de las empresas acuícolas debido a la disminución de las enfermedades y mortalidades mediante un diagnóstico precoz.
- Evitar la diseminación de los agentes infecciosos debido a la rapidez y sensibilidad de los métodos desarrollados.
- Tomar medidas sanitarias oportunas que para el caso de los virus es el único medio de control disponible
- Aumento de valor agregado de los peces ya que los métodos permiten certificar la ausencia de patógenos.
- Screening de reproductores a partir de sangre, ya que su inocuidad permite un monitoreo de la generación siguiente, anticipado al desove.
- Screening de reproductores, rápido, económico y estadísticamente significativo.
- Certificación de ovas.
- Movimiento de peces libres de enfermedades.
- Disminución de costos por el uso indiscriminado de antibióticos que se realiza cuando no se realiza un diagnóstico certero y oportuno.
- Ambiente, ya que se evita la diseminación de los patógenos, lo que permite tener zonas libres, debido principalmente a la rapidez y sensibilidad de los métodos.
- Calidad del diagnóstico, lo que se traduce en contar con un diagnóstico específico y no una sospecha.

- Credibilidad del diagnóstico viral.
- Programas de vigilancia epidemiológica adecuados y oportunos dentro del marco productivo.
- Contar a nivel de la acuicultura nacional con técnicas de vanguardia incluso inexistentes a nivel mundial.
- Fomentar el desarrollo tecnológico en el país.

La implementación de los resultados del proyecto por parte de DIAGNOTECH se realizó progresivamente a medida que cada uno de los métodos desarrollados fue probados a nivel de campo, así actualmente se otorga el servicio de diagnóstico para todos los patógenos involucrados en el desarrollo del proyecto.

Durante el screening de reproductores recién pasado, la utilización de los métodos desarrollados, por parte de las empresas que requirieron de nuestros servicios, les permitió seleccionar eficientemente los reproductores sanos en forma oportuna y certera. Cabe destacar que se han realizado comprobaciones de los resultados de nuestros métodos mediante métodos tradicionales con pleno éxito.

El éxito en la introducción de estos métodos en el mercado acuícola se ha visto reflejado en el aumento sustancial de ventas de DIAGNOTECH y en la demanda de los servicios ofertados.

6-ANEXOS

ANEXO Nº 3
ESTRUCTURA DE COSTOS REALES (*) PROYECTOS INNOVACION
TECNOLOGICA

(Valores expresados en Miles \$)

PARTIDAS DE COSTO	COSTO TOTAL PROYECTO
Personal de Investigación	88.320
Personal de Apoyo	9.882
Servicios, Mat. y Otros	36.520
Usos de Bienes de Capital	10.853
Adquisición de Bienes de Capit.	—
TOTAL (Miles de \$)	145.575

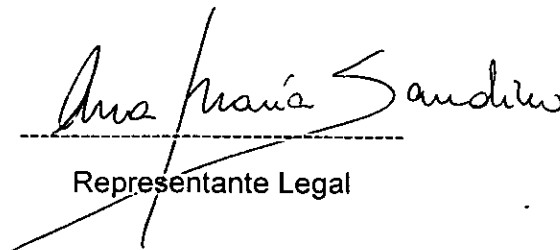
(*) Se entiende por Costo Real del Proyecto a todos los gastos realizados durante el desarrollo del proyecto, inclusive aquellos no previstos y que han debido ser financiados con mayores aportes de la empresa.

Declaro bajo juramento que los datos contenidos en este Resumen de Estructura de Costos del Proyecto son verídicos.



Contador

EDGARDO KRAMM A.
CONTADOR - ANALISTA FINANCIERO
INDEP. COLEGIO DE CONTADORES
DE CHILE A.G.



Representante Legal

2.3.- Comentarios (USO EXCLUSIVO FONTEC)

La información que respalda la presente rendición se encuentra disponible en el Departamento de Contabilidad de la empresa para cualquier consulta o revisión por parte de FONTEC u otro organismo fiscalizador.
Declaro bajo juramento que los datos contenidos en esta Declaración de Gastos son verídicos. Asimismo, declaro conocer las disposiciones relativas a sanciones en caso de suministrar informaciones incompletas, falsas o erróneas.

Alicia Francisca Sanchez

Nombre y Firma Representante Legal

[Firma manuscrita]

Contador

EDGARDO KRAMM A.
CONTADOR - ANALISTA FINANCIERO
INDEP. COLEGIO DE CONTADORES
DE CHILE A.G.

Nombre y Firma Ejecutivo Proyectos

ANEXO N° 4

IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

Nombre Proyecto	APLICACION Y DESARROLLO DE UN SERVICIO INTEGRAL DE DIAGNOSTICO VIRAL PARA SALMONIDOS MEDIANTE TECNOLOGIA AVANZADA
Empresa	LABORATORIO DE DIAGNOSTICO GAM LTDA

IMPLEMENTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

(Señalar los principales resultados obtenidos en el proyecto y las acciones que se desarrollarán para implementar productivamente el proyecto)

Como resultado del proyecto se desarrollaron métodos de diagnóstico molecular basados en la técnica de PCR para la detección de los patógenos de mayor incidencia a nivel nacional, los que corresponden a: Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* y *Enterocytozoon salmonis*.

Estos métodos son capaces de detectar específicamente cada uno de los patógenos, en muestras de tejidos, sangre y ovas de peces, tanto sintomáticos como asintomáticos. Así, el Laboratorio de Diagnóstico Gam Ltda. (DIAGNOTECH) cuenta con métodos de diagnóstico que permiten la detección directa de los patógenos a partir de sangre y ovas, lo que no ha sido descrito previamente y es exclusivo de nuestro laboratorio.

Adicionalmente se desarrollaron métodos para la detección de virus de menor incidencia a nivel mundial inexistentes en Chile, con el fin de impedir la introducción de estos patógenos al país. Estos corresponden a: Virus de la necrosis hematopoiética infecciosa (IHNV), Virus del Oncorhynchus masou (VOM), Virus de la septicemia hemorrágica (VHS), Virus de la Necrosis eritrocítica (VEN), Virus de la encefalopatía, retinopatía y/o necrosis nerviosa (SJNNV), Viremia primaveral de la carpa (SVC), Virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV)

Todos los métodos de diagnóstico desarrollados están implementados a nivel comercial desde que se desarrollaron y una vez que se realizaron los estudios de campo correspondientes. La utilización de estos métodos durante la época de screening de reproductores por parte de algunas pisciculturas nacionales que requirieron de nuestro servicio, se realizó con pleno éxito y permitió la erradicación de los individuos infectados de modo de evitar la propagación de los patógenos en nuestro país.