



### **NOMBRE DEL PROYECTO.**

Elaboración de un mapa geográfico nacional de distribución de las variantes genéticas de Mycobacterium bovis aislado de rebaños infectados. Implementación de una red interdisciplinaria.

### **ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN.**

Se centrará fundamentalmente en la IX a XII región (zona de erradicación) y desde la V, RM a la XVIII (zona de control).

### **INSTITUCIONES RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.**

#### **AGENTE POSTULANTE. RESPONSABLE DEL PROYECTO:**

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

#### **INSTITUCIÓN ASOCIADA PARA LA EJECUCIÓN:**

### **RESUMEN DE COSTOS Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO (\$).**

COSTO TOTAL PROYECTO	100%	424.708.000
APORTE SAG	57%	240.061.000
APORTE POSTULANTE	43%	184.647.000

## FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO (EN MESES).

FECHA DE INICIO	Marzo 2008
FECHA DE TÉRMINO	Marzo 2011
DURACIÓN DEL PROYECTO (MESES)	48 meses

## RESUMEN DEL PROYECTO.

### PROPÓSITO. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

#### OBJETIVO GENERAL

Generar un mapa de distribución de las variantes genéticas de M bovis prevalentes en el país, apoyado en una red interdisciplinaria que garantice la representatividad del patógeno en cada región geográfica.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar una estrategia de aislamiento de cepas con trazabilidad registrada para garantizar la debida representación de cepas por región.
2. Identificar los focos de alta y baja prevalencia de tuberculosis bovina, focos con persistencia y brotes de la enfermedad para recolección de cepas representativas de cada grupo.
3. Corroborar la identidad de las cepas recolectadas mediante PCR tiempo real (BoviMan) específico para M bovis.
4. Registrar el perfil genético de las cepas de M bovis utilizando como marcador genético el polimorfismo del locus DR obtenido por de análisis de espoligotipos.
3. Generar una base de datos de los perfiles genéticos de M bovis para el posterior análisis de distribución de “clusters”.
4. Elaboración de un mapa geográfico que localice los grupos o “clusters” de cepas según su localización geográfica y antecedentes epidemiológicos.

5. Análisis epidemiológico del mapa de distribución genética de *M bovis* con el fin de extraer conclusiones respecto a rutas de diseminación del patógeno, factores de riesgo y definir el origen endógeno o exógeno de brotes o persistencia del patógeno en una localidad.
4. Transferir la tecnología de genotipificación a los Laboratorios autorizados para el diagnóstico de bTB (Laboratorios SAG) con el objeto de sustentar actualizado el mapa de distribución del patógeno. El logro de este objetivo permitirá contar además con un mayor número de laboratorios y con ello, alcanzar el análisis de un mayor número de cepas genotipificadas.

## RESULTADOS ESPERADOS AL FINALIZAR EL PROYECTO.

1. Obtención de un protocolo de obtención de cepas para mantener actualizado el mapa de distribución geográfica y así poder registrar la evolución del patógeno en el país.
2. Disponer de un mapa de distribución geográfica con los puntos localizados de focos de alta y baja prevalencia de tuberculosis bovina, focos con persistencia y brotes de la enfermedad para recolección de cepas representativas de cada grupo.
3. Contar con el registro de los perfiles genéticos de al menos 1400 cepas de distintas regiones del país, provenientes de rebaños infectados y animales domésticos y silvestres de los cuales se obtengan cepas de *M bovis*.
4. Generar una base de datos de los perfiles genéticos de *M. bovis* y relacionarlos con la base de datos internacional ([www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)) para el estudio evolutivo del patógeno y su relación con los países con los cuales Chile comercializa.
5. Disponer de un registro de las condiciones epidemiológicas asociadas a la distribución de *M bovis* con el objeto de controlar factores de riesgo que contribuyen a la diseminación del patógeno.
6. Este proyecto fortalecerá el programa de erradicación de bTB, culminando con

Laboratorios autorizados, capacitados e implementados con la tecnología genética de punta para la genotipificación de *M bovis* y diagnóstico molecular basado en la técnica de PCR tiempo real oficial.

## **BENEFICIOS DEL PROYECTO.**

### Ambito económico:

- Menor pérdida por decomisos de animales de rebaños lecheros
- Aumento en la producción de leche por disminución de la prevalencia predial
- Aumento en la producción de carne por disminución de rebaños infectados
- Disminución del decomiso en rebaños de producción de carne.
- Aumento de rebaños certificados como libre de bTB
- Aumento de exportaciones lecheras a los países más exigentes que generan los mayores precios del mercado internacional.

### Ambito social

- Control de factores de riesgo para la diseminación de la bTb en el país.
- Control de zoonosis
- Aumento de la calidad de los productos y con ello, del negocio pecuario
- Control a nivel de potenciales reservorios de bTB.
- Actualización y fortalecimiento de los laboratorios de referencia en el diagnóstico molecular y genotipificación
- Aumento de la confianza y apoyo de los productores a las acciones de control de la autoridad sanitaria
- Formación de una red interdisciplinaria para mantener el control de la bTB.
- Fortalecimiento de la investigación de micobacterias.
- Apoyo a plan de erradicación d bTB.

## **BENEFICIARIOS(AS) DIRECTOS(AS) DEL PROYECTO.**

### **Ambito económico**

- Productores lecheros ya que la masa ganadera es el nicho que favorece la diseminación de la bTB. Aseguran la certificación de sus rebaños.
- Productores de carne por la certificación y mejor valoración de sus productos.
- Plantas lecheras, posibilidad de acceso a los mejores mercados
- Laboratorios de referencia: actualización y fortalecimiento en el diagnóstico. Incorporación de nuevas herramientas para el desarrollo de la epidemiología molecular.
- Empresas biotecnológicas: desarrollo de nuevas líneas de producción.
- Plantas Faenadoras de carne: disponibilidad en el mercado de herramientas moleculares para el servicio diagnóstico y de control de bTB a sus proveedores. Disminución del tiempo diagnóstico a 24-48 hrs.
- Aumento en general en el valor agregado a los productos pecuarios de exportación.
- Apoyo a las políticas de gobierno en el desarrollo silvoagropecuario.

### **Ambito social**

- Salud pública con la incorporación de nuevas herramientas diagnósticas y de genotipificación para el control de zoonosis.
- Ganadero: aumento de la valoración de sus rebaños y con ello, valoración social.
- Disminución de zoonosis
- Control de reservorios de bTB.
- Apoyo al plan de erradicación bTB

### **Laboratorios de Referencia**

- Actualización y fortalecimiento de las técnicas diagnósticas y genotipificación.
- Mayor valoración y confianza del ganadero en los laboratorios de referencia.
- Posibilidades de incorporación a una red internacional de control de bTB.
- Fortalecimiento de su alianza con laboratorios de investigación sobre bTB.
- Actualización e Innovación de laboratorios.

### **Universidad**

- Fortalecimiento de su rol social al transferir conocimiento y tecnología
- Formación de profesionales en el área del diagnóstico molecular y la genómica
- Posibilidades de desarrollo de nuevas líneas de investigación



GOBIERNO DE CHILE  
SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO  
SAG

---

Unidad Coordinadora Fondo de Mejoramiento del Patrimonio Sanitario

- Fortalecimiento del laboratorio en investigación en genómica micobacteriana y otras enfermedades infecciosas.

## DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA.

### 1. Organización del equipo interdisciplinario

La primera etapa del proyecto demanda de la formación de un equipo interdisciplinario integrado por la Jefa del Laboratorio de Genómica y Biotecnología del Instituto de Bioquímica de la UACH, el equipo de profesionales del programa de bTB de los laboratorios de referencia (SAG), un epidemiólogo (de la UACH o de SAG), veterinarios independientes acreditados en bTB y profesionales de las plantas faenadoras que mantienen registros de antecedentes y un representante del programa de control y erradicación de SAG para facilitar la disponibilidad y acceso a la información

El equipo diseñará una estrategia para la selección de rebaños infectados según distribución geográfica, registro de antecedentes epidemiológicos, aislamiento y cultivo de cepas, genotipificación, elaboración de mapa geográfico y análisis de resultados y conclusiones.

### 2. Tamaño muestral

El tamaño de la población a genotipificar se definirá inicialmente considerando que existe en registro de SAG, 6520 rebaños lecheros infectados según se indica en la tabla

Estos rebaños se encuentran distribuidos en distintas regiones de Chile con una frecuencia y prevalencia variable (ver mapa más abajo)

#### Situación de rebaños infectados

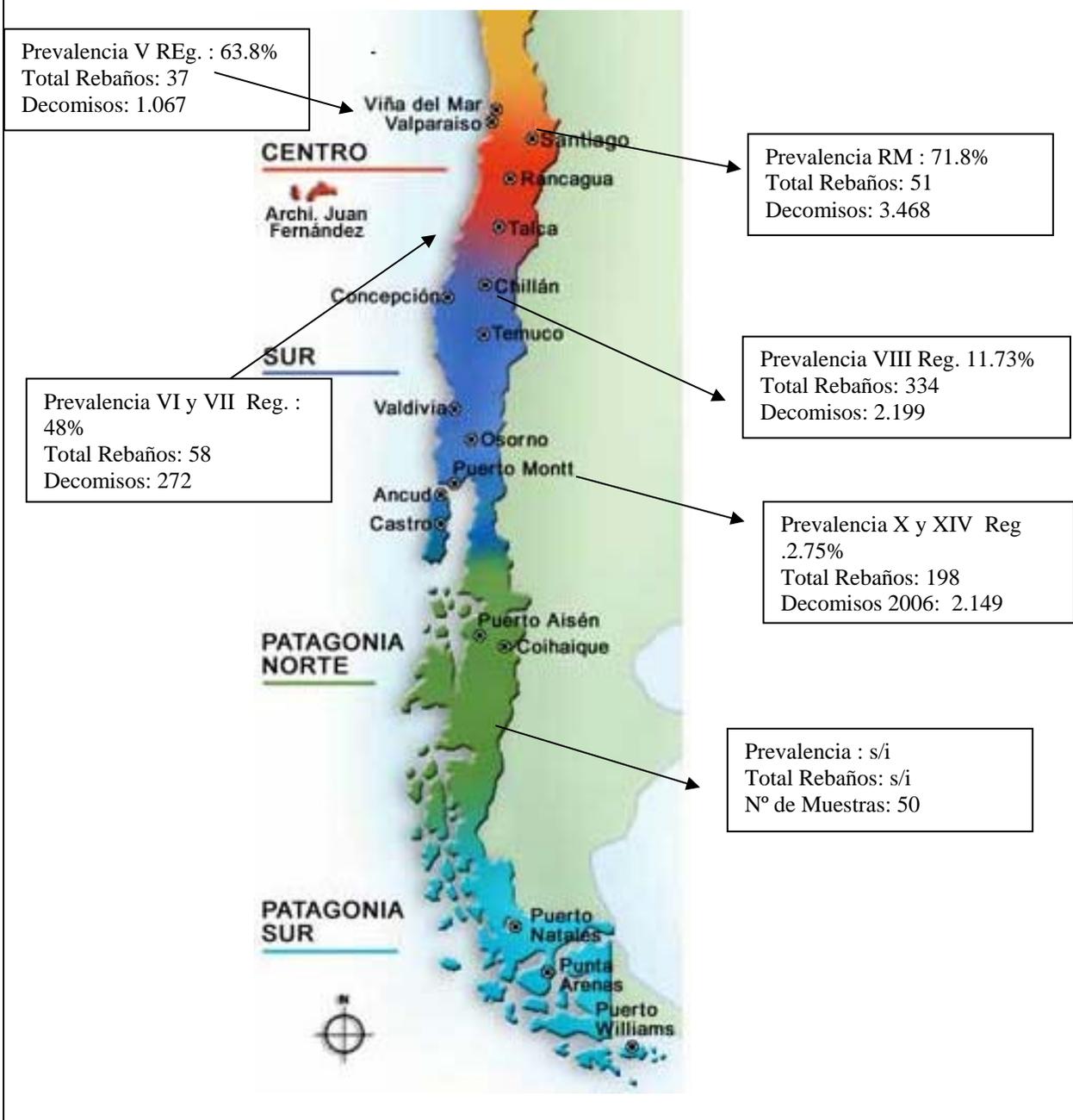
**Tabla 2. Prevalencia de TBB en rebaños lecheros y animales, por Región.**

Región	Número Rebaños	Prevalencia %	Número Rebaño +	Número Vacas	Prevalencia %	Número Vacas +
V	1.777	63.0	1.120	12.222	30.0	3.667
VI	2.568	48.0	1.233	14.979	17.3	2591
VII	4.671	40.3	1.882	22.480	15.5	3.484
VIII	8.476	11.7	992	73.112	4.4	3.217
IX	9.066	3.2	293	71.844	1.2 <sup>1</sup>	862
X	17.598	2.8	484	378.853	1.1 <sup>1</sup>	4.167
RM	720	71.8	517	31.587	29.8	9.413
<b>Total</b>	<b>48.356</b>	<b>13.5</b>	<b>6.520</b>	<b>605.077</b>	<b>4.5</b>	<b>27.401</b>

Fuente: INE 1997 y SAG 2003 – 2004.



### MAPA GEOGRÁFICO: CONCENTRACIÓN SEGÚN PREVALENCIA EN LECHERIAS REACCIONANTES A bTb.





En consecuencia, considerando que el laboratorio de referencia SAG genera a la fecha aproximadamente 2000 cultivos anuales, el 30% de las cepas podrían provenir de distintos rebaños. Esto es, 600 cepas al año.

En base a lo anterior, para el primer año se genotificarán 200 cepas, el año 2 y 3 se genotificarán 600 cepas por año para culminar con un total de **1400 cepas totales**, número que se espera aumentar una vez que el Laboratorio acreditado se capacite y adquiera el equipamiento y software.

Considerando la prevalencia y distribución de rebaños infectados, nuestra primera propuesta de selección de animales sería:

Zona	Prevalencia	Nº vacas	%	Total rebaños infectados	Total anim. selecc.
Vº Reg	63,8%	37	5.5%	325	77
VI VII	48 %	58	8.5%	520	119
VIII	11,7%	334	49.0%	3,250	686
X XIV	2,75	198	29.0%	1,885	406
RM	71%	51	8.0%	520.	112
<b>Total</b>		<b>678</b>	<b>100%</b>	<b>6.500</b>	<b>1400</b>

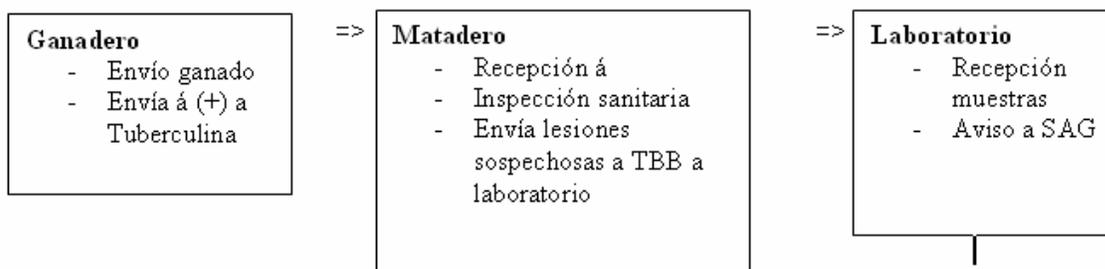
Con esto se generará un cepario y genoteca nacional de M bovis.

#### 4. Obtención de muestras en Plantas Faenadoras y generación de cultivos.

Los animales seleccionados, reactores a la tuberculina para la obtención de lesiones serán enviados por el ganadero a las plantas faenadoras, donde se les realizará inspección sanitaria en busca de lesiones en nódulos compatibles con tuberculosis. Estas serán enviadas a laboratorio; las que resulten positivas a PCR tiempo real, serán cultivadas y los cultivos enviados a la UACH para genotipificación. La planta faenadota aportará con los registros de origen de cada muestra, inspección sanitaria y

envío a laboratorio.

Muestras obtenidas en Instituto de Patología UACH: las muestras de lesiones encontradas durante necropsia de animales bovinos, domésticos o salvajes que cuenten con datos de origen geográfico, serán enviadas al laboratorio de referencia para cultivo y posterior genotipificación. Este punto es importante por cuanto a nivel de Universidades es posible aumentar las oportunidades de aislamiento de cepas provenientes de animales no bovinos.



Para la obtención de cultivos con trazabilidad se debe considerar:

- Todo animal que llegue a la planta faenadora debe contar con identificación del predio de origen, aunque se haya transado en Feria.
- Todo animal debe llegar a la planta faenadora con identificación individual.
- Todo animal positivo a Tuberculina debe enviarse con destino final planta faenadora (obligatorio en Plan de Erradicación de TBB a partir de 2008).

Todas las lesiones sospechosas a TBB deben enviarse al laboratorio con una ficha de identificación. De esta forma podemos asegurar que toda lesión sospechosa a TBB llegue al laboratorio con la identificación correspondiente.

El problema se encuentra en los casos en que el animal se haya comercializado previamente y por ende, tenga más de un predio. En esos casos sólo se podrá conocer su trazabilidad si es que el animal llega a la planta faenadora con DIIO (dispositivo de identificación individual oficial), el que se identifica en el predio donde nace el animal y es su numeración definitiva y se debe informar al SAG los

movimientos de él.

Definiremos como Predio Origen, al predio desde donde viene el animal a la planta faenadora, independiente que se haya transado o no en Feria. De esta forma debemos considerar dos fichas de identificación.

1. Ficha de Identificación Animal de animal que nació en predio origen:

- Nombre planta faenadora
- Fecha faena
- Tipo de animal
- Nombre predio origen (de donde viene el animal)
- Nombre propietario
- RUP (rol único pecuario, obligatorio a partir de 2008)
- Identificación individual del animal (RP o DIIO)

2. Ficha de Identificación Animal con más de un origen (animal no nació en predio origen):

- Nombre planta faenadora
- Fecha faena
- Tipo de animal
- Nombre predio origen (de donde viene el animal)
- Nombre propietario
- RUP (rol único pecuario, obligatorio a partir de 2008)
- DIIO del animal

### **5. Genotipificación de M bovis**

Los cultivos que se reciban en el Laboratorio de Genómica y Biotecnología de la UACH serán confirmados positivos a M bovis por PCR, previo a la extracción del DNA genómico. Este laboratorio ha desarrollado y validado recientemente un test de PCR tiempo real, BoviMan, para M bovis, Test ya aceptado por SAG como prueba oficial para el programa de vigilancia. La tecnología para genotipificación ya se encuentra desarrollada e incluye IS6110 fingerprint, espoligotyping y MIRUS-VNTR para genotipificación de al menos 200 cepas de M bovis. En un escenario realista se estima conveniente la genotipificación de 40 cepas al mes, con un total de 1400.

Los resultados de este trabajo está plasmado en una Tesis de Magister en Ciencias mención Microbiología.

#### **6. Implementación de una base de datos.**

Esta base de datos será clave dado que la información que se recabe será compleja y deberá ser analizada de manera integrada. Esta base será elaborada por el laboratorio de la UACH junto con el Laboratorio de referencia y epidemiólogo. Para esto se requerirá de un computador que incorpore el software bioinformático requerido para trabajar con espoligotipos. Este ordena y estructura los grupos de cepas en base a su similitud en el perfil de espoligotipos y entrega clusters con los cuales se elabora el mapa geográfico. La habilitación del laboratorio de referencia con este software permitirá trabajar en red esta información con la Universidad y laboratorios de asesores internacionales.

#### **7. Elaboración del mapa genético-geográfico e identificación de factores de riesgo. ( año 3 y 4)**

Si bien esta será la última etapa del proyecto, el mapa se estará elaborando desde la obtención de los primeros perfiles genéticos con el objeto de digitar todos los datos asociados a cada cepa y familiarizarse con el software para definir los clusters más adecuados según variables, antecedentes epidemiológicos y localidad geográfica.

#### **8. Transferencia de la tecnología.**

Desde el inicio del proyecto se trabajará en conjunto con el laboratorio de referencia, incorporando según avance los cursos de capacitación para que en el año 2 del proyecto se continúe la genotipificación en ambos laboratorios, lo que sin duda contribuirá a culminar el proyecto con un número mayor de cepas genotipificadas.

Se realizará un workshop internacional de tuberculosis con la participación de relatores internacionales.

Cabe hacer notar que para la obtención de 1400 cepas genotipificadas es necesario que el proyecto se extienda por 48 meses de manera que al término del año 3 se culmine con la genotipificación dejando para el año 4, semestre 1 el análisis integral de los datos y elaboración de mapa genético-geográfico.

Es oportuno destacar que este proyecto contará con la asesoría de los investigadores, experto en investigación en *M. bovis* y que han participado en las actividades de los proyectos Fondef – liderados por la Jefe del presente proyecto, Dra. Zárraga:

**Dr. Stephen Gordon**, experto en genómica micobacteriana, del grupo:

TB Research Group,  
VLA Weybridge,  
New Haw, Addlestone,  
Surrey KT15 3NB,



UK.

**Dr. German Rehren**

Laboratorio de Inmunología y Microbiología en Tuberculosis  
Cornell University  
USA

**Dra. Debbie Cousin**

Directora de Laboratorio de Referencia para Tuberculosis Bovina  
Australia