



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE PCR PARA
LA DETECCIÓN DE *Brucella canis***

**IMPLEMENTATION OF A NEW PCR PROTOCOL
FOR THE DETECTION OF *Brucella canis***

Victoria Cecilia Lorca Calderón

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE
2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE PCR PARA
LA DETECCIÓN DE *Brucella canis***

**IMPLEMENTATION OF A NEW PCR PROTOCOL
FOR THE DETECTION OF *Brucella canis***

Victoria Cecilia Lorca Calderón

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CORRECTOR	: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CORRECTOR	: EDUARDO KESSI CAMPOS

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Cecilia Calderón y padre, Vicente Lorca, por su amor y apoyo incondicional durante el transcurso de mi carrera y también durante toda etapa de mi vida.

A mis amigos de carrera, con los cuales compartí un sinfín de experiencias tanto profesionales como no, pero que sin duda han quedado plasmados en mi mente.

A mis amigos de vida, quienes supieron brindarme apoyo en todo momento de mi formación profesional, en especial Sebastián Silva (Ingeniero en Biotecnología), quién me asesoró en programas bioinformáticos.

A mi profesor guía, el Dr. Navarro, quién estuvo brindándome su apoyo y conocimientos en todo momento. Agradecer también por haber gestionado el contacto con el Dr. Cravero para la obtención de una muestra utilizada en el estudio. Por último agradecer su constante empatía y calidez en el desarrollo del mismo.

A la Dra. Borie por su constante apoyo profesional, brindándome en todo momento información pertinente y actualizada con respecto al tema tratado, y por haberme cedido gentilmente la mayoría de las muestras utilizadas en el presente estudio.

Al Dr. Kessi por su rapidez en corrección.

Al Dr. Silvio Cravero (Instituto de Biotecnología, INTA, Argentina), quién me brindó la muestra correspondiente a ADN de *B. suis*.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a Patricia Álvarez, secretaria del Departamento de Medicina Preventiva, por su incondicional simpatía, y por saber aclarar todo tipo de dudas administrativas.

RESUMEN

La Brucelosis canina (BC) es una enfermedad infectocontagiosa zoonótica causada principalmente por la bacteria *Brucella canis* (*B. canis*). Sin embargo, se han descrito infecciones esporádicas causadas tanto por *Brucella suis* (*B. suis*) y *Brucella abortus* (*B. abortus*) como también por *Brucella melitensis* (*B. melitensis*), las cuales producen en el animal un cuadro autolimitado. La infección se caracteriza por producir infertilidad tanto en machos como en hembras, afectando la vida reproductiva del animal, lo que conlleva importantes pérdidas económicas en criaderos de perros y pérdida afectiva para propietarios cuando el animal debe ser eutanasiado.

El diagnóstico suele realizarse mediante pruebas serológicas, las cuales presentan como principal desventaja la obtención de resultados falsos positivos por reactividad cruzada con otras bacterias, ya sea del mismo o distinto género, o bien resultados falsos negativos en casos crónicos de infección y por esta razón se requiere de la confirmación diagnóstica mediante el aislamiento bacteriano como método diagnóstico directo. Sin embargo, lo anterior conlleva tanto el riesgo de infección al personal de laboratorio que trabaja con esta bacteria debido a su carácter zoonótico y por otra parte involucra mayor tiempo debido a que este método requiere de un periodo prolongado de incubación.

En consideración a lo anterior, esta memoria de título tuvo por objeto desarrollar un PCR convencional capaz de diferenciar entre la detección de *B. canis*, *B. suis* y *B. abortus*, mediante el diseño *in silico* de un par de partidores que generaron un amplicón de mayor tamaño para la especie de interés en relación a las otras dos especies de *Brucella*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante los programas de libre acceso *Clustal W* y *BLAST* permitió establecer la identidad nucleotídica de los fragmentos obtenidos, corroborando así la detección diferencial entre *B. canis*, *B. suis* y *B. abortus*.

Así, este método constituye una prometedora alternativa al aislamiento bacteriano como método diagnóstico directo y complementario a pruebas serológicas.

Palabras clave: *Brucella canis*, PCR convencional, diseño *in silico* de partidores

ABSTRACT

The canine Brucellosis (CB) is a infectious, contagious and zoonotic disease caused by *Brucella canis* (*B. canis*). Nevertheless, there have been described sporadic infections caused also by *Brucella suis* (*B. suis*) and *Brucella abortus* (*B. abortus*) as also for *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) which produce in an autolimited illness. This infection is characterized for producing infertility in males and females, affecting the reproductive life of the animal, wich leads to important economic losses in breeding-kennels and affective loss for owners when the dog it carried to euthanasia.

The diagnosis is usually realized by means serological tests whose principal disadvantage is the production of false positive results due to crossed reactivity with other bacteria, of the same or different genus, or false negative results in chronic infection cases and for this reason the diagnostic confirmation by means bacterial isolation is necessary. Nevertheless, the previous carries out risk of infection to the laboratory personnel due to zoonotic character of these bacteria. Additionally, this procedure involves a long period of incubation.

In consideration to the previous antecedents, the objective of this work was to develop a conventional PCR capable of differentiating between the detection of *B. canis*, *B. suis* and *B. abortus*, using the *in silico* design of suitable primers, wich generated a major fragment for the interest specie in relation to the other two species of *Brucella* and sequencing validation. Furthermore, the nucleotide sequences analysis was realized by means of free access programs (Clustal W and BLAST).

This way, this method will constitutes a promising alternative to the bacterial isolation as diagnostic direct and complementary method to serological tests.

Key words: *Brucella canis*, conventional PCR, *in silico* design (primers)

INTRODUCCIÓN

La brucelosis canina (BC), enfermedad infectocontagiosa de curso crónico y de distribución mundial (Ardoino *et al.*, 2006), puede ser ocasionada por cuatro especies del género *Brucella*: *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*, de las cuales la primera es la especie de importancia epidemiológica en el perro, pues las tres especies restantes producen infecciones ocasionales en algunos casos individuales (Wanke, 2004), y un cuadro autolimitado en el animal (Carmichael, 1990; Carmichael y Greene, 1993).

La mayor parte de las infecciones no se diagnostican solo por los antecedentes o exámen físico de rutina (Carmichael y Greene, 1993) y por esta razón, se necesita disponer de antecedentes clínicos, serológicos y bacteriológicos, para poder así llegar al diagnóstico definitivo (Wanke, 2004).

Las manifestaciones clínicas son muy variables, siendo el tracto reproductivo el más afectado. En las hembras se describe el aborto tardío o casos de cachorros que mueren transcurridas unas pocas horas y hasta un mes ocurrido el nacimiento, o bien sobreviven a la infección y desarrollan la enfermedad más adelante. En los machos se observa epididimitis, prostatitis, y en casos crónicos, atrofia testicular. El daño testicular inicia una respuesta autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos anti-espermatozoides que contribuyen a la infertilidad (Wanke, 2004). Los signos no específicos, en ambos sexos, incluyen letargia, linfadenopatía generalizada, discospondilitis, meningoencefalitis y uveítis anterior recurrente (Carmichael y Greene, 1993; Shin y Carmichael, 1999).

La transmisión sexual es la principal vía de contagio entre perros adultos de distinto sexo, constituyendo un importante riesgo de infección al momento de la cruce, mientras que en cachorros, es fundamentalmente vía oronasal mediante contacto directo o indirecto con orina, semen, material abortado, secreciones vaginales y leche (Carmichael y Joubert, 1988). Además, la transmisión congénita o intrauterina adquiere un rol importante en la diseminación de la infección a cachorros (Carmichael y Greene, 1993).

Lo anterior cobra aun mayor importancia al considerar que no se dispone de vacunas (Shin y Carmichael, 1999), ni tratamiento antibiótico completamente eficaz (Wanke, 2004).

La BC produce importantes pérdidas económicas en criaderos de perros, pues los animales infectados no pueden ser utilizados para la cruce (Wanke, 2004). Así, la eutanasia sigue siendo la principal estrategia de control (Shin y Carmichael, 1999) y por esta razón se hace imprescindible disponer de un diagnóstico sensible, específico y rápido en obtención de resultados confiables.

Diagnóstico microbiológico y sus inconvenientes. El aislamiento bacteriano se realiza a partir de muestras de sangre, secreciones vaginales, semen, feto abortado, placenta, orina y biopsias. Considerando que la bacteremia aparece entre la 2ª y 4ª semana postinfección (PI), persistiendo durante seis meses aproximadamente, volviéndose intermitente por al menos un año en perros no tratados, es que el hemocultivo negativo no confirma la ausencia de infección (Wanke, 2004). No obstante, los animales infectados pueden alojar la bacteria en los tejidos durante varios meses luego de haber terminado la bacteremia, pudiendo aislarse el agente de estos mismos (Carmichael y Greene, 1993).

Por otra parte, el aislamiento e identificación bacteriana presenta como principal inconveniente la necesidad de un periodo prolongado de incubación, usualmente dos semanas, pudiendo tardar 21 días (Gyuranecz *et al.*, 2011). Es una prueba compleja, a realizar por personal calificado y no exenta de consideraciones subjetivas (Ej. morfología de la colonia), que requiere de un alto entrenamiento visual y experiencia. Adicionalmente, representa un peligro para el personal de laboratorio debido a su carácter zoonótico (Bricker, 2002).

Diagnóstico serológico y sus inconvenientes. Las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos frente a componentes de la pared celular (lipopolisacárido; LPS) o frente a antígenos proteicos citoplasmáticos son el método diagnóstico más usual para detectar brucelosis canina. Los métodos utilizados varían en sensibilidad, especificidad y complejidad (Wanke, 2004). Las pruebas que utilizan LPS como antígeno presentan reactividad cruzada con diversas especies bacterianas, produciendo falsos positivos (Carmichael y Greene, 1993), no así, al utilizar proteínas citoplasmáticas de *Brucella* en donde la especificidad aumenta en desmedro de la sensibilidad (Zoha y Carmichael, 1982; Carmichael *et al.* 1984), puesto que no existe reacción cruzada con otros géneros bacterianos, pero sí entre *Brucella* lisas y rugosas (Carmichael *et al.*, 1989). Los anticuerpos contra el LPS aparecen de forma más temprana y desaparecen poco después del cese de la bacteremia, mientras que los anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos tienden a persistir por más tiempo (desde seis meses hasta un año), permitiendo la detección de casos crónicos (Wanke, 2004).

Inicialmente se utilizó la prueba de aglutinación lenta en tubo (TAT), que presenta como desventajas: reacción cruzada con otras bacterias Gram (-), baja sensibilidad y falta de estandarización en su lectura. Posteriormente se usó la aglutinación rápida en placa (SAT) cuya ventaja es la rapidez, sencillez y sensibilidad respecto al TAT, sin embargo su baja

especificidad sugiere su uso solo como prueba tamiz debiendo comprobarse por otra prueba serológica a todo reaccionante positivo. Una modificación a ambas pruebas es la adición de 2-β-Mercaptoetanol (2β-ME), que les confiere mayor especificidad (Borie y Pinochet, 1987). En ambas pruebas, el suero debe estar libre de hemólisis, puesto que favorece reacciones falsas positivas por autoaglutinación (Flores-Castro *et al.*, 1977; Carmichael y Greene, 1993).

Borie y Pinochet (1987) mencionan otras pruebas serológicas con mejores resultados: inmunodifusión en gel agar (IDGA) y contraelectroforesis (CIEF). Lasserre (1984) calculó una sensibilidad y especificidad diagnóstica de la CIEF de 100% y 96,82% respectivamente en relación a la IDGA, utilizando lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de *B. ovis* como antígeno. Concluyó además que ambas pruebas eran igualmente efectivas en el diagnóstico de BC, presentando como principal ventaja la CIEF sobre la IDGA la reducción de tiempo en obtención de resultados. Adicionalmente, Meza (2011) al utilizar LPS-R de *B. abortus* CRB51 como antígeno para un ELISA indirecto (ELISA-I), obtuvo una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 97,53% y 97,33% respectivamente en relación a la CIEF (que utiliza LPS-R de *B. ovis*), y además determinó un alto porcentaje de concordancia entre ambas pruebas (98,08%), sugiriendo una aplicabilidad semejante. Si bien la sensibilidad y especificidad diagnóstica calculadas por Meza (2011) son elevadas, para un diagnóstico definitivo se sugiere la utilización conjunta de antecedentes clínicos, resultados serológicos y bacteriológicos (Wanke, 2004).

En definitiva, las pruebas serológicas presentan como principal inconveniente la obtención de resultados falsos negativos y positivos dependiendo de la fase de la infección y antígeno utilizado (Wanke, 2004). Además, ninguna prueba es capaz de detectar títulos de anticuerpos antes de los 18 días PI (Sotomayor, 2001), los cuales disminuyen en periodos abacterémicos (Carmichael y Greene, 1993).

Diagnóstico molecular y sus inconvenientes. Se han desarrollado métodos de amplificación del DNA, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que ha demostrado ser confirmatoria en el diagnóstico de brucelosis (Keid *et al.*, 2007 a, b, c). Si bien el aislamiento bacteriano es considerado el *gold standard* para el diagnóstico de brucelosis, la técnica PCR es una buena alternativa para superar algunos inconvenientes de los métodos bacteriológicos (Bricker, 2002), como el prolongado período de incubación y viabilidad del patógeno requeridos por el aislamiento, con la consiguiente amenaza al personal de laboratorio (Wallach *et al.*, 2004). Además el PCR posee altos valores de

sensibilidad y especificidad diagnóstica. Así, se ha determinado en muestras seminales una sensibilidad y especificidad del 86,6% y 100% respectivamente, dichos valores aumentaron más aún cuando la muestra correspondió a sangre, en donde ambas alcanzaron un 100% (Keid *et al.*, 2007 a).

Sin embargo, el desafío más importante al utilizar PCR para la identificación de las distintas especies de *Brucella*, es su alto porcentaje de identidad genómica, mayor al 94%, con una relación nucleotídica mucho más estrecha entre *B. canis* y *B. suis* (Olsen, *et al.*, 2010), siendo *B. melitensis* considerada como la única especie en términos genómicos (Verger *et al.*, 1985). No obstante este elevado porcentaje de identidad genómica, López-Goñi *et al.* (2008), desarrollaron un PCR múltiple, denominado *Bruce-ladder multiplex PCR*, capaz de identificar y diferenciar todas las especies y cepas vacunales del género *Brucella*. Así, *B. canis* es identificada y diferenciada del resto por defecto (ausencia de un amplicón de 794 pares de bases (pb)). Lamentablemente, en este protocolo de PCR algunas cepas de *B. canis* presentaban el amplicón de 794 pb, incurriendo en un diagnóstico diferencial erróneo entre *B. canis* y *B. suis*, lo cual fue corregido posteriormente al reemplazar el par de partidores dando origen a otro amplicón de 766 pb, capaz de distinguir inequívocamente *B. canis* de *B. suis* por ausencia del amplicón 766 pb (Sung- Il *et al.*, 2011).

A pesar que *B. suis* no se encuentra a nivel nacional (OIE, 2013) se estima conveniente e interesante incluir el DNA de dicha especie de *Brucella* en el presente estudio, pues representa el mayor desafío al momento de diferenciarla molecularmente de *B. canis* dada su mayor relación nucleotídica (Olsen, *et al.*, 2010).

Dadas las ventajas de la técnica de PCR en cuanto a sensibilidad, especificidad y rapidez en obtención de resultados, en esta Memoria de Título se contempló el diseño *in silico* de un nuevo par de partidores y su aplicación en un protocolo de PCR convencional que permitió la obtención de un amplicón de tamaño compatible solo con la presencia de *B. canis*, estableciendo un diagnóstico diferencial por efecto (a diferencia del método de Sung Il *et al.*, 2011) de dicha bacteria en relación a las otras especies de *Brucella* que podrían infectar ocasionalmente al perro. Lo anterior validado por la existencia de una zona genómica no conservada dentro del genoma de *B. canis* (ver anexo 1) considerando las secuencias nucleotídicas de las cepas de referencia publicadas en Genbank®: *B. canis* ATCC 23365 (NC_010103.1), *B. suis* 1330 (NC_017251.1), *B. abortus* S19 (NC_010742.1) y bv.1 str. 9-941 (NC_006932.1) y *B. melitensis* bv.1 str 16M (NC_003317) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se hizo en los laboratorios de Microbiología y Virología Veterinaria, pertenecientes al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (LMVFAVET).

Muestras. Para la implementación de esta técnica se utilizaron muestras de DNA de distinto origen y según disponibilidad de cepas bacterianas, del laboratorio respectivo: como control positivo se utilizó DNA de una cepa de *B. canis* aislada en LMFAVET desde un perro perteneciente al grupo “4A” (Asociación de Ayuda al Animal Abandonado) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET) mantenida a temperaturas de refrigeración y congelación. Como controles negativos se utilizaron DNA de *B. abortus*, *B. suis*, *Salmonella* Enteritidis y de *Escherichia coli*. Tanto el control positivo como los controles negativos, con excepción de *B. suis*, fueron cedidos por la Dra. Consuelo Borie (LMFAVET), en caldo de cultivo con una concentración superior o igual a 10^5 UFC/ ml, y muertas por tratamiento térmico. El control negativo, DNA de *B. suis*, fue cedido por el Dr. Silvio Cravero (Instituto de Biotecnología, INTA, Argentina). Como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas.

Detección molecular de *B. canis* mediante el desarrollo de un PCR convencional. El protocolo llevado a cabo, con excepción del ítem correspondiente al diseño de partidores, fue el que normalmente se lleva a cabo en el Laboratorio de Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de FAVET.

a) Diseño de partidores para *B. canis*: Se hizo mediante la utilización del software *Geneious* v 4.8, que utiliza como base de datos información oficial obtenida del Genbank®. A partir de la secuencia nucleotídica de *B. canis* ATCC 23365, de *B. suis* ATCC 1330, de *B. abortus* S19 y bv. 1 str. 9-941 y *B. melitensis* bv.1 str. 16M, se realizó un alineamiento nucleotídico, para así identificar una zona menos conservada dentro del genoma de *B. canis* en relación a las otras cepas restantes (ver anexo 1), una vez detectada esta misma se diseñó *in silico* un par de partidores (BC1 y BC2), cuyas secuencias son las siguientes:

BC1: 5'-ACGAACACAAGGGCCAATAC-3' y BC2: 5'-GGACGGCTACAAGATCGAAG-3'. Una vez diseñados los partidores, se enviaron a sintetizar a la empresa BIOSCAN.

b) Mezcla de la reacción (en triplicado): Para lograr la mezcla de amplificación del DNA, en un tubo de PCR (0,2 mL) se tomaron 15 μ L de un kit 2X PCR Master Mix Fermentas® (que incluye la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el amortiguador

de reacción y $MgCl_2$), 5 μL de cada uno de los partidores y 5 μL de la muestra de DNA, obteniendo un volumen total de 30 μL .

c) Amplificación del DNA: El protocolo para la amplificación consistió en una denaturación inicial a 94° C durante 1 minuto y luego 33 ciclos que constan de una denaturación a 94° C por 1 minuto, alineamiento a 55° C por 1 minuto y elongación a 72° C por 1 minuto. Finalmente una elongación a 72° C por 5 minutos.

d) Visualización del producto amplificado: Se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (Winkler ®) en amortiguador Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®). El producto del PCR se mezcló con 6 μL del producto comercial de carga 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas ®), que contiene glicerol para aumentar la densidad de la muestra, y azul de bromofenol para observar el frente de migración.

La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 40 minutos, utilizando Hyperladder TM IV (Bioline ®, 50-1000pb) como marcador de tamaño molecular. Finalizado el procedimiento el gel se incubó en bromuro de etidio (0,5 $\mu g/mL$) (Sigma®) durante 40 minutos y se fotografió sobre un transluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®).

Secuenciación y determinación de identidad nucleotídica del fragmento amplificado.

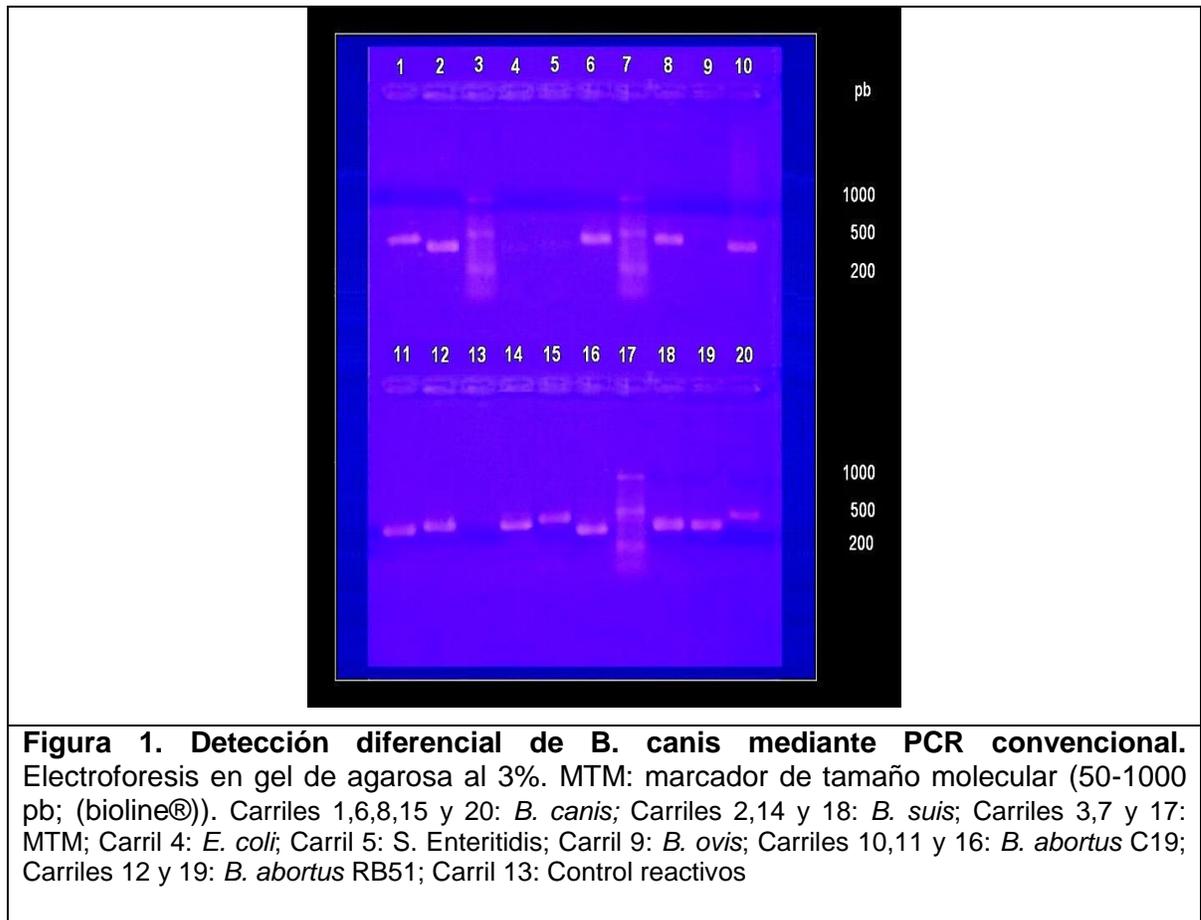
Los fragmentos de DNA obtenidos en el PCR fueron enviados en triplicado a la empresa Genytec para la determinación de su secuencia nucleotídica. Las secuencias obtenidas fueron alineadas usando el programa *Clustal W2* inicialmente para obtener una secuencia consenso y posteriormente se ingresó esta última al programa *BLAST* (Basic local Alignment search Tool) con la finalidad de determinar el porcentaje de identidad nucleotídica (PIN) del fragmento amplificado.

Medidas de bioseguridad. Se consideró el acceso limitado a las instalaciones, contar con un área exclusiva de trabajo para la realización del PCR, uso de mechero Bunsen para delimitar una zona de trabajo biolimpia, todo esto con objeto de evitar una posible contaminación con material genético ajeno al DNA de interés. Además se debió usar delantal limpio y guantes de látex desechables. Para la visualización del producto fue necesario el uso de guantes de látex desechables, ya que se utilizó bromuro de etidio el cual posee propiedades mutagénicas. Al momento de utilizar el transluminador se requirió contar con gafas con filtro UV y una placa de acrílico situada entre el equipo y el operador. Finalmente, el gel fue incinerado en FAVET junto con los guantes que se utilizaron para su manipulación.

RESULTADOS

Detección de *B. canis* mediante PCR convencional.

Al realizar la técnica de PCR convencional con los controles positivos y negativos ya mencionados, los partidores descritos y el protocolo especificado, en la electroforesis se obtuvo un amplicón de mayor tamaño para el caso de DNA de *B. canis*, en relación a *B. suis* y *B. abortus*. La figura 1 resume los resultados obtenidos en la implementación de este protocolo de PCR convencional.



Análisis del fragmento de DNA secuenciado.

La muestra de *B. canis* positiva al PCR implementado se envió en triplicado a la empresa Genytec y se recibieron tres secuencias de alrededor de 430 pb (Figura 2). El uso del programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* permitió obtener una secuencia representativa (Figura 3). Finalmente, la identidad del fragmento de ADN secuenciado correspondió a *B. Canis* con un PIN de 97% (Figura 4).

Figura 2. Resultado de la secuenciación de la muestra amplificada.

```

>B.canis1
CGAACACAAGGGCCAATACGCCCAATATGCGTATCGCCAATCGGGTCCGTAATTGTCGGGCGCCCACTTT
CAACGTGCCGCATCTCCATTACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCCGTCTTTGCCAAGGGACAAAT
AGTCCGGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAGTAAGGCAATAGGGCCATAAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGC
GGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTTTTGGTTGCGCAAGGCCGAGCGACCATATTCTTCACTGCCCTA
CTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCC
TACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTAAACATACCTCCCCGCGCGCCTGAGCACTTCGATCTT
GTAGCC

>B.canis2
AGAACACAAGGGCCAATACTCCCAATATGGGTATCGCCAATCGGGTCCGTAATCTTCGGGCGCCAGTTT
CAACGTGGCGCATCTCCATCCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCCGTCTTTGGCAAGGGACAAAT
AGTCCGGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAGTAAGGCAATAGGGCCATAAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGC
GGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTTTTGGTTGGGCATGGCCGAGCGACCATATCTTCACTGGCCTA
CTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCC
TACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTAAACATACCTCCCCGCGCGCCGGAGCTCTTCGATCTT
GTAGCCGT

>B.canis3
CGAACACAAGGGCCAATACTCCCAATATGCGTATCGCCAATCGGGTCCGTAATTTTCGGGCGCCCACTTT
CAACGTGCCGCATCTCCATTACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCCGTCTTTGCCAAGGGACAAAT
AGTCCGGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAGTAAGGCAATAGGGCCATAAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGC
GGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTTTTGGTTGCGCAAGGCCGAGCGACCATATTCTTCACTGCCCTA
CTGGCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCC
TACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTAATCATACCTCCCCGCGCGCCTGAGCTCTTCGATCTT
GTAGCC
    
```

Figura 3. Resultado del alineamiento de secuencias.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

B.canis1      CGAACACAAGGGCCAATACGCCCAATATGCGTATCGCCAATCGGGTCCGTAATTGTCGGG  60
B.canis3      CGAACACAAGGGCCAATACTCCCAATATGCGTATCGCCAATCGGGTCCGTAATTTTCGGG  60
B.canis2      AGAACACAAGGGCCAATACTCCCAATATGGGTATCGCCAATCGGGTCCGTAATCTTCGGG  60
                *****

B.canis1      CGCCCACTTTCAACGTGCCGCATCTCCATTACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCC  120
B.canis3      CGCCCACTTTCAACGTGCCGCATCTCCATTACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCC  120
B.canis2      CGCCCACTTTCAACGTGCCGCATCTCCATCCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCC  120
                *****

B.canis1      GTCTTTGCCAAGGGACAAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAGTAAGGCAATAG  180
B.canis3      GTCTTTGCCAAGGGACAAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAGTAAGGCAATAG  180
B.canis2      GTCTTTGCCAAGGGACAAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATCAAGGCAGTAAGGCAATAG  180
                *****

B.canis1      GGCCATAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGCGGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTTTTTG  240
B.canis3      GGCCATAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGCGGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTTTTTG  240
B.canis2      GGCAATAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGGGGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTTTTTG  240
                *** *****

B.canis1      GTTGGCGAAGGCCGAGCGACCATATCTTCACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGC  300
B.canis3      GTTGGCGAAGGCCGAGCGACCATATCTTCACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGC  300
B.canis2      GTTGGGCATGGCCGAGCGACCATATCTTCACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGG  300
                **** *

B.canis1      CCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTA  360
B.canis3      CCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTA  360
B.canis2      CCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTACTGGCCTA  360
                *****
    
```

```

B.canis1      CTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTAAACATACCTCCCCGCGCGCCTGAGCACTTCGATCTT 420
B.canis3      CTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTAAATCATACTCCCCGCGCGCCTGAGCTCTTCGATCTT 420
B.canis2      CTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTAAACATACCTCCCCGCGCGCGGAGCTCTTCGATCTT 420
                ***  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****  *****

B.canis1      GTAGCC-- 426
B.canis3      GTAGCC-- 426
B.canis2      GTAGCCGT 428
                *****

Secuencia Representativa:
>BCVL
CGAACACAAGGGCCAATACTCCCAATATGCGTATCGCAATCGGGTCCGTAATTGTCGGGCGCCACTTTCAACGTGCCGC
ATCTCCATTCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCCGTCTTTGCCAAGGGACAAATAGTCCGGGGGAGGAGCGAATT
AAGGCAGTAAGGCAATAGGGCCATAAGGCAGTATGTTAAGGGAATAGCGGAATAAGGGAGTAGGGGAGTATGTATTTGGTT
GCGCAAGGCCGCGAGCGACCATATCTTCACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGC
CCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTACTGCCCTAAACATACCTCCCCGCGCGCCT
GAGCTCTTCGATCTTGTAGCC

```

Figura 4. Determinación de la identidad nucleotídica del fragmento secuenciado (PIN= 97%).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brucella canis HSK A52141 chromosome 1, complete sequence	715	715	100%	0.0	97%	CP003174.1
<input type="checkbox"/>	Brucella canis ATCC 23365 chromosome I, complete sequence	715	715	100%	0.0	97%	CP000872.1
<input type="checkbox"/>	Brucella suis bv. 1 str. S2 chromosome I, complete sequence	658	658	100%	0.0	95%	CP006961.1
<input type="checkbox"/>	Brucella microti CCM 4915 chromosome 1, complete sequence	643	643	90%	0.0	97%	CP001578.1
<input type="checkbox"/>	Brucella suis ATCC 23445 chromosome I, complete sequence	590	590	82%	5e-165	97%	CP000911.1
<input type="checkbox"/>	Brucella canis str. Oliveri chromosome I, genome	580	580	80%	3e-162	97%	HG803175.1
<input type="checkbox"/>	Brucella melitensis M28 chromosome 1, complete sequence	569	569	80%	6e-159	97%	CP002459.1
<input type="checkbox"/>	Brucella melitensis NI chromosome I, complete sequence	555	555	78%	2e-154	96%	CP002931.1
<input type="checkbox"/>	Brucella melitensis M5-90 chromosome I, complete sequence	555	555	78%	2e-154	96%	CP001851.1
<input type="checkbox"/>	Brucella ceti TE28753-12 chromosome 1, complete sequence	545	545	76%	1e-151	97%	CP006898.1
<input type="checkbox"/>	Brucella ceti TE10759-12 chromosome 1, complete sequence	545	545	76%	1e-151	97%	CP006896.1
<input type="checkbox"/>	Brucella suis 1330 chromosome I, complete sequence	545	545	76%	1e-151	97%	AE014291.4
<input type="checkbox"/>	Brucella melitensis bv. 1 str. 16M chromosome I, complete sequence	540	540	76%	5e-150	96%	AE008917.1
<input type="checkbox"/>	Brucella suis VBI22 chromosome I, complete sequence	531	531	75%	3e-147	97%	CP003128.1
<input type="checkbox"/>	Brucella suis 1330 chromosome I, complete sequence	531	531	75%	3e-147	97%	CP002997.1

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta Memoria de Título permiten demostrar que la estrecha relación nucleotídica existente entre bacterias del género *Brucella*, mayor aún entre *B. canis* y *B. suis* (Olsen, *et al.*, 2010), no constituiría un obstáculo para establecer un diagnóstico molecular diferencial, al considerar un enfoque experimental distinto: determinar la existencia de una zona no conservada dentro del genoma de *B. canis* (Anexo 1) y luego el diseño *in silico* de partidores apropiados para la implementación de un protocolo convencional de PCR.

Actualmente, la utilización de la técnica de PCR en la detección de bacterias del género *Brucella* no implica novedad alguna, pues en la literatura se ha reportado que el uso de PCR ha sido exitoso en la confirmación diagnóstica de *B. canis* (Keid *et al.*, 2007 a, b, c), demostrando ser un método sensible, específico y rápido en obtención de resultados (Keid *et al.*, 2007 a), no obstante, nuestros resultados son novedosos al considerar una detección molecular diferencial de estos patógenos.

En este contexto, si bien la idea mencionada que considera la elevada homología genómica que presenta el género bacteriano ya había sido desarrollada en estudios recientes y se logró establecer un diagnóstico diferencial de todas las especies de *Brucella* existentes hasta la fecha, mediante el uso de un PCR en su versión múltiple (Sung-Il *et al.*, 2011), *B. canis* era diagnosticada por defecto, es decir por ausencia de un determinado amplicón.

En cambio, mediante la metodología descrita en nuestro estudio, el diagnóstico de *B. canis* es por efecto, es decir, por la presencia diferencial de un amplicón determinado, confirmado por secuenciación nucleotídica y por una identidad genómica de alrededor de 97% respecto de datos oficiales del Genbank (Anexo 1).

Estos resultados permiten sugerir la pronta implementación de este PCR como alternativa al aislamiento bacteriano y por ende ser confirmatorio a pruebas serológicas, lo cual sería de suma utilidad en momentos previos a la cruce, evitando establecer diagnósticos erróneos de animales que pudiesen encontrarse, por ejemplo, infectados por *B. abortus* o *B. suis* y no por *B. canis*, con la consiguiente pérdida reproductiva del ejemplar.

A lo anterior, se debe agregar que esta metodología no constituiría un riesgo al personal de laboratorio, dado que se trabaja con DNA y no el agente viable. Sin embargo cabe suponer que en casos crónicos de infección disminuya la sensibilidad de la prueba dada la intermitencia de la bacteremia. Es por esta misma razón que para lograr un diagnóstico

definitivo se deben tomar conjuntamente antecedentes clínicos concordantes con la infección, resultados serológicos y confirmación de estos mediante PCR.

Otra razón por la cual se debe considerar este método como alternativo y complementario, es que actualmente en el diagnóstico de *Brucella* lo más utilizado corresponde a pruebas serológicas y a que éstas presentan como principal inconveniente tanto la obtención de falsos positivos producto de la reactividad cruzada con especies bacterianas de distinto o igual género (Carmichael *et al.*, 1989; Carmichael y Greene, 1993) como la obtención de falsos negativos en casos crónicos de infección, dada la intermitencia de la bacteremia, necesitando de su confirmación mediante el aislamiento bacteriano (Wanke, 2004).

En términos de la implementación de la técnica, tanto el diseño de partidores *in silico* como la verificación de identidad nucleotídica mediante herramientas bioinformáticas ha demostrado una vez más su utilidad en la implementación un PCR convencional para la detección de agentes patógenos de interés veterinario en nuestro laboratorio (Vargas, 2013, Tamayo, 2014) y en este caso capaz -por vez primera- de diferenciar por efecto (obtención de un amplicón de determinado tamaño) *B. canis* de *B. suis* y *B. abortus*, estas dos últimas especies si bien no poseen una mayor implicancia en el canino, podrían llevar a un diagnóstico erróneo del animal con el consiguiente cese de su actividad reproductiva y/o eutanasia del ejemplar.

Finalmente, lo recomendable para implementar esta técnica en la práctica sería utilizar el gel de agarosa al 4%, con objeto de hacer más notoria la diferencia existente entre las bandas, sumado a esto incorporar un control positivo (DNA de *B. canis*) y un control negativo (DNA de *B. abortus*) para analizarlos conjuntamente con la muestra sospechosa.

CONCLUSIONES

La identificación de una zona genómica no conservada dentro del genoma de *B. canis*, permitió el diseño *in silico* de un par de partidores específicos, que permitieron la obtención de amplicones de tamaño distintos lográndose establecer un diagnóstico diferencial entre bacterias del género *Brucella*, corroborado por un PIN de 97%. Lo anterior, podría constituir un valioso aporte al diagnóstico de Brucelosis canina, como método alternativo al aislamiento bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

- ARDOINO, S.; BARUTA, D.; TOSO, R.** 2006. Brucelosis canina. *Cienc. Vet.* 8 (1): 49-60.
- BORIE, C.; PINOCHET, L.** 1987. Brucelosis canina: Conceptos generales y estudios realizados en el país. *Mon. Med. Vet.* 9 (2): 70-78.
- BLAST.** Basic local Alignment Search Tool. 2014. [en línea]. <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> [consulta: 15-01-2014].
- BRICKER, B.** 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90: 435-446.
- CARMICHAEL, L.; ZOHA, S.; FLORES-CASTRO, R.** 1984. Problems in the Serodiagnosis of Canine Brucellosis : Dog Response to Cell Wall and Internal Antigen of *Brucella canis*. In : Valette L. Hennessen W (eds) *Developments in Biol Stand.* 56 : 371-383.
- CARMICHAEL, L.; JOUBERT, J.** 1988. Transmision of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet.* 78: 63-73.
- CARMICHAEL, L.; JOUBERT, J.; JONES, L.** 1989. Caracterizacion of *Brucella canis* proteins antigens and polypeptide antibody response of infected dogs. *Vet. Microbiol.* 19: 373-387.
- CARMICHAEL, L.** 1990. *Brucella canis*. In: *Animal Brucellosis.* Nielsen K.H. and Duncan J.R. Ed. CRC Press Boca Raton. Florida, USA, pp. 336-350.
- CARMICHAEL, L.; GREENE, C.** 1993. Brucelosis canina. In: *Enfermedades Infecciosas de Perros y Gatos.* Interamericana McGraw-Hill. México, D.F. pp: 604-616.
- CLUSTAL W.** Multiple Sequence Alignment. 2014. [en línea]. <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> [consulta: 15-02-2014].
- FLORES-CASTRO, R.; SUÁREZ, F.; RAMÍREZ-PFEIFFER, C.; CARMICHAEL, L.** 1977. Canine brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in México city. *J. Clin. Microbiol.* 6: 591-597.
- GYURANECZ, M.; SZEREDI, L.; RÓNAI, Z.; DÉNES, B.; DENCSE, L.; DÁN, Á.; PÁLMAI, N.; HAUSER, Z.; LAMI, E.; MAKRAI, L.; ERDÉLYI, K.; JÁNOSI, S.** 2011. Detection of *Brucella canis*- Induced Reproductive Diseases in a Kennel. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23: 143-147.
- KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; CHIEBAO, D.; MEGID, J.; SALGADO, V.; RICHTZENHAIN, L.** 2007a. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology* 67: 1203-1210.
- KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; CHIEBAO, D.; SALGADO, V.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L.** 2007b. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology* 68: 1260-1270.

KEID, L.; SOARES, R.; VIEIRA, N.; MEGID, J.; SALGADO, V.; VASCONCELLOS, S.; DA COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. 2007c. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. *Vet. Res. Commun.* 31: 951-965.

LASSERRE, M. 1984. Brucelosis canina: diagnostico comparativo entre doble difusión en agar y contrainmunolectroforesis. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias. U. Chile. 40 p.

LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.; MIGUEL, M.; MUÑOZ, P.; BLASCO, J.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; GARIN-BASTUJI, B. 2008. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *J. Clin. Microb.* 46 (10): 3484-3487.

MEZA, M. 2011. Desarrollo de un ELISA indirecto con antígeno LPS-R de *Brucella abortus* Cepa RB51, para el diagnóstico serológico de brucelosis canina. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias. U. Chile.. U. Chile. 19 p.

OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2013. Base de Datos del sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHID). [en línea]. <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation> [consulta: 15-11-2013].

OLSEN, S.; BELLAIRE, B.; ROOP II, R.; THOEN, C. 2010. *Brucella*. **In:** Gyles, C.; Prescott, J.; Songer, G.; Thoen, C. (Eds.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4ª Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp. 429-441

SHIN, S.; CARMICHAEL, L. 1999. Brucelosis canina causada por *Brucella canis*. **In:** Carmichael, L. (Ed), Recent advances in canine infectious diseases. Ithaca: International Veterinary Informatio Servis (www.ivis.org), Document No A0101.1199

SOTOMAYOR, M. 2001. Diagnóstico de Brucelosis Canina: Utilización de un Antígeno Proteico Citosólico de *Brucella abortus* Cepa RB51 en Perros Inyectados Experimentalmente. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias. U. Chile.. U. Chile. 50 p.

KANG, SI.; HER, M.; KIM, JW.; KIM, JY.; KO, KY.; HA, YM.; JUNG, SC. 2011. Advanced Multiplex PCR Assay for Differentiation of *Brucella* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (18): 6726-6728.

TAMAYO, N. 2014. Detección de *Bordetella bronchiseptica* mediante la Reaccion en Cadena de la Polimerasa. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias. U. Chile.. U. Chile (en prensa)

VARGAS, M. 2013. Detección del gen de la glicoproteína C del virus herpes canino. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias. U. Chile. 30 pp.

VERGER, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.; GRAYON, M. 1985. *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35 (3): 292-295.

WALLACH, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.; BALDI, P.; FOSSATI, C. 2004. Human infection with M- strain of *Brucella canis*. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 146-148.

WANKE, M. 2004. Canine brucellosis (Review). *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 195-207.

ZOHA, S.; CARMICHAEL, L. 1982. Serological response of dog to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 7: 35-50.

Anexo N 1. Alineamiento nucleotídico según *Clustal W*.

BC	:	<i>B.canis</i>	ATCC	23365	BS	:	<i>B.suis</i>	1330
BA1	:	<i>B.abortus</i>	s19		BA2	:	<i>B.abortus</i>	bv.1_str
BM	:	<i>B.melitensis</i>	bv.1					
		str.16M						
BC		CGATGAGATAGCTGTCCGGTGCCGTGAGGTCGATGGGCT---	TGTGCGCA	62449				
BS		CGATGAGATAGCTGTCCGGTGCCGTGAGGTCGATGGGCT---	TGTGCGCA	62531				
BA1		CGATGAGATAGCTGTCCGGTGCCGTGAGGTCGATGGGCT---	TGTGCGCA	62337				
BA2		CGATGAGATAGCTGTCCGGTGCCGTGAGGTCGATGGGCT---	TGTGCGCA	62207				
BM		TAATAAAA--ATTTTCCAATAC-GTATGGC---	TGGGCCGAATCTACCTA	62049				
		* * *	* * * *					
BC		AAACCGACGAACACAAGGGCCAATACG-CTCAATATGCG--	TATCGCC--	62494				
BS		AAACCGACGAACACGAGGGCCAATACG-CTCAATATGCG--	TATCGCC--	62576				
BA1		AAACCGACGAACACGAGGGCCAATACG-CTCAATATGCG--	TATCGCC--	62382				
BA2		AAACCGACGAACACGAGGGCCAATACG-CTCAATATGCG--	TATCGCC--	62252				
BM		----CGGTAAAATAGTGGATTATACGGCAGAATTTGAAGTTAGT	GCGGA	62095				
		* * *	* * *					
BC		--AATCGGGTCCGTAATTGTTCGGGCGCTCAGTTTCAACGTGCTG	CATCTC	62542				
BS		--AATCGGGTCCGTAATTGTTCGGGCGCTCAGTTTCAACGTGCTG	CATCTC	62624				
BA1		--AATCGGGTCCGTAATTGTTCGGGCGCTCAGTTTCAACGTGCTG	CATCTC	62430				
BA2		--AATCGGGTCCGTAATTGTTCGGGCGCTCAGTTTCAACGTGCTG	CATCTC	62300				
BM		GAAACCGGGTACATA----TAAAGT-TTCATTTTTTCCAAG-TAAGT	CTG	62139				
		* * *	* * * *					
BC		CATTCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCTGTCTTTGCCAAGG	GAC	62592				
BS		CATTCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCTGTCTTTGCCAAGG	GAC	62674				
BA1		CAATCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCTGTCTTTGCCAAGG	GAC	62480				
BA2		CAATCACGCAGACTTTATCTAGTCCATGATGGCTGTCTTTGCCAAGG	GAC	62350				
BM		CATT-----GGCTTACTTTAGT-----AAAGACATACTTTTTAAAG---		62175				
		* * *	* * * *					
BC		AAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAG-TAAGGCA-----	A	62633				
BS		AAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAG-TAAGGCA-----	A	62715				
BA1		AAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAG-TAAGGCAGTAAGG	CAA	62529				
BA2		AAATAGTCCGGGGGGAGGAGCGAATTAAGGCAG-TAAGGCAGTAAGG	CAA	62399				
BM		-AATTATCTTGAGGTATGA-----TATGTCAGATAACCTAG-----	A	62211				
		* * *	* * * *					
BC		TAGGGCAATAAGGCAGTATGTTAAGGG--AATAGGGGAATAAG---	GGA	62677				
BS		TAGGGCAATAAGGCAGTATGTTAAGGG--AATAGGGGAATAAG---	GGA	62759				
BA1		TAGGGCAATAAGGCAGTATGTTAAGGG--AATAGGGGAATAAG---	GGA	62573				
BA2		TAGGGCAATAAGGCAGTATGTTAAGGG--AATAGGGGAATAAG---	GGA	62443				
BM		TAG--TAATA--GTATTATCCTAAAAGTTGATGCATCAATAAGTCTA	GAG	62257				
		* * *	* * * *					

