



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA bla_{TEM} EN
BACTERIAS DESCRITAS COMO NOSOCOMIALES**

**DETECTION OF bla_{TEM} RESISTANCE GENE IN
BACTERIA DESCRIBED AS NOSOCOMIAL**

DIEGO ALBERTO YAÑEZ MUÑOZ

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

PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS

FINANCIAMIENTO
Programa AUCAI
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA bla_{TEM} EN BACTERIAS DESCRITAS COMO NOSOCOMIALES

DETECTION OF bla_{TEM} RESISTANCE GENE IN BACTERIA DESCRIBED AS NOSOCOMIAL

DIEGO ALBERTO YAÑEZ MUÑOZ

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO
PROFESOR CONSEJERO: M.ANTONIETA JARA
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS

SANTIAGO, CHILE
2011

RESUMEN.

Durante el año 1928 Alexander Fleming descubre la penicilina, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, poco tiempo después se descubren bacterias capaces de resistir a la penicilina y a los nuevos antimicrobianos. Esto último, hasta hoy suscita gran preocupación entre la comunidad científica, especialmente en el ámbito de la Salud Pública, pues el uso indiscriminado de antimicrobianos, subdosificación, errores en el ritmo horario y el consumo de pequeñas cantidades de antimicrobianos desde alimentos producidos por animales de abasto, son algunos de los factores que influyen la aparición de cepas resistentes, debido al aumento en la presión de selección sobre estas poblaciones bacterianas.

Esta capacidad de resistencia a la acción de un antimicrobiano está determinada por genes presentes en el genoma bacteriano, los cuales pueden ser constitutivos o hábilmente incorporados mediante diferentes mecanismos.

Así, en esta Memoria de Título se detectó -mediante PCR convencional- y secuenció un fragmento del gen de resistencia a β -lactámicos denominado bla_{TEM}, en tres cepas bacterianas resistentes, encontrándose altos valores de identidad nucleotídica con las secuencias de la base de datos de GenBank®, lo cual permitió obtener 3 controles positivos nativos de origen veterinario para futuras investigaciones.

Palabras clave: infección nosocomial, resistencia antimicrobiana, gen bla_{TEM}

ABSTRACT

During the year 1928 Alexander Fleming discovers the penicillin, substance capable to avoid bacterial growth. Nevertheless, a little time later, bacteria capable to resist penicillin and new antimicrobials were discovered. The above mentioned, still provokes great concern in the scientific community, especially in the area of the Public Health, because the indiscriminate use of antimicrobial, subdosing, mistakes in the administration frequency and the consumption of small amounts of antimicrobials from food produced by supply animals, are some of the factors that have influenced the appearance of resistant strains, due to the increase in selection pressure on these bacterial populations.

The bacterial aptitude to resist the action of antimicrobials is determined by genes present in the genome of the pathogen, which can be constitutive or skillfully incorporated by means of different mechanisms.

Considering the described precedents, in this work, by conventional PCR a fragment of the bla_{TEM} gene was detected in three resistant bacteria strains and sequenced, and it was high values of nucleotide identity respect to sequences of GenBank's database, which allowed to obtain 3 veterinary positive native controls for further investigations.

Keywords: nosocomial infection, antimicrobial resistance, bla_{TEM} gene

1. INTRODUCCION

1.1. LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES

Las infecciones nosocomiales corresponden a aquellas infecciones que son adquiridas dentro de un recinto hospitalario y cuya manifestación, dependiendo del periodo de incubación de la infección, puede presentarse 48-72 horas después, o incluso una vez dado de alta el paciente (13). La gravedad de la infección depende de cuán comprometido esté el paciente y de la capacidad de resistencia a antimicrobianos que presente la bacteria causante.

Las infecciones nosocomiales son un riesgo inherente a la hospitalización y no pueden ser prevenidas del todo (18, 9), presentándose con mayor frecuencia en las unidades de cuidado intensivo. Esto ocurre por varias razones: 1) la duración de la estadía es habitualmente mayor que en otros sectores de los hospitales; 2) procesos médicos invasivos como la introducción de catéteres urinarios, permiten la entrada de organismos oportunistas; 3) los pacientes presentan inmunocompromiso o fuerte estrés debido a la enfermedad que presentan o al tratamiento que se les entrega y 4) el uso desmedido de antimicrobianos permite la constante selección de bacterias resistentes. (15).

1.2. IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA.

El real impacto de las infecciones nosocomiales en hospitales veterinarios no es del todo conocido, ya que la información existente, si bien, ha ido en constante aumento, sigue muy restringida a un pequeño número de brotes y casos observados en hospitales de referencia (18). La incidencia de infecciones nosocomiales es menor a la observada en hospitales humanos debido a que los pacientes permanecen menos tiempo en la Unidad de Cuidados Intensivos en relación al ser humano, existe menor prevalencia de enfermedades inmunosupresivas y existe un déficit de infraestructura que permita una mayor permanencia de los pacientes. (9).

Los principales problemas asociados a infecciones nosocomiales en perros y gatos son la transmisión de bacterias multirresistentes de paciente a paciente por manos de los trabajadores del hospital, transmisión de enfermedades infecciosas de paciente a paciente y de zoonosis que pudieran afectar a los trabajadores e incluso a los dueños de los pacientes. (9).

1.3.- AGENTES BACTERIANOS NOSOCOMIALES:

Las bacterias multirresistentes comúnmente aisladas en dependencias de hospitales veterinarios de animales pequeños incluyen *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., además de varias especies de *Staphylococcus* y *Clostridium* spp. En Europa, *Acinetobacter baumannii* fue identificada como resistente y causante de infecciones nosocomiales tanto en dependencias dedicadas al cuidado de animales pequeños como en unidades para equinos en un hospital de enseñanza veterinaria (9).

Tres de estas bacterias han generado cada vez mayor preocupación ya que han aparecido Enterococos resistentes a Vancomicina (VRE), *E. coli* multirresistente y *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA). Esta última ha sido un problema durante muchos años para la medicina humana, pero hoy genera gran preocupación en la comunidad médico veterinaria, mientras *E. coli* multirresistente y MRSA han sido asociados con infecciones nosocomiales en hospitales de animales pequeños y mayores, VRE ha sido escasamente descrito como agente infeccioso nosocomial en animales pequeños (15)

Se presenta una tabla con bacterias nosocomiales y los signos clínicos que producen en el Anexo 1, Cuadro 1.

1.4. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Se entiende por resistencia antimicrobiana, al mecanismo mediante el cual una bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (7). Cuando las concentraciones que el antimicrobiano puede alcanzar en el organismo no superan la concentración mínima inhibitoria sustancialmente y durante tiempos prolongados, aunque vinculados al tipo de agente de que se trate, la bacteria tiene todas las posibilidades para sobrevivir y se define como resistente. En cambio, cuando ocurre lo opuesto, la bacteria es definida como susceptible (6).

Esta resistencia puede ser una característica propia de un organismo (intrínseca) o adquirida por mutación o incorporación de material genético en forma de plásmidos (ADN extracromosomal) o transposones (cromosomal o integrado a plásmidos). Los mecanismos más frecuentes de intercambio de genes entre bacterias son conjugación, transducción y transformación. Variaciones de estos procesos han sido desarrolladas mediante ingeniería genética; ejemplo de esto es la electrotransformación (4, 2).

Según sea el antibiótico y la especie bacteriana, estos mecanismos de resistencia se dividen en cuatro tipos : a) inactivación enzimática del antibiótico, b) modificación del sitio

blanco; c) modificación en la permeabilidad de la membrana bacteriana debido a la sustitución de las proteínas de membrana externa (porinas) al modificar su calibre interno; y d) expulsión del antibiótico debido a la sobreproducción de bombas de eflujo que impide el acceso del antibiótico al sitio blanco en la bacteria. El primer mecanismo descrito es uno de los procesos bioquímicos más comunes que otorgan resistencia (4, 8).

1.5. LOS β -LACTÁMICOS

Bajo esta denominación se agrupa un número continuamente creciente de antimicrobianos, cuyo origen se remonta a 1928, cuando Alexander Fleming descubrió una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Los β -lactámicos forman el grupo de antimicrobianos más usados actualmente en la práctica clínica y engloba a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e inhibidores de la beta-lactamasa entre otros (11). Estructuralmente tienen en común el anillo β -lactámico, asociado a un anillo tiazolidínico, formando el ácido 6-aminopenicilánico responsable de la actividad biológica. A él se le asocia una cadena lateral que otorga las características antimicrobianas y farmacocinéticas a los diferentes derivados antimicrobianos (11). Estas modificaciones químicas, permiten disminuir la capacidad de resistencia a antimicrobianos.

Los β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana, actuando en la etapa final de la formación de peptidoglicano, llamada transpeptidación. Este grupo de antimicrobianos presenta analogía con un aminoácido precursor de la cadena de peptidoglicano, la D-alanil-D-alanina, por lo tanto son capaces de competir por el sitio activo de una enzima llamada "Proteína Ligadora de Penicilina" (PLP), la cual participa en el entrecruzamiento del peptidoglicano. De esta forma los β -lactámicos se unen covalentemente al sitio activo de las PLP, lo que produce la inactivación irreversible de la enzima, deteniendo la formación de peptidoglicano y produciendo la lisis osmótica de la célula bacteriana (11).

La introducción de un grupo dimetoxifenil a la cadena lateral de las penicilinas dio origen a la meticilina, que es resistente a la inactivación enzimática producida por las beta-lactamasas de *Staphylococcus aureus*. Al agregar un grupo amino a la cadena lateral de las Bencilpenicilinas, se crearon las Aminopenicilinas, a razón de ampliar el espectro de acción de las penicilinas. La Ampicilina, perteneciente a éste grupo, es efectiva en contra de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae* (11).

1.6. RESISTENCIA BACTERIANA A β -LACTÁMICOS:

El mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos es la producción de β -lactamasas, que corresponden a enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico, con lo cual se convierten en compuestos biológicamente inactivos. Estas enzimas son producidas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (11) y en la actualidad se conocen cientos de β -lactamasas, existiendo cuatro tipos de ellas:

- 1) clase A, representada por β -lactamasas de tipo TEM
- 2) clase B, que corresponden a metaloenzimas poco frecuentes
- 3) clase C, representadas por cefalosporinasas de enterobacterias
- 4) clase D, representadas por las cloxacilinasas.

Las β -lactamasas más importantes son codificadas por el gen bla_{TEM} . El término TEM fue acuñado gracias a Temoniera, paciente desde donde fue aislada la primera bacteria con características de resistencia a β -lactámicos (11).

1.7. TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR

El estudio y seguimiento de estos genes de resistencia a antimicrobianos ha sido logrado gracias a la implementación de técnicas de genética molecular, que permiten detectar zonas de interés en el genoma de un microorganismo.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es uno de estos métodos moleculares, el cual consiste en la síntesis in vitro de una secuencia blanco de ADN de manera repetitiva, gracias al uso de partidores o *primers* (secuencia de oligonucleótidos altamente específica) que reconocen pequeñas secuencias que flanquean el segmento del genoma a amplificar. Esto se logró mediante el uso de la *Taq* polimerasa, enzima de la bacteria *Thermophilus aquaticus* que es capaz de incorporar nucleótidos libres al extremo 3' del partidador, generando copias de la secuencia blanco de manera exponencial, en intervalos cortos de tiempo y a temperaturas elevadas. Se caracteriza por su termoestabilidad, alta procesividad (agrega una gran cantidad de nucleótidos antes de desprenderse) y alta fidelidad (12).

La técnica de PCR se basa en la repetición consecutiva de tres pasos básicos, que en conjunto conforman un ciclo. Primero, el ADN blanco se denatura, formándose hebras simples. Este proceso se lleva a cabo a temperaturas que varían entre los 90 y 96°C. El segundo paso es la hibridación o *annealing* en el cual los partidores, se unen a estas hebras simples. La temperatura de esta etapa es específica de cada partidador. La tercera y última etapa es la síntesis del ADN gracias a la acción de una polimerasa termoestable, la

cual comenzando desde los partidores, se une a la hebra blanco, y adiciona nucleótidos que formarán la hebra complementaria a ésta. El resultado son dos hebras dobles de ADN, conformadas por la hebra original, y la nueva hebra formada, las cuales serán la hebra blanco o molde del ciclo siguiente. Este proceso se repite entre 20 y 40 veces (12).

Al finalizar la serie de ciclos se generarán millones de copias de una zona del ADN original, las cuales son visualizadas como bandas al realizar una electroforesis, en la que el ADN se separa de acuerdo a su peso molecular y su carga eléctrica negativa. Las moléculas de ADN son depositadas en un gel de poliacrilamida o agarosa inmerso en una solución *buffer*, que es sometido a un campo eléctrico. La concentración del gel determina la densidad de la solución, y por tanto, la velocidad con la que se desplazan las moléculas de interés. Efectivamente, mientras menor es el tamaño de los productos de la reacción, más concentrado debe utilizarse el gel, de esta forma, para PCR diagnóstico generalmente se utilizan concentraciones de agarosa al 2% (3, 12,14).

En este contexto, el objetivo principal de esta Memoria de Título fue detectar el gen bla_{TEM} involucrado en la resistencia a ampicilina en bacterias descritas como nosocomiales, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR), posteriormente a partir de las secuencias obtenidas, se estableció el porcentaje de identidad nucleotídica respecto de datos oficiales del GenBank ®. Esto permitió realizar una aproximación de la situación que presentan estos genes en los recintos hospitalarios de la Universidad de Chile y un primer acercamiento del tema en medicina veterinaria dentro del país, para así a futuro desarrollar estudios epidemiológicos que permitan establecer el comportamiento de este gen en las poblaciones bacterianas nacionales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Muestras.

Se estudiaron 3 cepas bacterianas resistentes a Ampicilina, según método de difusión en placa de Kirby-Bauer, obtenidas en un trabajo anterior (10): *Pantoea agglomerans*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus intermedius* (Anexo 1, Cuadro 2).

Obtención del ADN bacteriano.

La extracción de ADN bacteriano se realizó mediante la utilización de un kit comercial para extracción y purificación (Genomic DNA Purification kit, Fermentas®), desde cultivos de 10^6 UFC/ml. Brevemente, a 200 μ L de cultivo bacteriano, se agregaron 400 μ L de solución de lisis, se incubó por cinco minutos a 65° C, homogeneizando manualmente cada 1,5 minutos. Inmediatamente, se agregaron 600 μ L de cloroformo mezclando suavemente e invirtiendo cinco veces. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos (Heraeus Sepatech Biofuge®). Finalizada la centrifugación, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf y se agregaron 800 μ L de solución de precipitación, se mezcló suavemente y se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos. El pellet obtenido se resuspendió por adición de 100 μ L de solución 1,2 M de cloruro de sodio. A esta mezcla, se agregó 300 μ L de etanol frío y se mantuvo a -20° C por diez minutos. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por cuatro minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ L de agua libre de nucleasas (Winkler®). Finalmente, este ADN se usó inmediatamente para realizar la prueba de PCR.

Detección del gen bla_{TEM}. mediante la técnica de PCR.

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y un protocolo que incluyó las temperaturas, el tiempo estimado para cada etapa y el número de ciclos aplicables (16).

Partidores.

Se utilizaron los partidores: 5'- TGGGTGCACGAGTGGGTTAC -3' y 5'- TTATCCGCCTCCATC CAGTC -3' (16).

Mezcla de la reacción para realizar la prueba de PCR.

Se utilizó un kit 2X PCR Master Mix (Fermentas®), que contiene la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el *buffer* de reacción y MgCl₂. En un tubo Eppendorf de 0,2 mL se adicionó 15 μ L del Master Mix, 5 μ L de cada uno de los partidores y 5 μ L de la muestra de ADN, obteniendo un volumen total de 30 μ L.

Amplificación del ADN.

La amplificación de ADN contempla una denaturación inicial a 94° C durante un minuto y posteriormente 30 ciclos (94° C por dos minutos, 57° C por un minuto y 72° C por dos minutos.) Finalmente se realizó una extensión final a 72° C por diez minutos. El tamaño de banda esperado fue de 526 pares de bases (16).

Visualización de los productos amplificados.

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Winkler®) en *buffer* TAE (Fermentas®). El producto de PCR se mezcló con 1 µL del producto comercial de carga, 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para verificar el progreso de la migración de las bandas de ADN. Una alícuota de 6 µL de esta mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por noventa minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 2000 pb (DNA ladder (Fermentas®)). Luego de la electroforesis, el gel se sometió a inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo®) y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP®) para ser finalmente fotografiadas.

Medidas de bioseguridad.

El trabajo de laboratorio se realizó acorde a los niveles de bioseguridad establecidos para los laboratorios de microbiología y virología animal, como uso de material limpio, correcta eliminación de desechos y la utilización de delantal cerrado y guantes en el trabajo práctico. El proceso de visualización del producto amplificado involucra el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV, por lo cual, al momento de visualizar el gel se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel contempló su incineración, pues el bromuro de etidio tiene –entre otras- propiedades mutagénicas.

Secuenciación.

Los fragmentos de ADN se enviaron al Centro de Secuenciación de la empresa GENYTEC según sus requerimientos. Las secuencias fueron obtenidas utilizando el Kit Big Dye Terminator, de Applied Biosystems, y para su lectura se ocupó el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Anexo 2).

Análisis.

A partir de las secuencias entregadas por GENYTEC, se obtuvo una secuencia consenso por cada bacteria estudiada. Posteriormente se utilizó el programa *on line* de libre acceso denominado Clustal W 1.83 para alinear las secuencias consenso obtenidas junto a las variantes del fragmento del gen *bla*_{TEM} (GenBank accession number AF188199.1 y FJ668751.1 correspondiente a *E. coli*; GU734697.1, GU734696.1 y GU734695.1 obtenidas desde cepas de *K. pneumoniae*;) y así se pudo establecer el porcentaje de identidad nucleotídica (17,19). Además se hizo un alineamiento múltiple entre todas las variantes

mencionadas para el gen bla_{TEM} y así observar el porcentaje de identidad nucleotídica entre ellas.

3. RESULTADOS

Detección del gen bla_{TEM} en bacterias descritas como nosocomiales.

Al llevar a cabo el PCR según el protocolo establecido (15) en material genético extraído de bacterias descritas como nosocomiales, se obtuvo la secuencia blanco esperado. Las bandas obtenidas presentaron un tamaño molecular de alrededor de 500 pares de bases y fue posible visualizarlas de forma nítida (Anexo 1, Figura 1). En los pocillos en que se colocó ADN de origen viral no se obtuvo amplificación.

Secuenciación y determinación del porcentaje de identidad nucleotídica (PIN)

Las secuencias de las 3 muestras amplificadas (en duplicado) se obtuvieron satisfactoriamente (anexo 3). El alineamiento múltiple mediante el programa Clustal W1.83 de cada secuencia consenso y el dato oficial para el gen bla_{TEM} (GenBank accession number AF188199.1) indicó un alto porcentaje de identidad ($\geq 93\%$) (Anexos 6 y 7).

Además, se observó que todas las variantes del gen bla_{TEM} comparadas en este estudio, mostraron PIN cercano al 100%, lo que permite aseverar que estamos frente a un gen altamente conservado y por lo tanto podremos trabajar con cualquiera de ellos en futuros estudios.

4. DISCUSIÓN

Reconociendo que la resistencia antimicrobiana constituye una gran amenaza para la Salud Pública, pues los agentes resistentes aumentan los índices de morbilidad y mortalidad, aumentando la estadía del paciente en un centro de atención, la determinación de genes de resistencia podría orientar en la utilización de distintas alternativas terapéuticas (5).

En este aspecto, los resultados obtenidos en este estudio permiten realizar algunas reflexiones en torno a la resistencia observada por las tres cepas bacterianas frente al betalactámico utilizado:

En primer lugar, los métodos utilizados: PCR convencional, electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualización mediante luz ultravioleta, permiten la obtención de un fragmento de ADN de alrededor de 500 pb, lo cual constituye el primer indicio de la presencia del gen bla_{TEM}, tal como fue mencionado anteriormente en la literatura (1, 16). Así, no será necesario diseñar otros partidores mediante alguno de los programas computacionales

existentes (diseño *in silico*) como tampoco hace necesario realizar cambios en el protocolo del PCR utilizado (16).

En segundo lugar, al secuenciar los amplicones obtenidos en forma independiente y obtener la secuencia consenso para cada uno de ellos, el programa Clustal W entregó una información valiosa tanto entre las secuencias consenso, como también entre cada secuencia de consenso y el dato oficial (GenBank accession number AF188199.1): un valor de PIN mayor o igual al 93%. Esto último, se condice con que el gen *bla_{TEM}* es un gen altamente conservado en la naturaleza, alcanzando valores de PIN cercanos al 100% al comparar diversos datos oficiales del GenBank (anexos 3 y 4). Lo anterior permitiría asegurar que cada amplicón -independiente del origen- son parte constitutiva del gen *bla_{TEM}*, constituyendo cada uno por si solo un control positivo nativo para la detección de este gen en bacterias descritas como nosocomiales, validado tanto por su tamaño (~500 pb) como por su secuencia nucleotídica.

Finalmente, de acuerdo a lo anteriormente señalado, en un futuro estudio se podrá disponer tanto de un control nativo para bacteria nosocomiales tanto Gram positivas como Gram negativas, lo cual satisface uno de los objetivos primordiales de esta memoria de título. En el caso de bacteria ambientales Gram positivas descritas como nosocomiales se podrá utilizar *Enterococcus faecium* (PIN=96%) y en el caso de Gram negativas: *Pantoea agglomerans* (PIN=96%).

5. CONCLUSIONES

En esta memoria de título se logró la detección del gen *bla_{TEM}* a partir de bacterias descritas como nosocomiales, aisladas desde recintos hospitalarios veterinarios. Esto fue demostrado tanto por la presencia de una banda de ADN de alrededor de 500 pb como por la secuenciación nucleotídica del amplicón obtenido. Además, los amplicones obtenidos podrán ser utilizados como controles positivos nativos de origen veterinario, por primera vez en Chile.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1- **ARROS, M. 2010.** Detección de dos genes de resistencia a β -lactámicos en bacterias nosocomiales, aisladas en hospitales veterinarios de la Universidad de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 39 pp.
- 2- **CABRERA, C., GOMEZ, F., ZUÑIGA, A. 2007.** La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb med.* 38: 149- 158.
- 3- **DANCHIN, A.; YUEN, K.Y. 2002.** Bacterial Genomics in the Study of Virulence. *In: SUSSMAN, M. Mol Med Microbiol.* Barcelona, España. Academic press. pp. 341-353.
- 4- **DAVIES, J. 1994.** Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science, New Series.* 264: 375-382.
- 5- **DEUTSCHER, M.; FRIEDMAN, C. 2010.** Antibiotic resistance and implications for the appropriate use of antimicrobial agents. *In: MAINOUS III, A.; POMEROY, C.* Management of antimicrobials in infectious diseases. 2.^a Edición. Humana Press. Iowa (Estados Unidos). Pp. 1-11
- 6- **ERRECALDE, J. 2004.** La resistencia a antimicrobianos, sus mecanismos y epidemiología. *In: Uso de antimicrobianos en animales de consumo.* FAO pp. 20-21
- 7- **FERNANDEZ, F., LOPEZ, J., PONCE, L., MACHADO, C. 2003.** Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit.* 32:44-48.
- 8- **GARZA, U., SILVA, J., MARTINEZ, E. 2009.** Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud publica Mex.* 51: 439- 446.
- 9- **GASCHEN, F. 2008.** Nosocomial Infection: Prevention and Approach. *In: 33rd World Small Animal Veterinary Association Congress,* Dublin, Ireland. Pp.323-325
- 10- **JARA, M.A. ; NAVARRO, C., AVENDAÑO, P. 2009.** Identificación y estudio de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias potencialmente responsables de infecciones nosocomiales en los hospitales veterinarios de la Universidad de Chile. *Av. Cs. Vet.* 24: 11-17.
- 11- **MEDIAVILLA, A.; GARCÍA-LOBO, J. 2004.** Antibióticos β -lactámicos. *In: Flores, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, A.* Farmacología Humana, 4.^a edición. Masson, S.A. Barcelona (España). Pp. 1105-1128.
- 12- **MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987.** Specific synthesis of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- 13- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2003.** Epidemiología de las infecciones nosocomiales [en línea] cap.1. *In: Prevención de las infecciones nosocomiales*
<<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/PISpanish3.pdf>>
- 14- **PENNINGTON, T.H. 2002.** Electrophoretic Typing *In: SUSSMAN, M. Mol Med Microbiol.* Barcelona, España. Academia Press. pp. 535-547

- 15- **STEELE, A. 2009.** Nosocomial infection: What's the big deal?. [en línea] <http://secure.aahanet.org/eweb/images/AAHAnet/phoenix2009proceedings/pdfs/03_techician/160_NOSOCOMIAL%20INFECTIONS.pdf> [consulta 21/08/2011].
- 16- **TENOVER, F.C.; HUANG, M.; RASHEED, J.; PERSING, D. 1994.** Development of PCR Assay to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*; 32: 2729-2737.
- 17- **THOMPSON, J.; HIGGINSS, D.; GIBSON, T. 1994.** Clustal W: Improving the sensitivity progressive multiple sequence alignments through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-46
- 18- **WEESE, JS. 2010.** Nosocomial Infections Are Not Just For Referral Hospitals [en línea]<<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2010&Category=8392&PID=56144&O=Generic>> [consulta: 10/06/2011].

Sitios Web

- 19- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Revisada el 16 de julio de 2011]
- 20- <http://www.genytec.cl/secuenciacion.html> [Revisada el 18 de julio de 2011].

7. ANEXO 1

Especie bacteriana	Cuadros clínicos descritos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriemia, infección de heridas quirúrgicas, endocarditis, endoftalmitis, meningitis.
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infección del sitio quirúrgico, peritonitis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infección del tracto urinario asociado a catéteres, neumonías asociadas a ventiladores respiratorios o máquinas de anestesia inhalatoria, bacteriemia
<i>Escherichia coli</i>	Infección del tracto urinario bajo e infección del sitio quirúrgico
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, infección del tracto urinario, infección de heridas, bacteriemia
<i>Serratia marcescens</i>	Bacteriemia, endocarditis, osteomielitis, meningitis, infección de heridas e infección de tractos respiratorio y urinario
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Citrobacter diversus</i> <i>Citrobacter amalonaticus</i>	Infecciones del tracto respiratorio y urinario, bacteriemia, endocarditis, infección de heridas, peritonitis, meningitis, enteritis, osteomielitis
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacteriemia, infecciones del tracto respiratorio y urinario bajo, infecciones a la piel, endocarditis, peritonitis, infecciones de sistema nervioso central y ojo, osteomielitis y artritis séptica.
<i>Proteus mirabilis</i>	Infecciones del tracto urinario bajo, pielonefritis, cálculos vesicales y/o renales asociados y bacteriemia
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Neumonías asociadas a ventiladores o máquinas de anestesia, bacteriemia, infecciones de la piel y tejidos blandos asociados a heridas o quemaduras, infecciones del tracto urinario bajo, endocarditis, meningitis y queratitis.

Cuadro 1: Infecciones descritas según bacteria nosocomial (1, adaptado)

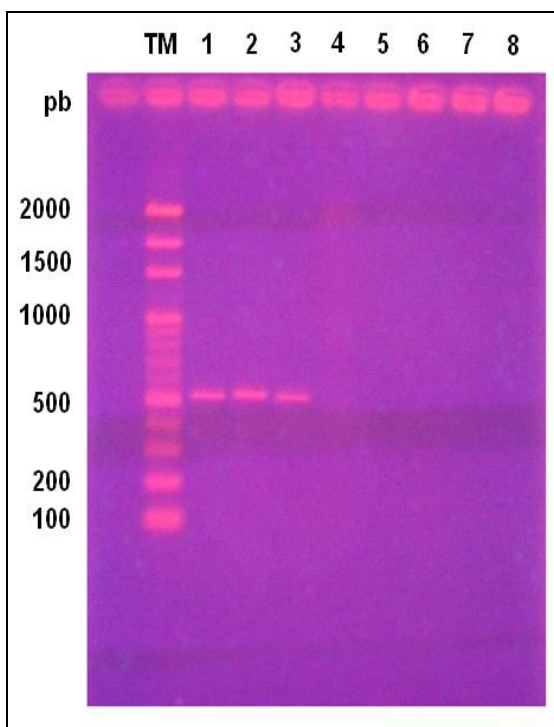
Cuadro 2.
Especies bacterianas sospechosas de portar el gen bla_{TEM}, según Tinción Gram y susceptibilidad antimicrobiana frente a Ampicilina.

Bacterias Gram (-)			Bacterias Gram (+)		
#	Especie	A	#	Especie	A
360	<i>Pantoea agglomerans</i>	R	034	<i>Enterococcus faecium</i>	R
			P4	<i>Staphylococcus intermedius</i>	R

A: Ampicilina: R: resistente.

Figura 1.

Detección del gen bla_{TEM} en 3 cepas de bacterias descritas como nosocomiales



Carril	Contenido
TM	Hyperladder II. 100-2000 pb
1	ADN <i>P. agglomerans</i>
2	ADN <i>E. faecium</i>
3	ADN <i>S. intermedius</i>
4	ADN Virus herpes felino
5	ADN Virus herpes canino
6	ADNc Virus Distemper
7	H2O destilada
8	Sin muestra

ANEXO 2.

Protocolo de envío de los amplicones obtenidos para su secuenciación, según indicaciones de la empresa GENYTEC (15):

Determinación de las cantidades de ADN a secuenciar: Para productos de PCR: Tamaño del fragmento x 0,1 = ng ADN para una reacción de secuencia. (Ej: un amplicón de 500 pb calcular 500 x 0,1 = 50 ng por reacción necesarios) El volumen máximo de reacción de secuencia es de 10 uL por lo cual la mínima concentración de este producto sería de 5 ng/uL.

Envío, además, de 10 uL del partidor a una concentración 10 uM.

ANEXO 3.

Secuencias utilizadas en el análisis mediante Clustal W (13).

a) Secuencias consenso Genytec

>*P.agglomerans* (consenso 1)

```
CCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGATCTGCTATCGGGCGC
GGTATTATAACAGTATTGACGCCAGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACT
TGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
GCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACAACGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
GCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA
TGAAGCTATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAGGGCAACAACGTTGCGCAA
CTATTAACGGCGAACTACTTGC
```

>*E.faecium* (Consenso 2)

```
CCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAAAACGTTTTCATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGT
ATTAACCAAATATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG
TTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTG
CCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTAAAAAAGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCAGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGTTTCTGAATGAA
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
AACTGGCGAACTACTTAC
```

>*S.intermedius* (Consenso 3)

```
CCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCAATGATGAGCAGTTTTAAATTTCTGCTATCTGGCGCGG
TATTATCGCGTATTGATTCTGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATCGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC
CATAACCATGAGTGATCACACTGCGGCCAACTTACTTCTCACAAACGATCGGAGGACCGAACGAGCTAA
CCGCTTTTTTGCACAACATGCGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGTTTCTGAATGAA
GCCATACCAAACGCGGAGCCTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCTAACTATT
AACTGGCGAACTACTTAC
```

b) Secuencias oficiales del GenBank®

>GU734697.1 (secuencia 1)

```
CTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTT
CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAG
CAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCAT
CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCC
AACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCAT
GTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGG
CTGGCTGGTTT
```

>GU734696.1 (secuencia 2)

CTGTTTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTG
GGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCA
ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCAGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAA
CTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTT
ACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAA
CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGT
AACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGG
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCT
GGCTGGTTTATTGCT

>GU734695.1 (secuencia 3)

CTTCCTGTTTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT
CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCAGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAG
CAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCAT
CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCC
AACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCAT
GTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGG
CTGGCTGGTTTATTGCT

>FJ668751.1 (secuencia 4)

TGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCAAC
CCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT
TAAAGTTCTGCTATGTGGTGCAGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCAT
ACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
AGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAAC
GATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATC
GTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGA
CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTG
CTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG
CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGAT
CGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA

>AF188199.1 (secuencia 5)

CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGC
GTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG
GTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGT
GCCATAACCATGAGTGATAAAGTACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCT
AACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGA
AGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTAT
TAACTGGCGAACTACTTAC

>AY359287.1 (secuencia 6)

TGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCG
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGATA
CAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG
CCCTTATCCCTTTTTTGCAGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC
TTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCAGT
ATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTG
CCATAACCATGAGTGATAAAGTACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
AACTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
AGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
GTGGATCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACA
CGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTACCTCACTGATT
AAGCATTGGTAA

>AF427133.1 (secuencia 7)

TGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCG
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGATA
CAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC AACATTTCCGTGTCCG
CCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC
TTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGT
ATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTG
CCATAACCATGAGTGATAAACAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC
AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
GTGGATCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACA
CGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
ACTGATTAAGCATTGGT

>AF093512.1 (secuencia 8)

TGATACTATATTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAACTGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACCTTTTCG
GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGA
CAATAACCCTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC AACATTTTCGTGTCCG
CCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC
TTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGT
ATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTG
CCATAACCATGAGTGATAAACAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATAGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC
AGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTAAGCG
TGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAC
GACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA
AGCATTGGTAAC

ANEXO 4.

Alineamiento múltiples entre secuencias del GenBank®

GU734696.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	116
AF093512.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	359
GU734695.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	120
FJ668751.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	173
AF188199.1	-----CCTTGAGAGTTTT	13
GU734697.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	120
AY359287.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	359
AF427133.1	GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT	359

GU734696.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	176
AF093512.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	419
GU734695.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	180
FJ668751.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	233
AF188199.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	73
GU734697.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	180
AY359287.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	419
AF427133.1	CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCCGTA	419

GU734696.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	236
AF093512.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	479
GU734695.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	240
FJ668751.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	293
AF188199.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	133
GU734697.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	240
AY359287.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	479
AF427133.1	TTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAAT	479

GU734696.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	296
AF093512.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	539
GU734695.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	300
FJ668751.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	353
AF188199.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	193
GU734697.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	300
AY359287.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	539
AF427133.1	GACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA	539

GU734696.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	356
AF093512.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	599
GU734695.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	360
FJ668751.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	413
AF188199.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	253
GU734697.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	360
AY359287.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	599
AF427133.1	GAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTCTGCTGCCAACTTACTTCTGACA	599

GU734696.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	416
AF093512.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	659
GU734695.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	420
FJ668751.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	473
AF188199.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	313
GU734697.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	420
AY359287.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	659
AF427133.1	ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC	659

GU734696.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	476
AF093512.1	CGCCTTGATAGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	719
GU734695.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	480
FJ668751.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	533
AF188199.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	373
GU734697.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	480
AY359287.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	719
AF427133.1	CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC	719

GU734696.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	536
AF093512.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	779
GU734695.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	540
FJ668751.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	593
AF188199.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	432
GU734697.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	540
AY359287.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	779
AF427133.1	ACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAC TGCGGAACTACTTACT	779

GU734696.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	596
AF093512.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	839
GU734695.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	600
FJ668751.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	653
AF188199.1	-----	
GU734697.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	600
AY359287.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	839
AF427133.1	CTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTT	839

GU734696.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT----- 632
 AF093512.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTAAGCGT 899
 GU734695.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT----- 636
 FJ668751.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT 713
 AF188199.1 -----
 GU734697.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTT----- 630
 AY359287.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT 899
 AF427133.1 CTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT 899

ANEXO 5. Porcentajes de identidad nucleotídica (PIN) entre datos oficiales del GenBank®

Secuencia A	Nº de acceso	Nº de bases	Secuencia B	Nº de acceso	Nº de bases	%
6	AY359287.1	1046	8	AF093512.1	1047	98
7	AF427133.1	1044	8	AF093512.1	1047	98
1	GU734697.1	630	2	GU734696.1	632	99
1	GU734697.1	630	6	AY359287.1	1046	99
1	GU734697.1	630	7	AF427133.1	1044	99
1	GU734697.1	630	8	AF093512.1	1047	99
2	GU734696.1	632	6	AY359287.1	1046	99
2	GU734696.1	632	7	AF427133.1	1044	99
2	GU734696.1	632	8	AF093512.1	1047	99
3	GU734695.1	636	6	AY359287.1	1046	99
3	GU734695.1	636	7	AF427133.1	1044	99
3	GU734695.1	636	8	AF093512.1	1047	99
4	FJ668751.1	860	6	AY359287.1	1046	99
4	FJ668751.1	860	7	AF427133.1	1044	99
4	FJ668751.1	860	8	AF093512.1	1047	99
5	AF188199.1	432	6	AY359287.1	1046	99
5	AF188199.1	432	7	AF427133.1	1044	99
5	AF188199.1	432	8	AF093512.1	1047	99
6	AY359287.1	1046	7	AF427133.1	1044	99
1	GU734697.1	630	3	GU734695.1	636	100
1	GU734697.1	630	4	FJ668751.1	860	100
1	GU734697.1	630	5	AF188199.1	432	100
2	GU734696.1	632	3	GU734695.1	636	100
2	GU734696.1	632	4	FJ668751.1	860	100
2	GU734696.1	632	5	AF188199.1	432	100
3	GU734695.1	636	4	FJ668751.1	860	100
3	GU734695.1	636	5	AF188199.1	432	100
4	FJ668751.1	860	5	AF188199.1	432	100

