



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

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Bordetella spp.* MEDIANTE
LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA SEMIANIDADA**

NICOLÁS FERNANDO TAMAYO VÁSQUEZ

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

PROFESOR GUÍA
CARLOS OSVALDO NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE

2018



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

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Bordetella spp.* MEDIANTE
LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA SEMIANIDADA**

NICOLÁS FERNANDO TAMAYO VÁSQUEZ

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

Nota:

		Nota	Firma
Prof. Guía	CARLOS NAVARRO VENEGAS
Prof. Consejera	CONSUELO BORIE POLANCO
Prof. Consejero	PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO, CHILE

2018

AGRADECIMIENTOS (y otras cosas)

"...aquí están los geólogos, y el que maneja el escalpelo y el puro matemático. Señores, a vosotros los máximos honores. Vuestros datos son útiles, mas no son mi morada. Paso por ellos para llegar a aquella..."

Canto XXIII, Canto a mí mismo, Walt Whitman.

De todo lo contenido en las siguientes páginas, ese puñado de palabras de Walt Whitman es quizás lo más elocuente. Nada encontrará el lector de esta "memoria" que sea tan valioso como esos versos.

¿Cuál es entonces nuestra "morada"? No lo sabemos (aún), pero si sabemos que para llegar a aquella, teníamos que pasar por aquí. Y atravesar por este tramo de esta "Odisea" personal era algo imposible sin una tripulación, a ellos también van dirigidos los máximos honores.

A mis padres los máximos honores. Gracias a ellos, por todo.

A los amigos, pero sobretudo a los enemigos, porque son estos últimos los que más nos ayudan a salir de la somnolencia y a descubrir de qué estamos hechos. A ellos, por igual, los máximos honores.

A los que saben dónde están parados y son un faro de luz para los que navegamos, a ellos gracias por la guía en momentos de "escasa lucidez".

A los pacientes, a aquellos que respetan la incomprensible manera de hacer las cosas que tenemos algunos, a ellos (sobretudo a uno) gracias infinitas.

A los que mantienen y cuidan un "espacio vacío", uno de los trabajos más importantes y quizás, por su sutil naturaleza, el que pasa más desapercibido. Sin ellos mucho de lo hecho nunca podría haber sido realizado.

A los que sin saberlo, y sin quererlo, contribuyeron con una palabra, un gesto, un mensaje en el momento justo.

A los confidentes, a todos aquellos que tienen el magnífico don de guardar secretos.

A los suaves y a los ásperos, a los primeros por ser espacio de refugio, a los segundos por actuar de picana para que uno se ponga en movimiento.

A los que tuvieron la intención de ayudar pero no concretaron. Y los que sin tener ninguna intención, ayudaron.

Al vino chileno y a la cerveza alemana.

A la música y a las musas.

A lo que no se puede nombrar sino con metáforas.

A los que se me olvidan, y a los que recuerdo perfectamente pero no quiero mencionar para resguardar sus identidades.

Al pueblo de Santa Cruz y a su hijo ilustre, por la paciencia, apoyo, ayuda y comprensión, compromiso y cariño para conmigo, para con los que ya pasaron, y espero, para con los que vendrán

.

A "Mi Mismo".

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue implementar un protocolo de diagnóstico para *Bordetella spp* a través de la detección del gen *flaA*, que codifica la proteína estructural flagelina, mediante la reacción en cadena de la polimerasa semianidada. Para esto se diseñaron 3 partidores *in silico* mediante el uso del programa OligoPerfect™, los cuales fueron posteriormente sintetizados por la empresa BIOSCAN.

Utilizando como muestras tres cepas de *Bordetella bronchiseptica*, se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados (362 pb y 170 pb) y, tras la secuenciación del fragmento de 362 pb, se determinó un porcentaje de identidad nucleotídica del 95% respecto al dato oficial registrado en GenBank, a través del programa Clustal Ω . Este valor fue corroborado al ingresar la misma secuencia al programa online BLAST, el cual también entregó un porcentaje de identidad nucleotídica del 95% respecto al gen de la proteína flagelina de *Bordetella spp*.

ABSTRACT

The objective of this study was to implement a diagnostic protocol for *Bordetella spp*, by the chain reaction of the semi-nested polymerase, through the detection of the *flaA* gene, which encodes the structural protein flagellin. For this, 3 *in silico* primers were designed through the use of the OligoPerfect™ program, which were later synthesized by the BIOSCAN company. Using three strains of *Bordetella bronchiseptica* as samples, fragments of the expected sizes were obtained (362 bp and 170 bp) and, after the sequencing of the larger amplicon, a percentage of 95% nucleotide identity was determined with respect to the official data registered in GenBank, through the Clustal Ω program. This value was corroborated when entering the same sequence to the BLAST online program, which also delivered a 95% nucleotide identity percentage with respect to the flagellin protein gene of *Bordetella spp*.

INTRODUCCIÓN

Bordetella bronchiseptica es un microorganismo que afecta las vías respiratorias de varias especies. Está involucrada en diversas patologías, como rinitis atrófica en cerdos, traqueobronquitis infecciosa canina, e incluso se le reconoce la capacidad de afectar a los seres humanos, sobre todo a individuos inmunodeprimidos.

Es un patógeno que puede llegar a ocasionar grandes pérdidas económicas en criaderos o explotaciones con una alta carga animal. Por esta razón, se hace importante generar herramientas diagnósticas que permitan detectar esta bacteria de forma temprana y sencilla.

Tradicionalmente, el diagnóstico de *B. bronchiseptica* se basa principalmente en los signos clínicos y antecedentes epidemiológicos. Aunque el cultivo bacteriológico tiene una gran especificidad diagnóstica, es una técnica donde los microorganismos presentan lento desarrollo y donde la identificación fenotípica de las bacterias es compleja. Por otra parte su sensibilidad podría ser menor al compararla con técnicas de diagnóstico molecular, ya que solo una fracción del total de las bacterias puede crecer en un medio artificial. Por lo tanto, el implementar técnicas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad puede contribuir a la mejora en la detección y los manejos asociados a los cuadros respiratorios producidos por este agente.

En el presente estudio se implementó un protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Bordetella spp.* en los laboratorios de Microbiología y Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, como un método alternativo y/o complementario al diagnóstico mediante cultivo. Se pretendió acceder a las ventajas que esta técnica entrega en cuanto al diagnóstico, con el consecuente beneficio que esto significa para el tratamiento y recuperación de los individuos afectados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Bordetella bronchiseptica es un coco-bacilo Gram negativo, aerobio estricto. Este microorganismo se puede encontrar en el tracto respiratorio de perros y además en otras especies como gatos, cerdos, animales de laboratorio y humanos. Su transmisión se produce por contacto directo, por la generación de aerosoles o fomites contaminados. Existe evidencia de transmisión ocasional entre especies, particularmente entre perros y gatos (Molina *et al.*, 2006).

Se asocia a cuadros respiratorios, donde su rol como agente primario o secundario aún es discutido. Esto se debe a que hay evidencia de que esta bacteria está implicada en la presentación de casos agudos de enfermedades respiratorias, así como también de que es un agente etiológico secundario a una infección viral (Molina *et al.*, 2006).

Se considera a *B. bronchiseptica* el principal agente etiológico de la traqueobronquitis infecciosa canina (TIC), conocida como “tos de las perreras”. Además, se ha descrito que también participa en este cuadro el virus de la parainfluenza canina, adenovirus tipo-2, herpes virus canino, reovirus, hongos y *Mycoplasma* sp (Keil y Fenwick, 2000).

Sin embargo, se considera también que esta bacteria es parte de la microbiota normal del tracto respiratorio de perros (Molina *et al.*, 2006), lo cual contribuye a poner en duda su rol primario en esta enfermedad. Evidencia de esto nos la aportan estudios donde se ha encontrado una mayor incidencia de otros agentes infecciosos por sobre la de *B. bronchiseptica* al analizar muestras provenientes de animales comprometidos respiratoriamente. Ejemplo de esto es un estudio donde se tomaron muestras a 86 perros que mostraban signos clínicos de infección respiratoria, al ser sometidas a una PCR, solo 7 resultaron ser positivos a *B. bronchiseptica*, mientras que en los otros individuos se diagnosticó la presencia del Virus de la parainfluenza canina, adenovirus tipo 2 y Coronavirus canino tipo 2 (pantrópico) (Mochizuki *et al.*, 2008)

En la mayoría de los casos la infección permanece localizada en el tracto respiratorio. La congregación de perros de distintas edades y diferentes niveles de susceptibilidad a los agentes involucrados en el cuadro predispone a la presentación del mismo. Debido a esto se considera que el complejo respiratorio canino es una enfermedad difícil de prevenir en sociedades humanas, hospitales veterinarios, institutos de investigación y lugares donde se alojan o muestran perros de exposición (Keil y Fenwick, 2000).

La enfermedad puede ser leve y presentarse con tos seca, o puede presentarse en forma

severa, en cuyo caso se manifiesta con una tos de tipo paroxística seca o mucosa, acompañada de descarga ocular y nasal. Los perros con la presentación severa pueden desarrollar neumonía. Puede también presentarse regurgitación o vómitos asociados a la tos. El cuadro dura entre una y tres semanas (Matto y Cherry, 2005).

Se reconoce en la bacteria la habilidad para colonizar células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio. Esto se debe a la presencia de adhesinas fimbriales y no fimbriales. Dentro de estas últimas se encuentran la hemoaglutinina y pertectina, ubicadas principalmente en la membrana externa de la bacteria. *B. bronchiseptica* produce endo y exotoxinas, dentro de estas últimas se señala una hemolisina adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica y citotoxina traqueal. Estos factores afectan las células ciliadas, inhiben la respuesta de células fagocíticas, suprimen la respuesta inmune y se asocian con los signos clínicos en perros con TIC (Keil y Fenwick, 2000).

Respecto al tratamiento con antimicrobianos, la selección del antibiótico debe realizarse en base a los resultados del cultivo microbiológico y a la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana. En espera de esta información, se pueden administrar aminoglucósidos, penicilinas, tetraciclinas, y quinilonas, antimicrobianos a los que la bacteria suele ser sensible (Matto y Cherry, 2005).

En general, la TIC es autolimitante y no requiere terapia antibiótica. Sin embargo se recomienda su uso profiláctico en individuos que hayan estado en contacto con perros que hayan presentado el cuadro (Keil y Fenwick, 2000). Se pueden administrar aminoglucósidos, penicilinas, tetraciclinas, y quinilonas, antimicrobianos a los que la bacteria suele ser sensible (Matto y Cherry, 2005).

En cerdos, *B. bronchiseptica*, se asocia al complejo respiratorio porcino, donde participan distintos agentes como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y *Mycoplasma hyopneumoniae*. En este cuadro *B. bronchiseptica* actúa como agente primario junto a *Pasteurella multocida* provocando rinitis atrófica. Se afecta la parte superior del aparato respiratorio porcino produciendo atrofia de los cornetes, desviación del septo nasal y deformación de los huesos de la nariz. Se la considera una enfermedad costosa y de amplia prevalencia. Se ha descrito que cuando *B. bronchiseptica* es el único agente involucrado, la enfermedad es leve. Sin embargo, debido a que esta bacteria puede colonizar en los primeros días de vida, provocando la destrucción de los cilios del epitelio, se torna relevante ya que

facilita la posterior colonización de *P. multocida* (Espinoza y Martínez, 2008).

Todo esto repercute directamente en la rentabilidad de la explotación, debido a que existe ineficiencia en la conversión alimenticia, aumento en el número de días en que los cerdos llegan a matadero, gasto por medicamentos, altos decomisos y costos derivados de la asistencia veterinaria (Espinoza y Martínez, 2008).

En animales de laboratorio se presentan cuadros respiratorios debido a esta bacteria. Las manifestaciones pueden variar desde descarga nasal, estornudos, anorexia, y pérdida de peso hasta bronconeumonía y septicemia. Específicamente en conejos se conoce como el catarro del conejo (Matto y Cherry, 2005).

En humanos, *B. bronchiseptica* es difícilmente encontrada. Sin embargo existen casos de personas inmunológicamente comprometidas donde esta bacteria puede causar infecciones del tracto respiratorio superior, pneumonitis, endocarditis, peritonitis, meningitis y bacteremias. En seres humanos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, esta bacteria puede causar neumonía intersticial (Galeziok *et al.*, 2009).

Se suele diagnosticar clínicamente mediante sintomatología y la presencia de factores predisponentes, como son ambientes de alta carga animal tales como exposiciones, criaderos, hoteles, hospitales u otra situación de grupo (Keil y Fenwick, 2000).

Respecto al diagnóstico microbiológico, las muestras pueden provenir de hisopados nasales o de lavado traqueal. Se privilegian las muestras traqueales, debido a que se elimina el problema que puede significar el identificar la *B. bronchiseptica* que es parte de la microbiota normal de la orofaringe (Keil y Fenwick, 2000).

Para el cultivo se pueden utilizar tanto el agar McConkey como el agar sangre. *B. bronchiseptica* es inhibida por cefalexina, por lo tanto el aislamiento de esta bacteria no será posible si se usa en medio de transporte Regan-Lowe y si el medio de cultivo contiene el antimicrobiano mencionado. En su lugar se puede utilizar metilicina u oxacilina para asegurar el crecimiento de la bacteria e inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (Matto y Cherry, 2005).

La incubación debe realizarse a una temperatura de 37° C por un período de 48 horas. En agar McConkey las colonias se presentan pequeñas, con un diámetro que no supera 1.0 mm, convexas, lisas, y con una coloración rojiza acompañada de una zona ámbar descolorida (Coutinho *et al.*, 2009). Para identificar correctamente esta bacteria es necesario evaluar sus

características bioquímicas. La bacteria se identifica como *B. bronchiseptica* cuando resulta positiva a la prueba de oxidasa, ureasa, catalasa, citrato y reducción del nitrato, y negativa a las pruebas del indol, hidrólisis de gelatina, y producción de ácido a partir de 9 azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa, manosa, melibiosa, inositol, sorbitol, rhamnosa y arabinosa) (Molina *et al.*, 2006).

Sin embargo, existen algunas limitaciones: el proceso de cultivo de *B. bronchiseptica* suele consumir al menos 2 días y las pruebas bioquímicas no pueden ser realizadas antes de este período (Couthino *et al.*, 2009).

Aunque el cultivo bacteriológico tiene una gran especificidad diagnóstica, su sensibilidad podría ser baja al compararla con técnicas de diagnóstico molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual puede otorgar resultados positivos a pesar de la terapia antibiótica, además permite pesquisar muestras con bajo recuento de microorganismos y no necesariamente viables (Osses *et al.*, 2010). Por otra parte, la PCR no está limitada por la capacidad de los microorganismos de crecer en medios de cultivo, además el resultado obtenido puede entregar mucha más información que solo indicar la presencia de la bacteria, ya que puede entregar datos utilizables para determinar características epidemiológicas y filogenéticas (Couthino *et al.*, 2009). En este aspecto, se han establecido varios protocolos de PCR para identificar diferentes regiones del genoma de varias especies de *Bordetella*. Sin embargo la mayor parte de ellos están enfocados a *B. pertussis*, microorganismo que provoca la tos ferina en humanos (Couthino *et al.*, 2009; Tatti *et al.*, 2011; Grogan *et al.*, 2011, Lanotte *et al.*, 2011; Tatti y Tondella, 2013).

Según algunos estudios taxonómicos, *B. pertussis* habría evolucionado a partir de *B. bronchiseptica* (Keil y Fenwick, 2000). Esto hace necesario establecer protocolos que identifiquen específicamente a cada una de estas especies por separado, lo cual se dificulta al estar estrechamente relacionadas y tener similitud en su genoma. Dicha situación constituye un inconveniente en medicina humana, ya que al diagnosticar *B. pertussis* mediante PCR, *B. bronchiseptica* interfiere generando falsos positivos (Register y Nicholson, 2007). Si bien existe una forma de identificar específicamente a *B. bronchiseptica* (Hozbor *et al.*, 1999), en este trabajo se detectaron bacterias del género *Bordetella*, sin intentar determinar si corresponden a una u otra especie. De esta manera se pondrá a prueba un método diagnóstico ideado desde la base, partiendo por la elección del gen a identificar, el diseño de partidores y

su posterior desempeño frente al agente en cuestión. Esto constituye una puesta en práctica de un protocolo a seguir para la detección de un agente, así como también el establecimiento de una alternativa diagnóstica concreta para bacterias del género *Bordetella*.

Así, en esta Memoria de Título se implementó el diagnóstico molecular de *Bordetella spp.* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa semianidada, utilizando el diseño de partidores *in silico* para identificar el gen *flaA* que codifica la proteína estructural flagelina. Los genes que codifican esta proteína son candidatos ideales para actuar de biomarcadores, ya que por ser una proteína localizada en la superficie de la bacteria muestran una tasa de divergencia mucho mayor en su secuencia de aminoácidos que aquellas localizadas en el interior de la célula (Winstanley *et al.*, 1997). Además se ha demostrado que el flagelo es necesario para iniciar y potenciar la interacción entre la bacteria y la superficie celular, por lo cual el flagelo tiene el potencial de distinguir entre varias especies hospedadoras (Nicholson *et al.*, 2012).

OBJETIVO GENERAL

Implementar el diagnóstico molecular de *Bordetella spp.* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa semianidada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar el gen *flaA* que codifica la proteína estructural flagelina en tres cepas de *B. bronchiseptica*.
2. Determinar el porcentaje de identidad nucleotídica del fragmento obtenido en relación a la secuencia del gen *flaA* entregada por el GenBank.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología y de Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET), Universidad de Chile.

Muestras. Se utilizaron tres cepas de *B. bronchiseptica*, dos procedentes del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP): (BB1, BB2) y otra procedente del Laboratorio de Microbiología de FAVET: (BB3). Como control negativo se utilizó ADN de *Salmonella* Enteritidis (SE) y de Virus herpes canino (VHC1). Como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas (ALN).

Obtención del ADN bacteriano. La extracción de ADN bacteriano se realizó mediante la utilización de un kit comercial (Genomic DNA Purification kit, Fermentas®). Desde una suspensión en suero fisiológico estéril de 6×10^8 UFC/ml –obtenidos por turbidez comparada al tubo 0.5 de McFarland– se tomaron 200 μ L, a los que se agregaron 400 μ L de solución de lisis, incubándose por cinco minutos a 65° C. Transcurrido ese tiempo, se agregaron 600 μ L de cloroformo, mezclando suavemente, y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos (*Heraeus Sepatech Biofuge*®). Posteriormente, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf y se agregaron 800 μ L de solución de precipitación, para volver a centrifugar a 10.000 rpm por dos minutos. Se eliminó el sobrenadante y el ADN se resuspendió con 100 μ L de solución 1,2 M de Cloruro de Sodio y agitado en vórtex. A esta mezcla se agregaron 300 μ L de etanol frío, y luego se mantuvo a -20° C por diez minutos. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm, durante tres minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ L de agua libre de nucleasas (*Winkler*®), obteniéndose así el ADN que se utilizó en la PCR.

Detección del gen *flaA* mediante la reacción en cadena de la polimerasa semi anidada.

Partidores: Utilizando el programa OligoPerfect™ se diseñaron dos pares de partidores cuya secuencia objetivo es el gen *flaA* (Anexo 1). Luego se enviaron a sintetizar a la empresa BIOSCAN.

La secuencia de los partidores sintetizados es la siguiente:

Partidor 1	ACCTGAACAAGTCCCAATCG
Partidor 2	GACCTTGATGCCGTTGAAGT
Partidor 3	CGCTGAACGAAATCAACAAC

Se espera que el partidor 1 y el partidor 2 generen un fragmento de 362 pares de bases (Anexo 2a), mientras que el partidor 2 y el partidor 3 generen un fragmento de 170 pares de bases (Anexo 2b). Esta es la razón por la cual esta es una PCR semianidada, ya que el partidor 2 participa en ambas reacciones.

Mezcla de la reacción: Se utilizaron 15 μL del kit comercial 2X PCR Master Mix (*Taq* ADN polimerasa, MgCl_2 y los desoxiribonucleótidos trifostatos), 5 μL del ADN molde y 5 μL de cada partidor específico con una concentración de 1 μM , llegando a un volumen final de 30 μL .

Amplificación del ADN: La técnica de PCR contempló una etapa de denaturación del ADN, seguido de una etapa de alineamiento de los partidores y una etapa final de elongación. La variante semianidada consistió en utilizar un segundo par de partidores que amplificaron un fragmento de menor tamaño, pues utilizó como templado el amplicón generado por el primer par de partidores. La determinación de las temperaturas de alineamiento para cada par de partidores consideró la utilización de un termociclador de gradiente de temperaturas siguiendo un esquema estándar de PCR: denaturación inicial a 94°C (dos minutos), luego 35 ciclos: denaturación (94°C, un minuto), alineamiento, elongación (72°C, un minuto) y finalmente un periodo de elongación por cinco minutos a 72°C.

Visualización del producto amplificado: Se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Winkler ®) en buffer Tris-borato (90 Mm Tris-borato, 10 mM EDTA) como solvente. Una alícuota de 6 μL de esta mezcla se depositó en el pocillo correspondiente en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 volt por 40 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó un estándar que contiene fragmentos de ADN entre 100 y 1000 pares de bases (pb) (*Hyperladder IV*, Bioline®). Luego de la electroforesis, el gel se sometió a incubación en Bromuro de Etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fermelo ®) durante 35 minutos y posteriormente se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator UVP ®), donde finalmente se fotografió para obtener registro de los resultados.

Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®

Secuenciación: Cinco fragmentos de ADN obtenidos mediante la PCR1 se enviaron a la empresa Genytec para la determinación de su secuencia nucleotídica

Análisis: Con el propósito de obtener una secuencia consenso, las 5 secuencias obtenidas se alinearon usando el programa Clustal Ω . La secuencia consenso fue alineada con uno de los datos oficiales del Genbank (número de acceso L13034.1) para la obtención del porcentaje de identidad nucleotídica, el cual fue corroborado mediante el uso del programa on line BLAST.

Medidas de bioseguridad. Para este trabajo las medidas de bioseguridad necesarias están asociadas a la manipulación de la bacteria *B. bronchiseptica*, a la realización de la PCR y a la posterior visualización del producto amplificado. Con respecto a lo primero se consideró el acceso limitado a las instalaciones, el uso de mechero Bunsen para delimitar una zona de trabajo estéril, el uso de delantal, uso de autoclave, la utilización de material limpio y la apropiada eliminación de desechos. En lo que respecta a la realización de la PCR, se delimitó una zona limpia y exclusiva para este procedimiento, para evitar contaminación con material genético no proveniente de la muestra, y se utilizaron guantes de látex para realizar los procedimientos, como por ejemplo la utilización de Bromuro de Etidio, el cual tiene propiedades mutagénicas. Al momento de utilizar el transiluminador de luz ultravioleta se utilizaron con gafas con filtro UV y una placa de acrílico situada entre el equipo y quien visualiza el gel. Finalmente, el gel fue incinerado junto con los guantes que se utilizaron para su manipulación.

RESULTADOS

Detección del gen *flaA* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa semianidada.

La figura 1 muestra una fotografía del gel de Agarosa sometido a electroforesis (90 volt, 40 minutos) e incubado en Bromuro de Etidio (35 minutos). En ella se visualizan fragmentos de ADN de tamaños aproximados a los esperados (362 y 170 pb) al tener como referencia al marcador de tamaño entre 100 y 1000 pb. Las bandas fluorescentes se notan nítidas y únicas. No se observan bandas en los carriles de los controles negativos.

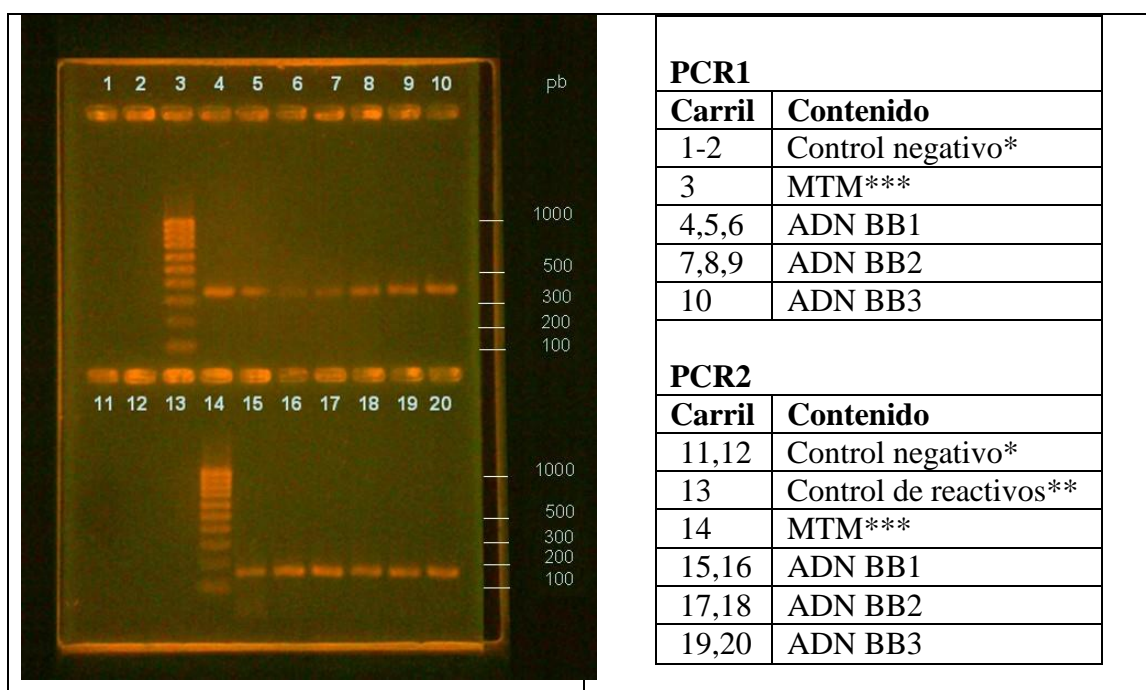


Figura 1: Fotografía del gel de Agarosa sometido a electroforesis. En la tabla se detalla que fue cargado en cada pocillo del gel.

* **Control negativo:** ADN de *Salmonella* Enteritidis y Virus Herpes Canino.

** **Control de reactivos:** agua libre de nucleasas.

*** **MTM:** Marcador de tamaño molecular. 100-1000 pb (*Hyperladder* IV, Bioline®)

Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante la PCR para la muestra BB3 se enviaron en quintuplicado a la empresa Genytec para la determinación de su secuencia nucleotídica, recibiendo 5 secuencias (Anexo 3), y obteniendo la siguiente secuencia consenso a partir de ellas:

>NTV6

```
TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTCGTCGGGTCTG
AGCATCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTCCAGGCCATCGCCTACCGCTTCA
CCGCCAACGTCAAGGGCCTGACCAAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTT
GATCGCCCAGACGTCCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAAGAACAACATGCAGCG
CATCCGCGAACTGACAGTTCAGGTCTCCAACGGCACGTACTCGGCTTCGGACATC
GACTCGATCCAGCAGAAAGTCAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACCCATCGCCGA
GCAGTCCGACTTCAACGGCA
```

El alineamiento de esta secuencia consenso versus el dato oficial del GenBank (número de acceso L13034.1) arrojó un valor de PIN de 95% (figura 2):

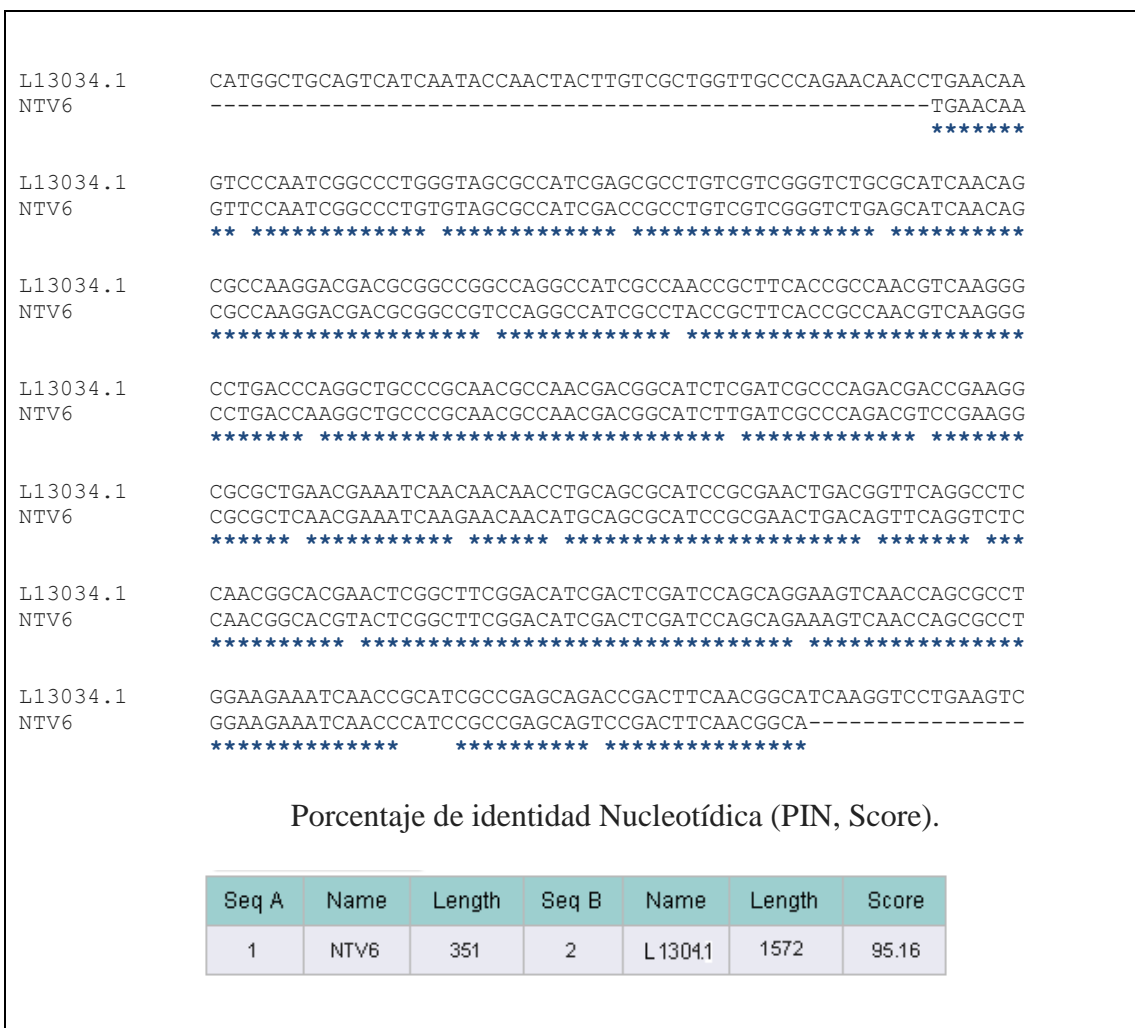


Figura 2: Alineamiento del fragmento de 351 pb confrontado a la secuencia oficial aportada por el GenBank.

Este valor de PIN fue confirmado paralelamente con el valor entregado por el programa BLAST, el cual también entregó un valor de 95% (Anexo 4).

DISCUSIÓN

El diagnóstico de *B. bronchiseptica* a través del cultivo bacteriano involucra un periodo de incubación a 37°C por 48 horas (Keil y Fenwick, 2000; Couthino *et al.*, 2009). Este tiempo se reduce al utilizar una técnica de diagnóstico molecular como la PCR. Sin embargo, no es solo en materia de tiempo que la PCR representa una ventaja frente al cultivo, pues en términos de sensibilidad la técnica de la PCR ha arrojado resultados positivos en muestras sospechosas que al ser diagnosticadas mediante cultivo bacteriológico han entregado resultados negativos (Canonne *et al.*, 2016)

Adicionalmente, y dada la gama de cuadros respiratorios en donde *B. bronchiseptica* participa, implementar un protocolo de PCR para el diagnóstico de este agente es necesario. De hecho, durante el transcurso mismo de esta memoria, los partidores y el protocolo propuesto fueron utilizados por profesionales de Laboratorio de Microbiología para la identificación de microorganismos sospechosos de corresponder a *B. bronchiseptica*, demostrando esto la utilidad del trabajo llevado a cabo.

La decisión de realizar una PCR semianidada respondió a las ventajas que presenta esta variante frente a la PCR convencional. Si bien una PCR con solo un par de partidores puede perfectamente servir como método de diagnóstico certero, una PCR anidada aumenta tanto la especificidad como también la sensibilidad (Mendoza *et al.*, 2001). En rigor, la PCR realizada corresponde a la variante semianidada porque se decidió utilizar los partidores que el programa OligoPerfect™ sugirió como “los mejores” frente a la secuencia a identificar. En este caso el partidador 2 participa de la primera reacción con el partidador 1, y luego en la segunda reacción con el partidador 3.

Relacionado a lo anterior, posterior a la experiencia que permitió demostrar la utilidad de los partidores y el protocolo, se realizaron reacciones con otras muestras sospechosas de contener *B. bronchiseptica* obteniendo resultados positivos. Sin embargo, lo interesante es que se observó en la práctica lo descrito en las líneas precedentes: hubo muestras que al ser enfrentadas a un par de partidores (PCR convencional) otorgaron un resultado negativo, pero cuando se realizaba la PCR semi anidada, resultaban ser positivas. Esto puede deberse a un error en el procedimiento (la no incorporación de un partidador de la primera reacción, por ejemplo), o bien a un efecto de la cantidad de ciclos de reacción, ya que una cantidad de

ADN no visualizada con la primera PCR, ciertamente puede serlo después de la segunda reacción. Sin embargo, en este caso particular, cabe destacar el hecho de que una muestra que tras la primera reacción arrojaba un resultado negativo, tras la segunda reacción resulto ser positiva.

Respecto a la secuenciación del fragmento de 360 pb, se envió en quintuplicado con el objetivo de que la errónea determinación de una o varias bases nitrogenadas pueda ser detectada al alinear y comparar esas cinco secuencias. Es así como se obtiene una secuencia consenso a partir de las cinco muestras, y es esta la que finalmente se utilizó para determinar el porcentaje de identidad nucleotídica al contrastarla con el dato del GenBank. Un PIN de 95% (alto valor) permitió corroborar que el fragmento de ADN de 360 pb es constitutivo del gen de la proteína flagelina de *Bordetella spp*, esto considerando que un valor de PIN $\geq 80\%$ permite decir que las secuencias confrontadas corresponden al mismo gen (Chopra y Roberts, 2001).

Dados estos resultados y las experiencias extras realizadas, queda pendiente seguir probando estos partidores y el protocolo en términos de sensibilidad. Quizás realizar diluciones de una muestra y determinar hasta qué grado este protocolo sigue otorgando un resultado positivo es una experiencia que se podría retomar a partir de aquí.

La experiencia de elegir un agente bacteriano, indagar sus características e investigar sobre lo que ya se ha hecho en orden de generar un diagnóstico, sin duda es útil para contemplar el marco teórico y práctico de la labor diagnóstica en un laboratorio.

El diseñar partidores haciendo uso de las herramientas tecnológicas disponibles y utilizarlos en una experiencia real constituye una “bajada a tierra” bastante necesaria para saber en qué terreno se mueve el Médico Veterinario en el área diagnóstica hoy.

El hecho de haber diseñado un “método propio”, pero más aún que los resultados hayan sido concordantes con lo esperado, permitiéndonos identificar al agente propuesto, es muy enriquecedor tanto como ejercicio académico, pero también como herramienta concreta que, como ya se mencionó, incluso ya fue utilizado en una oportunidad en el laboratorio.

Así, de esta manera se ha implementado en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal, un protocolo de PCR en su variante semianidada que puede ser utilizado tanto para el diagnóstico de muestras sospechosas, como también para futuras memorias de título de otros estudiantes.

CONCLUSIONES

Los partidores diseñados permitieron originar bandas de ADN únicas y nítidas del tamaño esperado tanto en la PCR1 (362 pb) como en la PCR 2 (170 pb). La presencia de estos fragmentos sugiere, aunque no garantiza, la presencia del gen *flaA* en las cepas. Por esta razón, se hizo necesaria la secuenciación nucleotídica, procedimiento que permite confirmar que el fragmento sintetizado corresponde al gen en cuestión. Respecto a esto último, utilizando el programa Clustal Ω , el alineamiento del fragmento secuenciado (secuencia consenso obtenida de la muestra enviada en quintuplicado) confrontado con la secuencia aportada por el GenBank arrojó un porcentaje de identidad nucleotídica de 95,16%. Además, a través del programa BLAST se obtuvo un porcentaje de identidad nucleotídica de 95% en relación al gen de la proteína flagelina tanto *B. bronchiseptica* como de *B. pertusis*.

BIBLIOGRAFÍA

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. [en línea] <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> [consulta: 09- 05- 2017]

CANONNE, A.M.; BILLEN, F.; TUAL, C.; RAMERY, E.; ROELS, E.; PETERS, I.; CLERCX, C. 2016. Quantitative PCR and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Dogs with *Bordetella bronchiseptica* Infection. *J. Vet. Int. Med.* 30: 1204–1209.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M.C. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232-260.

CLUSTAL OMEGA. Multiple Sequence Alignment. [en línea] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> [consulta: 09- 05- 2017]

COUTINHO, T.; BERNARDI, M.; CARDOSO, M.; BOROWSKI, S.; MORENO, A.; BARCELLOS, D. 2009. Performance of transport and selective media for swine *Bordetella bronchiseptica* recovery and its comparison to polymerase chain reaction detection. *Braz. J. Microbiol.* 40: 470 – 479.

ESPINOZA, I.; MARTÍNEZ, S. 2008. *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus suis* en el complejo respiratorio porcino. *Rev. Salud Anim.* 30: 137-145

GALEZIOK, M.; ROBERTS, I.; PASSALACQUA, J. 2009. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a man with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *J. Med. Case Reports* 3:76

GROGAN, J.; LOGAN, C.; O’LEARY, J.; RUSH, R.; O’SULLIVAN, N. 2011. Real-time PCR-based detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an Irish paediatric population. *J. Med. Microbiol.* 60: 722 - 729.

HOZBOR, D.; FRANCOISE, F.; GUISO, N. 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 150: 333 – 341.

KEIL, D. J.; FENWICK, B. 2000. Bordetellosis respiratoria canina: Manteniéndose al día con un patógeno en evolución. [en línea] <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis/Carmichael/keil_es/ivis.pdf> [consulta 12-03-2017]

LANOTTE, P.; PLOUZEAU, C.; BURUCOA, C.; GRÉLAUD, C.; GUILLOT, S.; GUISO, N.; GARNIER, F. 2011. Evaluation of Four Commercial Real-Time PCR Assays for Detection of *Bordetella* spp. in Nasopharyngeal Aspirates. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3943-3946

MATTO, S.; CHERRY, J. 2005. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. Clin. Microbiol. Rev. 18: 326 – 382.

MENDOZA, N.; JARAMILLO, C.; GUHL, F.; PADILLA, J.; RENTERIA, M. 2001. Diagnóstico de Malaria por el método de la PCR anidada. Biomed. 21:320-327.

MOLINA, G.; ROSALES, M.; BARCENAS, G. 2006. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. J. Vet. México. 37: 313 – 325.

MOCHIZUKI, M.; YACHI, A.; OHSHIMA, T.; OHUCHI, A.; ISHIDA, T. 2008. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. J. Vet. Med. Sci. 70(6): 563–569.

NICHOLSON, TL.; CONOVER, MS.; DEORA, R. 2012. Transcriptome profiling reveals stage specific production and requirement of flagella during biofilm development in *Bordetella bronchiseptica*. PLoS ONE 7(11): e49166.

OSSES, R.; DÍAZ, O.; SALDÍAS, F. 2010. Infección por *Bordetella pertussis*: Una causa emergente de tos prolongada en adolescentes y adultos. Rev. chil. enferm. respir. 26: 30-36.

REGISTER, K.; NICHOLSON, T. 2007. Misidentification of *Bordetella Bronchiseptica* as *Bordetella pertussis* using a newly described realtime PCR targeting the pertactin gene. J. Med. Microbiol. 50: 1608-1610.

TATTI, KM.; SPARKS, K.; BONEY, K.; TONDELLA, ML. 2011. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens J. Clin. Microbiol. 49: 4059 - 4066.

TATTI, KM.; TONDELLA, ML. 2013. Utilization of Multiple Real-Time PCR Assays for the Diagnosis of *Bordetella* spp. in Clinical Specimens. Methods Mol. Biol. 943: 135-47.

WINSTANLEY, C.; MORGAN, W. 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. Microbiol. 143: 3071-3084.

Anexo 1: Secuencia nucleotídica del gen *flaA* de *Bordetella bronchiseptica* (Genbank, número de acceso: L13034.1)

```
1  TGC GGGGACA GGCACCTGCC CCATCTCCCC CCGCCGCACG ACGCCTGTCC GCAGGGGGAC
61  TGGCGCCTGC CCTATCCCGC CCGCGCCGCA CGGACGCCTG TCCCCGCAGG AACATGCCCT
121 TTGCCGCCAG ATTCCCCCGC ACATTTCCGA ACTTCACTTT TTTTGCTTAA GTCCGTGCGA
181 AACCTGCCGT AATCCAGGCA ACAAAGGAAA TCGCGGCGCT GTGCAAGCGA AAGTCCGATG
241 TTACAGATGG GCGGCCTAGC TGCCCGGTTT GAAGAAGCCT TTCTCTCTTG GGAGCCTCAA
301 CATGGCTGCA GTCATCAATA CCAACTACTT GTCGCTGGTT GCCCAGAACA ACCTGAACAA
361 GTCCCAATCG GCCCTGGGTA GCGCCATCGA GCGCCTGTCTG TCGGGTCTGC GCATCAACAG
421 CGCCAAGGAC GACGCGGCCG GCCAGGCCAT CGCCAACCGC TTCACCGCCA ACGTCAAGGG
481 CCTGACCCAG GCTGCCCGCA ACGCCAACGA CGGCATCTCG ATCGCCGAGA CGACCGAAGG
541 CGCGCTGAAC GAAATCAACA ACAACCTGCA GCGCATCCGC GAACTGACGG TTCAGGCCTC
601 CAACGGCACG AACTCGGCTT CGGACATCGA CTCGATCCAG CAGGAAGTCA ACCAGCGCCT
661 GGAAGAAATC AACC GCATCG CCGAGCAGAC CGACTTCAAC GGCATCAAGG TCCTGAAGTC
721 CAACGCCACC GACATGACCC TGTCGATCCA GGTCGGCGCC AAGGACAACG AAACGATCGA
781 TATCAAGATC GATCGCAACT CGAACTGGAA CCTGTATGAC GCCGTGGGCA CCGTCCCGGG
841 CGGCACGGTC AACGGCGAGG CTCGCACCGT CAACGCGCTG GGCTTTGACG TGCTGTGCGC
901 CGTCACGACC ACCATCGCTT CCGACACCGT GACCTTCGAC GCCGCCGTGG CGGCCGTGA
961 ACAGGCCGCT GGCGCCGCCG TAGGCGACGG CAGCGTCGTC TCGTACGGCG ATACCGCCAA
1021 CCCGCAATAC GCGGTCGTGG TCGACAATGC CGGCACGATG ACCTCGTACG CCCTGACCTT
1081 CGACAAGGAC GGCAAGGCCG CCCTGGGCGA CCAGCTGGGT GCCGTGCGCT CGCAGGCTGC
1141 GGAAGCCGCC GTCGGTACCA ACGACGTCGC TGCCGGCGCC AACGTCACCG TGTCCGGCGG
1201 CGCCGCCGAC GCGCTGTCCA AGCTGGACGA CGCCATGAAG GCCGTGGACG AACAGCGCAG
1261 CTCGCTGGGC GCGATCCAGA ACCGTTTCGA ATCGACCGTT GCCAACCTGA ACAACACGAT
1321 CACGAACCTG TCAGCCGCCG GTTCGCGCAT CGAAGATTCG GACTACGCGA CCGAAGTGTC
1381 GAACATGACC AAGAACCAGA TCCTGCAACA GGCTGGCACC TCGGTCCTGG CCCAGGCCAA
1441 CCAAGTCCCG CAAAACGTCC TGTCGCTGCT GCGCTAAGCA TCGGCACACC CCGGGCGGGC
1501 ACAACCCGCC CGGGGCCATG GCAGTACGTA CGCCCGGCCG CCTCACCGCG CCGGGCGTTT
1561 TTGCGTCCGG CG
```

Anexo 2: Diseño de los partidores. Programa *on line* Oligoperfect™

a) Partidores P1 y P2

Target Sequence:

```

1   TCCGGGGACAGGACCTGCCCCATCTCCCCCGCCGACGACGCGCTGTCCGGCAGGGGGACTGGCGCCTGCCCTATCCGCCCCGCCCCGACGGACGCGCTG
101  TCCCCCGCAGGACATGCCCTTTGCCGCCAGATTCCCCCGCACATTTCCGAACTTCACTTTTITTTGCTTAGTCCGTCGCCAACCCTGCCGTTATCCAGGCA
201  ACMAAGGAAATCCCGGGGCTGTGCCAAGCGAAATCCGATGTTCAGATGAGCGCCCTTAGCTGCCCGTTTGAAGAGGCTTTCTCTCTTGGAGGCTCCAA
301  CATGGCTGCAGTCAATCAATCCACTACTTGTGCTGGTTGCCCCAGAACACCTGAAACAGTCCCAATCGGCCCCCTGGGTAGGCGCATGGGCGCCTGTGG
401  TCGGGTCTTCCGATCAGACGCGCCAGGAGGACGCGCGCCGCCCCAGGCCATGCCAACCCTTCCACCGCCAACTCAAGGGCCCTGACCCAGGCTGCCCCCA
501  ACCGCCAACGACGCGCATCTCGATCGCCGACGACCGGAAAGGCGCCTGAAAGAAATCAACACACACCTCCAGCGCATCCGCGAACTGACGGTTCCAGGCGCTC
601  CAACGGCACGAACTCGGCTTCCGACATCGACTCGATCCAGCGAGGATCAACCCAGCGCCCTGGAGAAATCAACCCGATCGCCGAGCGAGACCG<b>ACTTCAGC</b>
701  <b>GCGATCAAGTTC</b>CTGAACTCCAAAGCCACCGACATGACCTGTGATCCAGGTCGGCGCCAGGAGCAACGAAACGATCGATCAAGATCGATCGCAACT
801  CGAACTGAACTGTATGACGCGCTGGCGACCGTCCCGGGCGCGACGCTCAACGGCGAGGCTCGCACCGTCAACGCGCTGGGCTTTSAGCTGCTGTGGGC
901  CGTCAAGCACCGCATCGCTTCCGACCGCTGACCTTCCAGCGCGCCCTGGCGCCGCTGAAACAGGCGCTGGCGCCCGCTTAGGCGACCGGAGCGCTGCTC
1001  TCGTACGGCGATACCGCCAAACCCGCAATACGCGCTGTGTGTCGACATGCCCCGACGATGACCTCGTACGCGCTGACCTCGACAAAGGACGGCGAGGGCGG
1101  CCGTGGCGACCGACTGGGTGCCCTCGCCTCGCAGGCTGGGGAGGCGCGCTCGGTCCACAGGACGCTCGCTGCCGCGCCACGCTCACCGTGTCCGGCGG
1201  CGCCCGCCAGCGCGCTGTCCAACTGACGACGCGCATGAAGGCGCTGGACGAAACGCGAGCTCGCTGGCGCGGATCCAGAACCTTTGAAATCGACCGTT
1301  GCGCAACTGAAACAGGATCGACAGGCTGTCCAGCGCGCGCTTCCGCGCATGAAATGCGACTACGCGGCGGAAATGCGAAATGACCAAGGACCGAGA
1401  TCCCTGACAGGCTGGCGCTCGCTGGCCAGGCGACCGTCCCGCAAAAGCTCCTGTGCTGCTGCGCTTAGCATCGCACACCCCGGGCGGGC
1501  ACMAACCCCGCCCGGCGCATGCGCATCGCTACGCGCGCCGCTCCAGCGCGCGCGCTTTTTCGCTCGGGC
  
```

Rank: 1 Product Length: 362 Product Region: 351-712				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> BOR 1 F	50.00	FWD	20	59.97
<input type="checkbox"/> BOR 1 R	50.00	REV	20	60.12
5' Addition	Primer Sequence			
		A C C T G A A C A A G T C C C A A T C G		
		G A C C T T G A T G C C G T T G A A G T		

b) Partidores P2 y P3

Target Sequence:

```

1   ACCTGACAGTCCCGATCGGCCCTGGGTGCGCCATCGAGCGCGCTGTGCTGGGTCTGCGCATCAACGCGCCAGGGCGACGGCGCCGCGCAGGCCAT
101  CGCCACCGGCTTACCGCCAGCTCAGGGGCTGACCCAGGCTGCCCGCACGCCACGACGGGCTCTCGATCGCCGACGACCGAGGGCGCGCTGAC
201  GAAATCAACACACACCTGCGAGCGCATCCGCGAACTGACGGTTCCAGGCTCCACGCGCACGACTCGGCTCGGACATCGACTCGATCCAGCGGAAATCA
301  ACCAGCGCTCGGAGAAATCAACCGCATCGCCGAGCGACCG<b>ACTTCAGCGGCTCAGGTT</b>
  
```

Rank: 1 Product Length: 170 Product Region: 193-362				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
<input type="checkbox"/> BOR 2 F	45.00	FWD	20	59.32
<input type="checkbox"/> BOR 2 R	50.00	REV	20	60.12
5' Addition	Primer Sequence			
		C G C T G A A C G A A A T C A A C A A C		
		G A C C T T G A T G C C G T T G A A G T		

Anexo 3: Obtención de la secuencia consenso del fragmento de 360 pb, a partir de las muestras enviadas en quintuplicado, según Clustal Ω[®]

NTV2	-----TGAAAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTTCGTCGGGTTTC	54
NTV3	----- TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTTCGTCGGGTTTC	54
NTV1	-----ACAAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTTCGTCGGG GTC	51
NTV4	-----CTGAACAAGTTCCAATCGACCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTGGTCGGGTC	55
NTV5	TGCACCTGAACAAGTCCAATCGGCCCTGAGTAGCGCCATCGGGCGCCTGTTCGTCGGGTC	60
	* **** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *	
NTV2	TGAGGATCAACAGCGCCAAGGACGACGCGACCGTCCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCG	114
NTV3	TGAGCATCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTACAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCG	114
NTV1	TGAGCATCAAGAGCGCCAAGGACAACGCGGCCGT CCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCG	111
NTV4	TGAGCATCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTCCAGGCCAACGCCAACCGCTTCACCG	115
NTV5	TGCGCATCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGCGCCAGGCCATCGCCAAACCGCTTCACGG	120
	** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *	
NTV2	CCAACGTCAAGGGCCTGACCGAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCAACTTGATCGCCC	174
NTV3	CCAACGTCAAGGGCGTGACCAAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGAACGCC	174
NTV1	CCAACGTCAAGGGCCTGACCAAGGCT GGCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGATCGCCC	171
NTV4	CCAACGTGAAGGGCCTGACCAAGGCT GCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGATCGCCC	175
NTV5	CCAACGTCAAGGGCCTGACCCAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTCGATCGCCC	180
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
NTV2	AGACGTCCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAACAACAAGATGCAGCGCATCCGCGAACTGA	234
NTV3	AGACGTCCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAAGAACAACATGCAGCGCATCCGCGAACTGA	234
NTV1	AGACGTCCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAACAACAACATGCAGGGCATCCGCGAACTGA	231
NTV4	AAACGACCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAACAACAACATGCAGCGCATCCGCGAACTGA	235
NTV5	AGACGACCAAGGCGGGCTGACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGCATCCGCGAACTGA	240
	*** ** ***** ** * ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
NTV2	CGGTTCAAGTCTCCAACGGCAGTACTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGGAGAAAG	294
NTV3	CGGTTCAAGTCTCCAACGGCAGTACTCGGCTTCGGACATCGACTCGAGCCAGCAGAAAG	294
NTV1	CAGTTCAGGTCTCCAACGGCAGTACTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGCAGAAAG	291
NTV4	CGGTTCAAGTCTCCAACGGCAAGAACTCGGCTTCGGACATGGACTCGATCCAGCAGAAAG	295
NTV5	CGGTTCAAGGCTCCAACGGCACGAACTAGGCTGCGGACATCGACTCGATCCAGCAGAAAG	300
	* ***** * ** * ***** * ** * ***** ***** ***** ***** ***** *****	
NTV2	TCAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACATCATCGCCGAGCAGTCCGACTTCAACGGCA-TC	353
NTV3	TCAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACCTCATCACCAGCAGTCCGACTTCAACGGCA-TC	353
NTV1	TGAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACCT CATCGCCGAGCAGTCCGACTTCAACGGCA -TC	350
NTV4	TCAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACCT CATCGCCGAGCAAACCGACTTCAACGGCAGT	355
NTV5	TCAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACCGCATCGCCGAGCAGACCGAATTGAGCT-----	354
	* ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *	
NTV2	AAGGTG- 359	
NTV3	AAGGTG- 360	
NTV1	AAT---- 353	
NTV4	AAGTT-- 360	
NTV5	-----	

Secuencia consenso.

>NTV6
TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTTCGTCGGGTCTGAGCATCAACAGCGCCAAGGACGACG
CGGCCGTCCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCGCCAAGCTCAAGGGCCTGACCAAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCA
TCTTGATCGCCAGACGTCCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAAGAACAACATGCAGCGCATCCGCGAACTGACAGTTCAGG
TCTCCAACGGCACGTACTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGCAGAAAGTCAACCAGCGCCTGGAAGAAATCAACCCAT
CGCCGAGCAGTCCGACTTCAACGGCA

Anexo 4: Resultado ingreso de secuencia consenso al programa *on line* BLAST

BLAST®
Basic Local Alignment Search Tool

Home
Recent Results
Saved Strategies
Help

[Edit and Resubmit](#) | [Save Search Strategies](#) | [Formatting options](#) | [Download](#)

NTV6

Other reports: [Search Summary](#) | [Taxonomy reports](#) | [Distance tree of results](#)

Graphic Summary

Distribution of 14 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40	40-50	50-80	80-200	>=200
-----	-------	-------	--------	-------

Query

Descriptions

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"/> Bordetella bronchiseptica 253 complete genome	549	549	100%	6e-153	95%	HE965806.1
<input type="checkbox"/> Bordetella bronchiseptica MO149 complete genome	549	549	100%	6e-153	95%	HE965807.1
<input type="checkbox"/> Bordetella pertussis 18323 complete genome	549	549	100%	6e-153	95%	HE965805.1
<input type="checkbox"/> Bordetella pertussis CS, complete genome	549	549	100%	6e-153	95%	CP002695.1
<input type="checkbox"/> Bordetella bronchiseptica strain RB50, complete genome; segment 8/16	549	549	100%	6e-153	95%	BX640444.1
<input type="checkbox"/> Bordetella parapertussis strain 12822, complete genome; segment 5/14	549	549	100%	6e-153	95%	BX640427.1
<input type="checkbox"/> Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genome; segment 3/12	549	549	100%	6e-153	95%	BX640413.1
<input type="checkbox"/> Bordetella bronchiseptica flagellin (flaA) gene, complete cds	549	549	100%	6e-153	95%	L13034.1
<input type="checkbox"/> Bordetella parapertussis Bpp5 complete genome	538	538	100%	1e-149	94%	HE965803.1
<input type="checkbox"/> Bordetella bronchiseptica strain SB283 flagellin gene, partial cds	536	536	97%	4e-149	95%	AF232941.1
<input type="checkbox"/> Bordetella bronchiseptica strain SB22 flagellin gene, partial cds	536	536	97%	4e-149	95%	AF232939.1
<input type="checkbox"/> Bordetella bronchiseptica strain SB521 flagellin gene, partial cds	525	525	97%	9e-146	94%	AF232940.1
<input type="checkbox"/> Thiobacillus denitrificans ATCC 25259, complete genome	111	111	55%	3e-21	77%	CP000116.1
<input type="checkbox"/> Chromobacterium violaceum ATCC 12472, complete genome	73.1	73.1	60%	1e-09	73%	AE016825.1

Bordetella bronchiseptica 253 complete genome

Sequence ID: [emb|HE965806.1](#) Length: 5264383 Number of Matches: 1Range 1: 368325 to 368676 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
549 bits(297)	6e-153	334/352(95%)	1/352(0%)	Plus/Plus

Features: [flagellin](#)

Query 1	TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTCGTGGGTCTGAGCA	60
Sbjct 368676	TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGGGTAGCGCCATCGACCGCCTGTCGTGGGTCTGCGCA	368617
Query 61	TCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCGCCAACG	120
Sbjct 368616	TCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCGCCAACG	368557
Query 121	TCAAGGGCCTGACCAAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGATCGCCAGACGT	180
Sbjct 368556	TCAAGGGCCTGACCCAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGATCGCCAGACGA	368497
Query 181	CCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAAGAACAACATGCAGCGCATCCGCGAACTGACAGTTC	240
Sbjct 368496	CCGAAGGCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGCATCCGCGAACTGACGGTTC	368437
Query 241	AGGTCCTCAACGGCACGTAICTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGCAGAAAAGTCAACC	300
Sbjct 368436	AGGCCTCCAACGGCACGAACTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGCAGGAAAGTCAACC	368377
Query 301	AGCGCCTGGAAGAAATCAACC-CATCGCCGAGCAGTCCGACTTCAACGGCAT	351
Sbjct 368376	AGCGCCTGGAAGAAATCAACCGCATCGCCGAGCAGACCGACTTCAACGGCAT	368325

Bordetella bronchiseptica MO149 complete genome

Sequence ID: [emb|HE965807.1](#) Length: 5091817 Number of Matches: 1Range 1: 2802984 to 2803335 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
549 bits(297)	6e-153	334/352(95%)	1/352(0%)	Plus/Plus

Features: [flagellin](#)

Query 1	TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGTGTAGCGCCATCGACCGCCTGTCGTGGGTCTGAGCA	60
Sbjct 2802984	TGAACAAGTTCCAATCGGCCCTGGGTAGCGCCATCGAGCGCCTGTCGTGGGTCTGCGCA	2803043
Query 61	TCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCGCCAACG	120
Sbjct 2803044	TCAACAGCGCCAAGGACGACGCGGCCGTCAGGCCATCGCCTACCGCTTCACCGCCAACG	2803103
Query 121	TCAAGGGCCTGACCAAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGATCGCCAGACGT	180
Sbjct 2803104	TCAAGGGCCTGACCCAGGCTGCCCGCAACGCCAACGACGGCATCTTGATCGCCAGACGA	2803163
Query 181	CCGAAGGCGCGCTCAACGAAATCAAGAACAACATGCAGCGCATCCGCGAACTGACAGTTC	240
Sbjct 2803164	CCGAAGGCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGCATCCGCGAACTGACGGTTC	2803223
Query 241	AGGTCCTCAACGGCACGTAICTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGCAGAAAAGTCAACC	300
Sbjct 2803224	AGGCCTCCAACGGCACGAACTCGGCTTCGGACATCGACTCGATCCAGCAGGAAAGTCAACC	2803283
Query 301	AGCGCCTGGAAGAAATCAACC-CATCGCCGAGCAGTCCGACTTCAACGGCAT	351
Sbjct 2803284	AGCGCCTGGAAGAAATCAACCGCATCGCCGAGCAGACCGACTTCAACGGCAT	2803335