



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Detección del gen que codifica a la Pertactina de
Bordetella bronchiseptica empleando la reacción en
cadena de la polimerasa (PCR).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

HECTOR MARDUCK GONZALEZ MOTA

ASESORA:

Dra. Gabriela Barcenas Morales



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Detección del gen que codifica a la Pertactina de Bordetella bronchiseptica empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

que presenta el pasante: Héctor Marduck González Mota
con número de cuenta: 300006283 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de octubre de 2009.

PRESIDENTE	Dra. Gabriela Barcenás Morales	
VOCAL	MVZ. Angel G. Martínez Sosa	
SECRETARIO	QFB. Dulce María Ruvalcaba Sil	
PRIMER SUPLENTE	MC. Ana Laura Vázquez Martínez	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Maritere Domínguez Rojas	

DEDICATORIAS

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo para Cátedras de Investigación, Vinculación y Educación (PACIVE) con clave CONS-104, por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con la clave del proyecto: IN207908, y por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social con el Proyecto CONACYT con clave: SALUD-2007-C01-69001.

Quiero darle gracias primeramente a DIOS, porque el es mi fuerza para seguir adelante en todo lo que hago, y gracias a él logré salir adelante en este duro y difícil escalón que la vida me puso enfrente.

A mi mamá... gracias por ayudarme y por ser mi guía en todo momento y en todo lugar y porque parte de mi trabajo de tesis se lo debo a ella, por ser una gran persona, una excelente madre y un gran ejemplo a seguir; gracias por cada momento y cada instante que estuviste y que estarás conmigo; gracias por hacerme un hombre de bien... sin ti no lo hubiera logrado; gracias por ser mi madre

A mi papá... porque sin su sustento y apoyo no hubiese podido salir adelante con mi carrera y mucho menos con mi trabajo de tesis, porque sin sus muchos o pocos consejos no regresaría al buen camino y porque simplemente se que cuento con él cuando más lo necesite; gracias por todo y espero estén conmigo por mucho tiempo más; gracias por ser mi papá.

A mis hermanos Charlie y Samantha... por ser mis estupendos compañeros en la vida y porque con la simpleza de unas palabras lo resuelven todo, gracias por su apoyo incondicional y por soportarme toda su vida... gracias hermanos.



A mis abuelos Ignacio y Ana María, porque aunque ya no estén conmigo se que me estarán cuidando en donde quiera que se encuentren.

A mi asesora, la Dra. Gabriela Barcenas Morales, por haberme ayudado con mi trabajo y por ser una gran mentora que me ofreció mucho de su persona para poder salir adelante.

A mis amigos de la Facultad, a Dalila, Carmen, José (negro), Itzmel, Marco, Raquel, Maru, Carlangas, gracias por su amistad y a todos los que se me pasaron también muchas gracias por compartir tantos momentos juntos.

Gracias a Guillermo y Martha, mis amigos de la secundaria a quienes todavía veo y que me conocen muy bien, con los cuales he pasado momentos inolvidables. Gracias a todas aquellas personas que compartieron conmigo un poco de mi ser, como Joaquín, y a muchas otras más (por si olvidé alguno). Gracias a Isabel y a Samantha, compañeras de trabajo y amigas que la vida me dio oportunidad de conocer.

Gracias a mi madrina Maria Luisa por apoyarme en mi graduación y por ser una persona importante en mi infancia.

Gracias a mi Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haberme formado como profesionista y por darme los conocimientos necesarios para triunfar en el mundo, y que algún día regresaré todo lo que me ha dado.

...Y gracias a todos ellos por ser parte de mí y por ayudarme y acompañarme en mi largo sendero que apenas comienza... y que estoy seguro seguirán a mi lado. GRACIAS A TODOS.



Hago una mención especial a un ser humano que fue muy importante en mi formación académica y emocional... me refiero a alguien que me procura a diario en cada momento que recuerde su existencia... a una persona preparada y tenaz a la cual prometí dedicar esta tesis... a una persona muy sabia y culta... a mi tío el Maestro Juan Francisco Rodríguez Caldera que aunque ya no esta presente en cuerpo, su alma sigue viva en mis recuerdos al igual que en cada palabra que me ayudó a no errar mi camino. Desde dondequiera que estés MUCHAS GRACIAS.

INDICE

Lista de abreviaturas	VIII
Lista de tablas	X
Lista de figuras	XI
Resumen	XII
	Pag.
1. INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Generalidades del género <i>Bordetella</i>	2
1.2.1. Taxonomía	2
1.2.2. Generalidades	2
1.3. Características generales de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	5
1.3.1. Morfología y características de cultivo	5
1.3.2. Bioquímica	6
1.3.3. Epidemiología	6
1.3.4. Susceptibilidad a los antibióticos	7
1.3.5. Patología de <i>B. bronchiseptica</i>	9
1.3.6. Enfermedades	11
1.4. Pertactina	12
1.5. Aspectos generales del genoma de <i>B. bronchiseptica</i>	13
1.6. Reacción en cadena de la polimerasa	13
1.6.1. Componentes de la PCR	18
1.6.2. Electroforesis en geles de agarosa	19
2. JUSTIFICACION	20
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
4. MATERIAL Y METODOS	23
4.1. Origen, conservación y cultivo de <i>B. bronchiseptica</i>	23
4.1.1. Preparación de medios de cultivo específicos	23
4.1.2. Esterilización y conservación de los medios de cultivo	23
4.1.3. Sembrado y purificación de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	24
4.2. Cultivo de cepas Gram positivas y Gram negativas	25

4.3. Pruebas bioquímicas	25
4.3.1. Gram	26
4.3.2. Catalasa	26
4.3.3. Oxidasa	27
4.3.4. Motilidad	27
4.4. Extracción de DNA por el método de DNazol	28
4.5. Cuantificación espectrofotométrica de DNA	29
4.5.1. Esterilización de materiales y preparación del espectrofotómetro	29
4.5.2. Preparación de diluciones y toma de lecturas	29
4.5.3. Cálculos de los valores de pureza y de concentración del DNA	30
4.6. Electroforesis para la detección de DNA íntegro en las muestras	31
4.7. Iniciadores utilizados para la realización de la PCR	32
4.7.1. Preparación y cuantificación de los iniciadores	32
4.8. Técnica de la PCR para la amplificación del fragmento del gen <i>prn</i> que codifica a pertactina de <i>B. bronchiseptica</i>	33
4.8.1. Estandarización de la PCR empleando los iniciadores para β -actina	34
4.8.2. Estandarización de la técnica de la PCR utilizando el par de iniciadores <i>prn</i> AF/ <i>prn</i> BR específicos para <i>Bordetella</i> .	36
4.8.3. Especificidad de la técnica de la PCR estandarizada	37
4.9. Electroforesis para los productos de la PCR	37
4.10. Análisis de la intensidad y peso de los productos amplificados	37
4.11. Secuenciación del producto de la PCR de <i>B. bronchiseptica</i>	38
4.11.1. Purificación del producto amplificado de <i>B. bronchiseptica</i>	38
4.11.2. Comparación de la secuencia de los productos amplificados	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Crecimiento, conservación e identificación de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	40
5.2. Pruebas bioquímicas primarias	40
5.3. Extracción y cuantificación de DNA de las cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	42
5.4. Análisis de la integridad del DNA extraído de <i>B. bronchiseptica</i>	42
5.5. Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación del fragmento del gen de β -actina.	43
5.6. Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación del fragmento del gen <i>prn</i> que codifica para Pertactina	46

5.7. Evaluación de la especificidad de los iniciadores <i>prn AF/prn BR</i>	48
5.7.1. Técnica de la PCR para verificar la especificidad del método empleado	49
5.8. Secuenciación de los productos amplificados con los iniciadores <i>prn AF/prn BR</i>	50
6. DISCUSION	51
7. CONCLUSIONES	60
8. ANEXO	61
9. BIBLIOGRAFIA	63

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B. b.</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
BG	Beagle
BHI	Agar Infusion cerebro corazón
BrEt	Bromuro de Etidio
BrK	Proteína de resistencia al suero
Bvg	Serotipo de <i>Bordetella</i>
C, T, G, A	Citosina, Timina, Guanina, Adenina (respectivamente)
D.O.	Densidad óptica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
DNT	Toxina dermonecrótica
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EE UU	Estados Unidos
ELISA	Immunoensayo asociado a enzimas (Enzime Linked Immuno Sorbent Assay)
<i>Et al</i>	Del latín “y otros”
FIM	Fimbrias
gr	Gramos
g	Gravedades
HAF	Hemaglutinina filamentosa
Ig	Inmunoglobina
kDa	KiloDaltones
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MVZ	Médico veterinario zootecnista
ND	No disponible
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>prn</i>	Gen de Pertactina
<i>PRN</i>	Pertactina
RAP	Rinitis atrófica porcina
RGD	Dominio de Arginina-Glicina-Asparagina
R-L	Regan-Lowe
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Acido ribonucléico ribosomal
RT	Tiempo real
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
spp	Varias especies
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
TBE	Buffer de Tris-Borato-EDTA
TE	Buffer de Tris-EDTA
Tm	Temperatura de fusión
tRNA	Acido ribonucléico de transporte
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Unidades
UA	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
Vent	Enzima utilizada en la PCR que proviene de <i>Thermococcus litorales</i>
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetros

INDICE DE TABLAS

	Pag
1.1. Características bioquímicas para la identificación de especies del género <i>Bordetella</i>	4
1.2. Cuadro de sensibilidades a los antibióticos empleados para <i>B. bronchiseptica</i>	8
1.3. Principales factores de patogenicidad de <i>B. bronchiseptica</i>	10
4.1. Características de los iniciadores <i>prn</i> AF, <i>prn</i> BR y β -actina	32
4.2. Concentración de los reactivos utilizados en la técnica de la PCR	34
4.3. Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados para la estandarización de la amplificación de β -actina	35
4.4. Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados para la estandarización de la amplificación del fragmento de Pertactina	36
5.1. Pruebas bioquímicas primarias realizadas a las cepas: LBF, Gbv3, Gbv4, Gbv8, Chel4 y Chel10	41
5.2. Pruebas bioquímicas secundarias	41
5.3. Valores de concentración y pureza de las muestras de DNA de <i>Bordetella bronchiseptica</i> obtenidas por lisis bacteriana con DNAzol	42
5.4. Condiciones de la técnica de la PCR para la amplificación del fragmento del gen de β -actina para el DNA de la cepa LBF	45
5.5. Valores de concentración y pureza de las muestras de DNA de bacterias Gram positivas y Gram negativas diferentes a <i>B. bronchiseptica</i>	49

INDICE DE FIGURAS

1.1. Proteína de 68kDa (Pertactina) sintetizada por el gen <i>prn</i> de <i>B. bronchiseptica</i>	13
1.2. Esquema de los pasos de la reacción en cadena de la polimerasa	16
1.3. Amplificación exponencial del DNA en la PCR	17
5.1. Detección del DNA íntegro de las cepas utilizadas de <i>B. bronchiseptica</i> mediante electroforesis	43
5.2. Detección del producto específico de β -actina (303 pb) evidenciado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	46
5.3. Corrimiento electroforético de la titulación de Taq polimerasa para <i>prn</i> .	47
5.4. Corrimiento electroforético de la titulación de los iniciadores para <i>prn</i>	48
5.5. Corrimiento electroforético de los productos amplificados del fragmento de β -actina y la especificidad de los iniciadores en gel de agarosa al 1.5%	50

RESUMEN

La infección con *Bordetella*, enfermedad emergente en personas inmunosuprimidas, ha tenido un gran impacto en receptores de trasplante de médula ósea y órganos sólidos. Existen técnicas de gabinete que no han demostrado la eficacia del diagnóstico adecuado, principalmente la técnica serológica de detección de galactomanano y el cultivo microbiológico de esputo e inmunohistoquímica de biopsia de tejido infectado, entre otras.

Actualmente, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el DNA de *Bordetella* ha surgido como una herramienta para el auxilio del diagnóstico, la obtención de DNA bacteriano puro y en cantidad suficiente para su estudio es imprescindible para su realización. Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo, fue lograr la estandarización de la técnica de la PCR para la detección de DNA de *Bordetella* con el propósito de ser aplicada como una prueba más para el diagnóstico temprano de enfermedades causadas por dicha bacteria.

Para lograr el propósito de este estudio, se empleó una cepa pura de la bacteria, el cual se identificó morfológicamente realizando un cultivo y microscopia óptica; asimismo se determinó la cantidad óptima del reactivo DNAzol para el pretratamiento y extracción de DNA bacteriano y se relacionó como influía con el rendimiento de DNA extraído. Además se determinaron las condiciones óptimas de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *prn* de *Bordetella bronchiseptica* empleando el par de iniciadores AF *prn*/BR *prn* y de un control interno del sistema (β actina), que sirve para observar la funcionalidad del sistema y de los reactivos, por lo que se estandarizaron 3 componentes importantes (cantidad de DNA bacteriano, concentración de Taq polimerasa y concentración de iniciadores). También se determinó el porcentaje óptimo de agarosa en los geles, con el cual se deben realizar los corrimientos electroforéticos de los productos de las PCR, para uniformar el análisis de los amplicones y finalmente con ayuda del software Kodak 1D 3.0, en los geles de agarosa se analizó la intensidad de bandas de los productos, obteniendo los valores en unidades arbitrarias de intensidad (UAI) para evaluar las mejores condiciones de amplificación.

Los resultados indicaron que las condiciones más adecuadas para la extracción de DNA bacteriano se lograron empleando 2 U de Taq polimerasa con 24 horas de crecimiento en medio de cultivo MacConkey; con respecto a las condiciones óptimas de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *prn*, estas se presentaron al utilizar 0.5 mg de DNA, 2 U de Taq polimerasa y 2 nM de iniciadores obteniéndose valores de 50 UAI, además de que se demostró como se elimina la inespecificidad de la técnica de la PCR cuando se empleó DNA de diferentes especies. Finalmente para la amplificación de un fragmento del gen de β actina (que se utilizó como control interno del sistema), se logró la obtención de productos específicos empleando 0.5 mg de DNA, 10 mM de $MgCl_2$ y 2 nM de iniciadores.

Con la realización del presente trabajo se logró el desarrollo y la implementación de la técnica de la PCR para identificar a *B. bronchiseptica*, y permitió la obtención de resultados prometedores, los cuales se podrían utilizar para el diagnóstico de la aspergilosis, y ser una valiosa aportación que permita un adecuado tratamiento en el control de la infección temprana causada por esta bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes.

Bordetella bronchiseptica (*B. bronchiseptica*) fue originalmente aislada del tracto respiratorio de perros e identificada como *Bacillus bronchicanis* por Ferry en 1910, desde entonces ha sido reconocida como un patógeno del tracto respiratorio en mamíferos. Durante 1912 y 1913 microorganismos con características idénticas descritas por el autor anterior fueron aislados de cuervos, simios y humanos; por lo que el microorganismo fue renombrado *Bacterium bronchisepticus*, más tarde en 1925 por Bergey como *Alcaligenes bronchisepticus*, en 1929 por Topley y Wilson como *Brucella bronchiseptica*, en 1935 por Haupt como *Alcaligenes bronchicanis* y en 1946 por Wilson y Miles como *Haemophilus bronchisepticus* (Portugal, 1995).

Fue colocada en el género de *Alcaligenes*, *Brucella* y *Haemophilus* debido a las características morfológicas y bioquímicas las cuales son muy similares a las presentadas por estos géneros. Finalmente esta bacteria lleva el actual nombre debido a que Moreno López describió el género ***Bordetella*** (en honor a Jules Bordet) y la especie *B. bronchiseptica*. En 1940 por primera vez se aisló *B. bronchiseptica* de pulmones neumónicos de cerdos y aunque este microorganismo es patógeno ocasional en las bronconeumonías primarias de cerdos jóvenes puede también actuar como un patógeno del tracto respiratorio inferior en animales viejos. (Pitman, 1974).

Se ha logrado aislar a *B. bronchiseptica* de la cavidad nasal, demostrando la capacidad de este microorganismo para inducir atrofia en los cornetes nasales, por lo que a partir de este momento se le consideró como patógeno primario de la rinitis atrófica porcina (RAP) (Harris, 1956).

1.2. Generalidades del género *Bordetella*.

1.2.1. Taxonomía.

La clasificación taxonómica de las bacterias del género *Bordetella* es la siguiente:

Reino: Monera.

Súper- reino: Bacteria.

Phylum: Proteobacteria.

Clase: Betaproteobacteria.

Orden: Burkholderiales.

Familia: Alcaligenaceae.

Género: *Bordetella*.

Especies: *bronchiseptica*, *pertussis*, *parapertussis*, *avium*, *hinzii*, *holmesii*, *petrii*, *trematum*.

1.2.2. Generalidades.

Las tres especies de *Bordetella* más frecuentes en el ser humano (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*), fenotípicamente hablando, se comportan de manera muy diferente. Tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* son inmóviles y *B. bronchiseptica* es una bacteria móvil. *B. parapertussis* se desarrolla en agar sangre y en agar chocolate, pero no en agar McConkey. Las colonias de *Bordetella* se desarrollan bien en agar sangre y agar McConkey, en 24 horas aparecen como colonias translúcidas, lisas e incoloras de aproximadamente 1.5 mm de diámetro. Estas bacterias poseen la característica bioquímica diferencial de convertir con rapidez el agar urea de Christensen, con la tinción de Gram, se observan como bacilos pleomorfos, Gramnegativos, entre cocoides y ovalados, y en algunas ocasiones con formas filamentosas (Koneman, 2003).

Existen en la actualidad ocho especies de *Bordetella* las cuales además de las mencionadas en el párrafo anterior tenemos las siguientes: *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii*, *B. avium*; de éstas ninguna ha sido asociada con enfermedades en

animales; sin embargo, *B. hinzii* es comúnmente aislada del tracto respiratorio de aves de corral; *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum* están asociadas con infecciones oportunistas de varios sitios del cuerpo en humanos. *B. pertusis* es un agente importante de las infecciones respiratorias crónicas en humanos (como la tos ferina), mientras que *B. parapertusis* causa infecciones respiratorias agudas en ovejas y *B. bronchiseptica* infecta a una variedad amplia de especies animales, principalmente a los caninos y a los porcinos; *B. parapertusis* y *B. bronchiseptica* han tenido poca relevancia en las enfermedades humanas, sin embargo *B. bronchiseptica* se ha aislado en exudados de pacientes con infecciones nasofaríngeas leves. Entre las enfermedades de importancia producidas por *B. bronchiseptica* destacan la rinitis atrófica y la neumonía en cerdos, la bronconeumonía en perros y la rinitis en conejos (Gyles et al. 2004) (Register, 2000).

Los miembros del género *Bordetella* metabolizan como fuente principal de carbono y energía a los aminoácidos y ácidos carboxílicos (pero no a los carbohidratos). Las reacciones alcalinas producidas por el metabolismo son con frecuencia aplicadas en medios diferenciales y pruebas bioquímicas para la posterior caracterización de las cepas de *B.* aisladas (Gyles, *Et al.*, 2004).

En la Tabla 1.1. se muestran las principales características bioquímicas de algunas de las especies del género *Bordetella*:

Tabla 1.1. Características bioquímicas para la identificación de especies del género <i>Bordetella</i>.						
Característica	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>
Catalasa	v	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	+	+	+	-
Motilidad	-	-	+	+*	+	-
Reducción de nitrato	-	-	+	-#	-	-
Ureasa	-	+ (24 horas)	+ (4 horas)	-	v	-
Desarrollo en citrato	-	+	+	+	+	ND
Pigmento marrón^o	-	+	-	-	-	+
Citrato	-	+	+	+	+	ND
Agar BG	3-6 días	1-3 días	1-2 días	2 días	2 días	2 días
Agar chocolate	-	1-3 días	1-2 días	2 días	2 días	2 días
Agar McConkey	-	-	+	+	ND	3-7 días
Agar SS	-	-	+	+	ND	ND
Agar R-L	3-6 días	1-2 días	1-2 días	1-2 días	2 días	2 días

*Movilidad más pronunciada a 25°C.

En medio suplementado con suero, tiene lugar la reducción de nitrato.

SS – *Salmonella* – *Shigella*.

R-L – Regan – Lowe.

^o En agar infusión de corazón con L-tirosina (1g/L).

ND – No disponible.

Dentro de algunas de las especies con importancia veterinaria se encuentran *Bordetella bronchiseptica* y *B. avium*, la primera especie mencionada ha sido implicada en la rinitis atrófica del cerdo, en la traqueobronquitis infecciosa canina, y en la bronconeumonía de algunas especies animales y sólo afecta a los humanos en raras ocasiones y específicamente en individuos con inmunosupresión. Por otro lado *B. avium* esta implicada en la producción de la rinotraqueítis de los pavos (Hoskins, *et al*, 1998).

1.3. Características generales de *B. bronchiseptica*.

B. bronchiseptica se aisló por primera vez en 1896 por Galli-Valerio, quien la describió nuevamente en 1908, denominándolo *Bacillus caniculae*. Por otra parte en 1901, Lignieres estudió una bacteria a la que llamó *Pasteurella canina* y planteó que era el agente etiológico del moquillo canino. En 1911 esta especie fue aislada y descrita en los EE.UU por Ferry con el nombre de *Bacillus bronchicanis*, el cual cambió en 1913 a *Bacillus bronchiseptico* y posteriormente en 1957 con la definición del género *Bordetella* en la edición del Manual Bergey de ese año formó parte de este género como *B. bronchiseptica* (Merchant y Parker, 1973).

1.3.1. Morfología y características de cultivo.

B. bronchiseptica es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como un cocobacilo Gram negativo, no produce esporas y presenta motilidad por flagelos peritricos. Crece óptimamente en aerobiosis, a temperatura de 37 +/-2 °C, pH entre 7.0 y 7.2 y medios enriquecidos con tejido o plasma. Estudios de microscopía electrónica, han mostrado flagelos en forma de triple hélice con dirección a la izquierda, de aproximadamente 13.9 nm de diámetro. El flagelo de esta bacteria mide aproximadamente de 18 – 22 nm de grosor compuesto de estructuras entrelazadas de 5 a 6 filamentos (Richter y Kress, 1967). En medio sólido crece principalmente en forma cocoide, de un tamaño de 3.0 por 0.5 µm a 5.0 por 0.4 µm; algunas formas filamentosas tienen un tamaño de 0.4 por 8.0 µm (Goodnow, 1980).

Respecto a su cultivo *in Vitro*, *B. bronchiseptica* se desarrolla en agar sangre formando pequeñas colonias grises circulares parecidas a gotas de rocío, presentando una actividad hemolítica variable en agar sangre (Biberstein, E.L., 1994) y en agar Mac Conkey se presenta como colonias pequeñas incoloras a las 24 horas y como colonias pequeñas, opacas y liláceas a las 48 horas. En medios líquidos produce turbidez uniforme dando un sedimento granular. Este cocobacilo muere en 20 minutos a la temperatura de 55°C lo que lo hace menos resistente al calor que otros bacilos Gram negativos no

esporulados. Es sensible a la luz, la desecación y a los desinfectantes ordinarios y muere por congelación (Merchant y Parker, 1973; Michel, 1982).

1.3.2. Bioquímica.

Dentro de sus características bioquímicas, una de las más notables y que la diferencia del resto de las especies que conforman el género, es su falta de acción fermentativa sobre los carbohidratos y su rápida acción sobre algunos sustratos como la urea, la cual descompone en menos de 4 horas a 37°C, gracias a la fuerte acción de la enzima ureasa, además de no producir indol y puede o no reducir los nitratos a nitritos (Griffith, Brasky and Lang, 1997).

1.3.3. Epidemiología.

B. bronchiseptica se considera un parásito del tracto respiratorio de diversas especies de animales. En 1998 McGowan describió el hallazgo del germen en hurón, mono, cabra, cobayo, conejo, gato y perro, y además dio a conocer que había aislado esta bacteria en un empleado que había manejado conejos y cobayos. En 1943, Phillips en Canadá logró aislarla en cultivo puro a partir de exudados bronquiales de cerdos (McGowan, 1998; Phillips, 1943).

Durante todos estos años de investigación de esta especie, la prevalencia de infección ha sido especialmente alta en cerdos y perros (Winsser, 1960, Smith, Baskerville y Bronthwell, 1982). Además se ha encontrado afectando otras especies como ratas, ratones, conejos y otros (Good and May, 1971; Deeb et al, 1990). También ha estado involucrada en afecciones respiratorias en personas inmunodeprimidas y convalecientes, así como en personal que ha mantenido un contacto estrecho con animales enfermos; aunque no es considerado un microorganismo zoonótico (Bauwens et al, 1992).

En cuanto a los animales de laboratorio, se ha demostrado que *B. bronchiseptica* es capaz de afectar a la inmensa mayoría de las especies, principalmente roedores, y caninos.

Su presencia influye de forma negativa en los resultados de las diferentes investigaciones en las que se emplean animales de experimentación. Por otra parte, en el ámbito pecuario se puede recalcar el impacto económico que representa la pérdida de estos tipos de animales con características de crianza (bovinos), afectando así mismo la reproducción de dichos animales, por lo cuál se consideró a esta bacteria dentro de la lista de microorganismos que afectan las condiciones de los animales de corral, además de los animales de laboratorio (roedores) (Goodnow, 1980; Kraft et al, 1994).

B. bronchiseptica es uno de los microorganismos que puede provocar enfermedades respiratorias en conejos (Deeb et al, 1990), siendo capaz de infectar a los animales, específicamente de la categoría en desarrollo, manteniéndose de forma asintomática; sin embargo, con la aparición de un estrés, ya sea de transporte, nutricional o de manipulación, se puede desatar una serie de síntomas como disnea, decaimiento, secreción nasal y/o estornudos, llegando a provocar neumonías severas e incluso la muerte si no se atiende rápidamente (Goodnow, 1980; D' Amore et al, 2000).

1.3.4. Susceptibilidad a los antibióticos.

B. bronchiseptica es susceptible a una mediana gama de antibióticos. Los aminoglucósidos (como la amikacina, gentamicina y la tobramicina) parecen ser altamente efectivos en estudios *in Vitro*; a la vez que la estreptomicina resulta ser inefectiva.

También podemos encontrar que las penicilinas, la azlocilina, mezlocilina, piperacilina y la ticarcilina (también usadas para *Pseudomonas aeruginosa*) muestran estar cerca del 100% de efectividad *in Vitro*; sin embargo, otras penicilinas como la ampicilina y la penicilina G pueden ser consideradas poco efectivas. Los datos de sensibilidades a estos antibióticos se muestran en la Tabla 1.2. (Wollfrey, *et al*, 1991).

Tabla 1.2. Cuadro de sensibilidades a los antibióticos empleados para *B. bronchiseptica*.

Agente antimicrobiano (punto máximo de susceptibilidad, microg/mL)	% de susceptibilidad o MIC90 (microg/mL) reportado por diferentes investigadores.							Woolfrey and Moody (present study), n = 12 ^h	
	Bemis et al. (11), n = 50 ^{c,d}	Fass and Barnishan (60), n = 10 ^{e,f}	Appelbaum et al. (4), n = 13 ^g	Strandberg et al. (155), n = 5 ^g	Kurzynski et al. (98), n = 11 ^g	Pijpers et al. (135), n = 20 ^g	Mortensen et al. (115), n = 48 ^g	MBD ^g	Vitek ^g
Aminoglucósidos									
Amikacina (<32)		100%		100%			100%	100%	100%
Gentamicina (<8)	98%	100%		100%			>8 [1->8]	100%	100%
Tobramicina (<8)		100%					100%	100%	100%
Penicilinas									
Penicilina (<2)	0%	0%					0%		
Ampicilina (<16)	76%	16 [16-64]				90%	>16 [4->16]		
Ticarcilina (<64)		100%					64 [≤4->64]	92%	83%
Mezlocilina (<64)		100%					16 [≤4->64]	100%	
piperacilina (<64)		100%					100%	100%	
Azlocilina (<64)							100%	100%	
Cefalosporinas									
Cefalotina (<16)	60%	100%						100%	17%
Cefazolina (<16)		64 [16-128]						0%	0%
Cefamandola (<16)		16 [16-32]							
Cefuroxima (<16)		0%					0%	0%	
Cefoperazona (<32)				100%			100%	100%	
Cefotaxima (<32)		0%					>32 [≤2->32]	0%	
Ceftacídima (<16)			100%	≥128 [4->128]			16 [2->32]	67%	
Ceftizoxima (<32)								0%	
Ceftriaxona (<32)			64 [0.5-64]	>32 [8->32]			>32 [≤0.5->32]	17%	50%
Tetracilinas									
Tetraciclina (<8)	100%	100%			0%	90%	100%	100%	100%
Doxiciclina (<8)		100%					95%		
Minociclina (<8)		100%					100%		
Quinolonas									
Ciprofloxacino (<2)					4 [1-4]	100%		100%	100%
Ofloxacino (<2)					0%	100%			
Miscellaneous									
Aztreonam (<16)			>64 [4->64]	0%					
Cloramfenicol (<16)	100%	100%				90%		100%	100%
Clindamicina (<32)		0%							
Eritromicina (<4)		8 [4-16]					>8 [1->8]		
Imipenem (<8)				100%		32 [4-32]			
Rifampicina (<2)					0%		100%	83%	67%
Trimetropima-sul	66%	0.5/95 [0.5/			82%		4/76 [≤0.5/		
fametroxazol (<2/38)		9.5-128/ 2,432]					9.5->32/ 608]		

^a Susceptibility breakpoints represent those currently recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (122) for gram-negative bacilli.

^b MICs at which 90% of strains are susceptible.

^c Number of strains tested.

^d Disk agar diffusion method.

^e Microbroth dilution method.

^f Data represent either percent susceptible or median MIC.

^g Agar dilution method.

^h The 12 strains in the present study comprised two from our own cases (cases 1 and 2); one obtained through the courtesy of J. Snell, Central Public Health Laboratory, London, England, representing case 10; three kindly supplied by W. Fredericksen, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark, representing cases 14 to 16; three obtained through the courtesy of Joel Mortensen, Philadelphia, Pa., representing strains that were thought not to be related to disease and were recovered as incidental isolates in respiratory tract specimens from children; and three referred through the courtesy of T. Kurzynski, Madison, Wis., representing incidental recoveries from human respiratory tract cultures for which clinical information was lacking.

ⁱ Vitek Automicrobic System.

1.3.5. Patología de *B. bronchiseptica* y mecanismos de infección.

La información de los cambios patológicos asociados con este microorganismo están limitados a las pruebas en estudio con animales o desde una necropsia en humanos quienes murieron por complicaciones causadas por *B. pertussis*. Sin embargo, con el paso del tiempo, las infecciones asociadas a *B. bronchiseptica* han ido en aumento (Gerlach, 2001).

El papel de *B. bronchiseptica* como la causa de infecciones respiratorias en humanos no ha sido establecida aún con certeza. Sin embargo, estudios en perros han demostrado que la infección esta limitada al árbol tráqueobronquial y está caracterizada por la adherencia y la localización de la bacteria en los cilios y en las estructuras existentes en la superficie de las células del epitelio respiratorio. La infección está acompañada por una infiltración de neutrófilos y linfocitos en la submucosa por una moderada hiperplasia en los tejidos linfoides adyacentes (Songer, *Et al.*,2005).

En el humano *B. bronchiseptica* ha demostrado tener un tropismo especial por las células del tracto respiratorio, no encontrándose en el árbol bronquial y siendo fácilmente identificable en un exudado faríngeo. Estos tropismos diferentes de *B. bronchiseptica* con otras especies de *Bordetella*. han sido relacionados con la capacidad de aglutinación de eritrocitos de una variedad de mamíferos distintos (Register, 2005).

B. bronchiseptica provoca neumonía en pacientes inmunosuprimidos. Y se ha encontrado asociado a casos de pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), manifestándose como neumonía, septicemia, entre otros (Dworkin, 1998).

A pesar de la poca diversidad genética en el género *Bordetella*, existen diferencias importantes entre cepas aisladas de este género bacteriano con referencia a la expresión de los factores de virulencia. La especie *bronchiseptica* produce varios factores de virulencia y proteínas de autotransporte, entre los que se encuentran la pertactina (*PRN*) y a la proteína de resistencia al suero (*BrK*), entre otras varias adhesinas incluyendo a la hemaglutinina filamentosa (*HAF*) y varios serotipos de fimbrias (*FIM*) que auxilian a la bacteria a adherirse a las células epiteliales del tracto respiratorio (Matoo, *et al*, 2005).

B. bronchiseptica utiliza principalmente algunos factores de virulencia (resumidos en la Tabla 1.3.), tales como la hemaglutinina filamentosa, causante de la aglutinación de los eritrocitos en la sangre, además de las fimbrias las cuales utiliza para la adherencia a las células epiteliales (Gueirard 1995). Se ha reportado que la fimbria es altamente inmunogénica e induce la síntesis de anticuerpos. Se han detectado cuatro serotipos de fimbria en el género *Bordetella* los cuales son Fim2, Fim3, FimX y FimA; estos serotipos se producen durante la fase de variación bvgAS (Mattoo, *Et al.*, 2000).

También se encuentra la enzima adenilato ciclasa, la cual suprime la producción de superóxido por parte de los macrófagos alveolares (compuesto elemental en la destrucción por fagocitosis) con el fin de eludir las defensas del hospedero. (Confer, 1982).

Tabla 1.3. Principales factores de patogenicidad de <i>B. bronchiseptica</i>.		
Factores de patogenicidad	Mecanismo de acción	Referencia
Hemoaglutinina Filamentosa	Adherencia a las células epiteliales y macrófagos (Adhesina)	Locht et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000
Fimbrias	Adherencia a las células ciliadas (adhesina)	Locht et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000
Enzima adenilato ciclasa	Impide la acción fagocítica de los (enzima extracitoplasmática)	Locht et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000
Proteína 68 kDalton (pertactina).	Impide la acción fagocítica (proteína de membrana externa)	Novotny et al, 1985; Keil and Fenwick, 2000
Citotoxina traqueal	Enzima que provoca daño celular (ciliostasis)	Locht et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000
Toxina termolábil	Produce vasoconstricción	Locht et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000
Endotoxina	Provoca pirogenicidad y shock.	Locht et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000

Se plantea que la infección por parte de *B. bronchiseptica* puede ocurrir en dos etapas fundamentales, una primera etapa (colonización) ocurre la activación de los genes de producción de la Hemoaglutinina Filamentosa (HAF), la cual en unión con las fimbrias actúan permitiendo la colonización de la bacteria en el hospedero y en una segunda etapa (daño celular) ocurre la expresión de otros genes como los de las endotoxinas, la citotoxina traqueal y la enzima adenilato ciclasa, los cuales son los causantes de los daños sistémicos en el tracto respiratorio (Bemis and Wilson, 1985; Zeligs, Zeligs and Bellant, 1986; Loch et al, 1993; Burns et al, 1993; Keil and Fenwick, 2000).

Al colonizar el tracto respiratorio, la bacteria produce endotoxinas, las cuales provocan vasoconstricción; toxinas termolábiles también son liberadas como la citotoxina traqueal, que impide la acción de la fagocitosis, pero la más importante es la toxina dermonecrótica (DNT), la cual afecta el tejido epitelial haciendo una cavidad dependiendo de la proporción de la toxina liberada. A raíz de esto, otras bacterias oportunistas del tracto respiratorio pueden colonizar estas lesiones.

1.3.6. Enfermedades.

B. bronchiseptica ha sido asociada a enfermedades respiratorias de diversos mamíferos. En el cerdo esta bacteria es considerada como el agente primario de la rinitis atrófica porcina (RAP). Esta enfermedad respiratoria es común de cerdos jóvenes puede provocar la destrucción de los cornetes nasales y tejidos asociados, muchas veces tiene una alta incidencia en neumonía y representa pérdidas significantes para la industria porcina, debido al peso reducido que presentan los animales afectados y por el costo en la profilaxis y el tratamiento de los animales enfermos (Ackermann, M. R., et al.1997)

Además *B. bronchiseptica* es considerada el agente primario de la traqueobronquitis canina, enfermedad altamente contagiosa la cual afecta a perros de cualquier edad y esta caracterizada por acumulación de moco excesivo en la traquea, vómito, pérdida de peso y lesiones pulmonares (Kadlec K, et al, 2005).

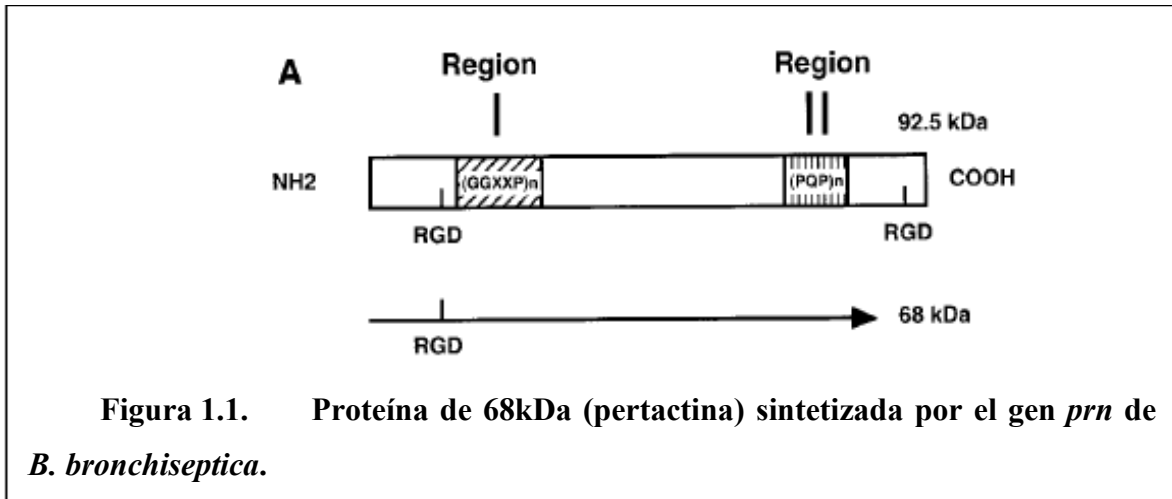
1.4. Pertactina.

La pertactina (*PRN*) pertenece a una familia de proteínas de autotransporte, siendo una proteína altamente inmunogénica, que se encuentra específicamente en la membrana de las especies de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, la cual tiene un peso de 69kDa, 70kDa y 68kDa, respectivamente.

El gen responsable de la producción de pertactina se conoce como *prn*, el cual está compuesto de dos regiones designadas como región I y región II. Para que se pueda iniciar la producción de PRN, en el gen *prn* se han encontrado dos componentes los cuales forman un sistema de transducción de señales; estos son BvgA, que funciona como regulador y BvgS como sensor. La región II tiene propiedades antigénicas para inducir inmunidad protectora; inmediatamente después del dominio RGD (secuencia de Arginina-Glicina-Asparagina y que es clave en el reconocimiento de las proteínas de la matriz extracelular) se encuentra la región I, que está involucrada en la adherencia de la bacteria a la célula hospedera. La PRN ha descrito también su actividad como inmunógeno protectoro en el cerdo y en modelos experimentales (Kobisch, *et al*, 2006).

La pertactina de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* posee un dominio RGD, el cual está compuesto por una triada de aminoácidos, los cuales son la arginina, la glicina y la asparagina. Este dominio participa en la adhesión a células epiteliales, mediante la interacción del mismo con un receptor de las células diana llamado integrina (Register, 2001; Bassinet L, y cols., 2000).

Con el paso del tiempo, los estudios relacionados con *B. bronchiseptica* han reportado polimorfismos en la pertactina en dos regiones; dichos cambios en el gen le han conferido a la bacteria una mayor adherencia a las células blanco cuando la pertactina es producida. En la Figura 1.1. se muestra el esquema del gen de la pertactina y las regiones que sufren polimorfismos (Boursaux, 2000).



1.5. Aspectos generales del genoma de *B. bronchiseptica*.

B. bronchiseptica tiene un cromosoma circular el cual contiene aproximadamente 5, 338, 400 pares de bases. Contiene uno o más plásmidos de mediano o gran tamaño dependiendo de la cepa, del cual se desconoce su función. Un pequeño plásmido termolábil se encuentra en la mayoría de las cepas y se cree que es fundamental para la resistencia a los antibióticos (Parkhill, 2003). Del total del cromosoma circular, el 68.07% se compone de Citosinas y Guaninas, y además contiene 3 operones que se utilizan para rRNA, así como 55 operones del tipo tRNA. Dentro del genoma completo de *B. bronchiseptica*, unos 3000 genes son compartidos con *B. pertussis* y con *B. parapertussis* los cuales codifican principalmente para su cápsula.

1.6. Reacción en cadena de la polimerasa.

Esta técnica fue desarrollada en el año de 1980 por Kary Mullis perteneciente a la *Cetus Corporation* en California SA. Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo; puesto que las temperaturas del ciclo (95° C en las fases de desnaturalización del DNA) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína; actualmente se emplean DNA polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los

seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy reactivas (Taq) con otras con corrección de errores (Pfu, Vent). Se recomienda utilizar entre 1 y 1.25 U de enzima en 50µl de reacción. Incrementos en la cantidad de enzima y del tiempo de extensión genera la aparición de artefactos debido a la actividad exonucleasa intrínseca 5' → 3' de la enzima.

Los pasos para la realización de la PCR son los siguientes:

a) Inicialización, en este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C ó 98°C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para DNA polimerasas que requieran activación por calor.

b) Desnaturalización, el DNA se desnaturaliza separando las dos hebras de las cuales está constituido. Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de Guaninas+Citocinas que tenga la hebra de DNA, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

c) Alineamiento, el iniciador se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de DNA (unión DNA-DNA) sólo se forman cuando la secuencia de los iniciadores es muy similar a la secuencia del DNA molde en dirección 5' → 3'. Esta etapa requiere una disminución rápida de la temperatura por debajo de la T_m (temperatura de fusión) de los oligonucleótidos de forma que suceda la hibridación. El intervalo de temperatura más usado es de 37 a 65 °C y se mantienen entre 10 y 20 segundos (puede ser más largo dependiendo del tamaño de los oligonucleótidos).

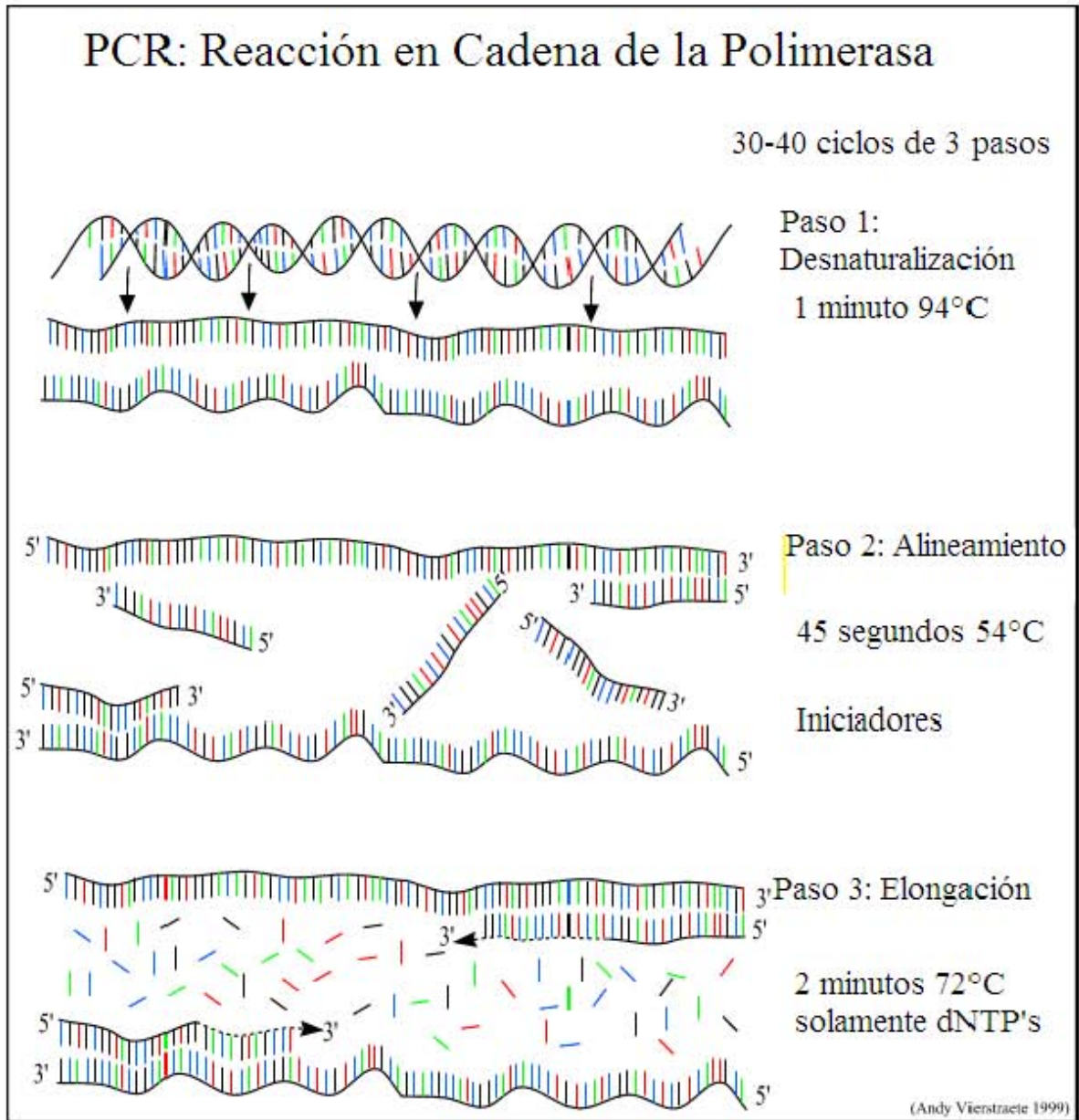
La temperatura de fusión (T_m , *del ingles, melting temperature*), se relaciona directamente con la desnaturalización y depende del contenido en pares de bases C≡G o A=T de la cadena de DNA. Cuando los pares de bases C≡G son mas abundantes que las bases A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C≡G es más fuerte que en A=T. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el iniciador, comenzando así a sintetizar DNA. Los iniciadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

d) Elongación, en esta etapa actúa la DNA polimerasa, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del iniciador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo DNA. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la DNA polimerasa que se utilice. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80°C (comúnmente 72°C). El tiempo de elongación depende tanto de la DNA polimerasa usada como de la longitud del fragmento de DNA que se va a amplificar (Karp, G., 2006).

e) Elongación final, etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier DNA de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

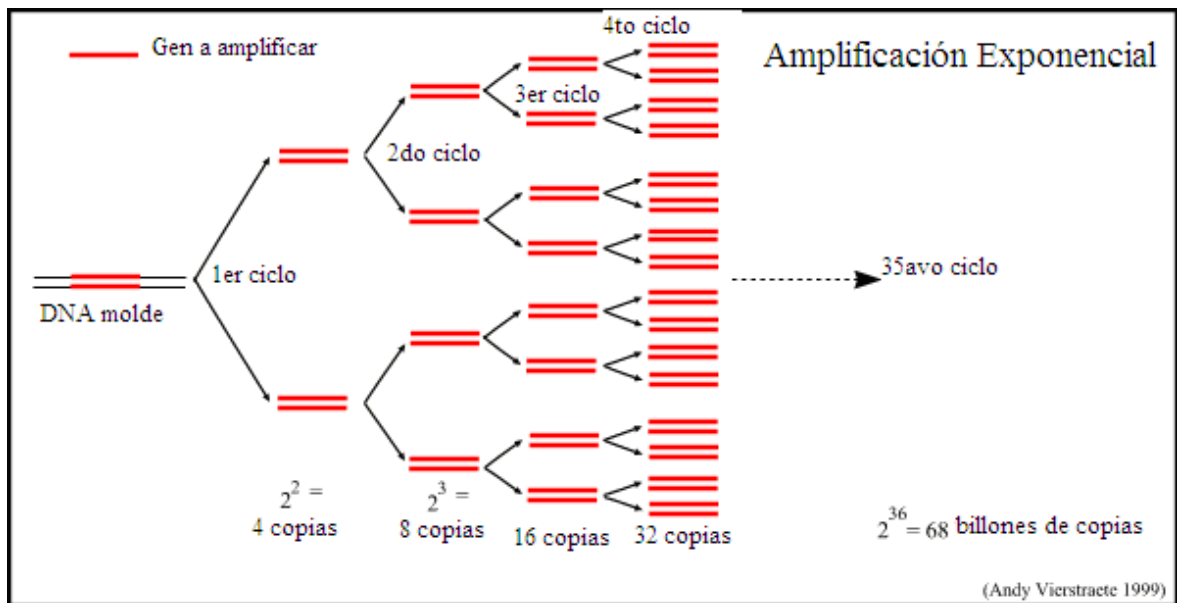
En la Figura 1.2., se muestran resumidos los pasos en los que consiste la técnica de la PCR.

Figura 1.2. Esquema de los pasos de la reacción en cadena de la polimerasa.



La amplificación exponencial del DNA que se lleva a cabo cuando se realiza la técnica de la PCR se esquematiza en la Figura 1.3.

Figura 1.3. Amplificación exponencial del DNA en la PCR.



La amplificación del material genético se dice que es de manera exponencial porque a partir de una doble cadena de DNA se forman 2 cadenas iguales en un primer ciclo; posteriormente estas dos cadenas de DNA se separan y forman a su vez 8 cadenas iguales de DNA, para después separarse y formar 16 cadenas, siendo esto de manera sucesiva, como se muestra en la figura 1.3.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos de temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico a alta temperatura ($> 90^\circ \text{C}$), y seguido por otro choque al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción, y la temperatura de unión de los iniciadores.

1.6.1. Componentes de la PCR.

Para realizar la técnica se necesitan los siguientes reactivos y materiales:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), que es el sustrato para polimerizar nuevo DNA.
- Dos iniciadores, que son cada uno, complementarios a una de las dos hebras del DNA. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia (no más de 4 Kb), estos iniciadores delimitan la zona de DNA a amplificar. Se recomienda que el contenido de G+C oscile entre el 40 y 60%, evitando la presencia de regiones con largas secuencias de una sola base, así como secuencias que puedan producir estructuras secundarias internas. Los extremos 3' no deben ser complementarios, para evitar la formación de dímeros. Se debe evitar además la presencia de tres G ó C cerca del extremo 3'
- Iones divalentes, se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagénesis de DNA mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de DNA. La concentración de magnesio es un factor crucial que afecta el funcionamiento de la enzima Taq DNA polimerasa. Su carencia puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad de la enzima y puede incrementar las uniones inespecíficas. Por tales razones resulta imprescindible determinar la concentración óptima de esta sal, la cual generalmente se encuentra en el rango de 1.5 a 3.0 mM.
- Iones monovalentes, como el potasio (K^+).
- Una solución amortiguadora que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa. El buffer tris es el encargado de regular el pH de la reacción, el cual afecta la actividad y fidelidad de la enzima. Moderadas concentraciones de KCl pueden incrementar la actividad de la enzima de un 50 a un 60% por encima de la actividad en ausencia de esta sal, cuya concentración óptima a emplear es de 50mM.

- DNA polimerasa, o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70° C (la más común es la Taq polimerasa).
- DNA molde, que contiene la región de DNA que se va a amplificar.
- Termociclador, el cual es el equipo que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo, las cuales son: desnaturalización, alineamiento y elongación o extensión.

1.6.2. Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis se refiere a la fuerza electromotriz que es empleada para desplazar las moléculas a través del gel. Al situar las moléculas en el gel y aplicar una diferencia de potencial eléctrico, las moléculas se mueven a diferentes velocidades, hacia el cátodo, si están cargadas positivamente, y hacia el ánodo, si están cargadas negativamente.

En relación con los ácidos nucleicos la dirección de migración es del electrodo negativo al positivo, y esto es debido a la carga negativa presente en el esqueleto azúcar-fosfato. En los fragmentos de DNA dobles (con estructura de doble hélice) la velocidad de migración es inversamente proporcional a su tamaño. En fragmentos simples de DNA (una sola cadena) y RNA, dichas moléculas tienden a plegarse de forma compleja y a migrar de forma más complicada, según la estructura terciaria formada tras el plegamiento. Sin embargo, compuestos que puedan romper los enlaces de puente de hidrógeno, como el hidróxido de sodio o la formamida, son empleados para desplegar las moléculas plegadas y permitir que la velocidad de migración dependa únicamente del tamaño y no de la estructura formada tras el plegamiento. El análisis de bandas se revela posteriormente con bromuro de etidio, el cual cuando se expone a luz ultravioleta, emite una luz roj-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de DNA. Este efecto es debido al aumento de la hidrofobia del medio, y no a la rigidificación del anillo bencénico, no estando éste entre pares de bases del DNA. Adicionalmente puede utilizarse una secuencia complementaria de un DNA como sonda para buscar un fragmento específico en el patrón de bandas (Luque, J., 2001).

2. JUSTIFICACION

Bordetella bronchiseptica es una bacteria que ha tenido una gran importancia en el área veterinaria, ya que afecta a diversas especies de mamíferos. Algunos padecimientos clínicos, como la rinitis porcina clásica o también conocida como rinitis atrófica, que afecta de manera importante a cerdos jóvenes o traqueobronquitis en los ejemplares caninos han hecho de esta bacteria un agente causal muy común en estos animales (Carter G.R. et al., 1994).

B. bronchiseptica tiene como uno de sus factores de virulencia a la Pertactina, que es una proteína de 68kDa la cual es producida a partir del gen conocido como *prn* y que le sirve como una adhesina en el proceso de colonización del tracto respiratorio en los mamíferos. Con el paso del tiempo, *B. bronchiseptica* se ha convertido en una bacteria de interés, ya que se ha encontrado asociada a infecciones de nivel broncotraqueal, pudiendo ser recolectada y aislada mediante un exudado faríngeo de rutina en infecciones respiratorias que van desde la faringitis, hasta una neumonía en pacientes inmunosuprimidos (Llombart, 2006).

En el presente trabajo se utilizará una técnica de biología molecular, en específico la PCR, como una herramienta para la detección del gen *prn*, el cual codifica para la proteína pertactina que se puede encontrar en cepas de *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis*, con el fin de llevar a cabo (de forma temprana, rápida y específica), la caracterización de este factor de virulencia en cepas recién aisladas, lo que permitirá dar un criterio de soporte más a la identificación de cepas de dicha bacteria.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Si se logra estandarizar la técnica de la PCR específicamente para detectar una región del gen *prn*, entonces se podrá detectar de manera temprana a *Bordetella bronchiseptica*, ayudando al diagnóstico oportuno de dicha bacteria tanto en el ámbito veterinario como en el humano.

Objetivo general

Estandarizar la técnica de la PCR específica para *B. bronchiseptica*, amplificando una región del gen *prn*, que nos permita identificar a la bacteria en cuestión de manera oportuna, con el fin de tener una herramienta de fácil disponibilidad para futuras investigaciones en el ramo y para el diagnóstico clínico, tanto en el ámbito humano como en le veterinario.

Objetivos particulares

- Cultivar cepas de *B. bronchiseptica* obtenidas a partir de bovinos y conservadas en crioviales a -96°C , mediante el uso de medios de cultivo selectivos para su posterior identificación.
- Identificar, mediante pruebas primarias y secundarias, a *Bordetella bronchiseptica*, tomando a la cepa LBF como control positivo.
- Extraer y purificar DNA de las cepas cultivadas de *Bordetella bronchiseptica*, mediante el uso de una solución de lisis (DNAzol), para su posterior cuantificación mediante espectrofotometría UV.

- Verificar la integridad del DNA extraído, mediante un corrimiento electroforético en geles de agarosa.
- Realizar la estandarización de la técnica de la PCR encontrando las condiciones de trabajo y concentraciones de los reactivos óptimas para una buena amplificación específica para la porción del gen *prn*.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1. Origen, conservación y cultivo de *B. bronchiseptica*.

Para la realización de la parte experimental del presente trabajo, se utilizaron cepas de *B. bronchiseptica* de referencia (ATCC 10580 y 4617) y cepas aisladas de ejemplares bovinos de aproximadamente 6 meses de edad, dichas cepas se encuentran conservadas en viales con una solución crioprotectora que contiene suero fetal bovino e infusión de cerebro-corazón en una proporción volumen/volumen de 1 a 1 (con un volumen total de 2 mL por vial) a una temperatura de -96° C en un tanque con nitrógeno líquido. Los códigos empleados para la identificación de éstas cepas fueron las siguientes: LBF, Gbv 03, Gvb 04, Gvb 08, Chel4 y Chel10. Para confirmar la identidad de estas cepas se llevaron a cabo solamente las pruebas bioquímicas primarias, considerando que en un trabajo de tesis concluido anteriormente en el laboratorio se realizó la identificación completa de éstas cepas (Martínez y Francisco, 2008).

4.1.1. Preparación de medios de cultivo específicos.

Para la siembra de *B. bronchiseptica* se prepararon medios de cultivo sólidos en cajas Petri de la siguiente manera: para el agar MacConkey, se pesaron 54g del agar por cada litro de agua destilada utilizada, se colocó el medio en un matraz Erlenmeyer de un litro y se disolvió completamente; para el agar BHI se pesaron 32g del agar por cada litro de agua destilada utilizada, de igual forma se disolvió todo el medio en un matraz Erlenmeyer de un litro.

4.1.2. Esterilización y conservación de los medios de cultivo.

Para la esterilización utilizamos el principio del calor húmedo ocupando para dicha acción una autoclave. A los matraces Erlenmeyer de un litro se les colocó un tapón hecho con algodón y una gasa con el fin de cerrar correctamente los matraces con las preparaciones, evitando así futuras contaminaciones al término de la esterilización.

Los matraces con los medios se introdujeron en la autoclave y se dejó esterilizar durante 15 minutos a 121° C. Pasado este tiempo, los medios se dejaron enfriar a temperatura ambiente para posteriormente verter los medios de cultivo en cajas Petri previamente esterilizadas, utilizando el mismo método que los medios de cultivo y las mismas condiciones de esterilización. Se sirvió aproximadamente 20 mL del medio por caja, esto se realizó en condiciones de esterilidad empleando mecheros; las cajas Petri cerradas se dejaron a temperatura ambiente por 24 horas para garantizar la esterilidad con la ausencia de posibles contaminaciones en los medios de cultivo. Finalmente, los medios se conservaron a una temperatura de 5° C hasta su uso posterior.

4.1.3. Sembrado y purificación de cepas de *B. bronchiseptica*.

Se utilizaron los medios con agar Mac Conkey para la siembra específica de la bacteria de interés; este es un medio selectivo para bacterias Gram negativas como *B. bronchiseptica* ya que contiene sales biliares y cristal violeta los cuales inhiben la flora Gram positiva existente en las muestras, además esta bacteria cambia el color del indicador rojo neutro del medio de color rojo púrpura inicial (pH básico) a color amarillo ámbar (pH ácido). Esto porque *B. bronchiseptica* fermenta la lactosa contenida en el medio, bajando el pH del medio y haciendo virar el color del indicador a ámbar.

De los crioviales de las cepas conservadas en congelación, se tomó una pequeña muestra con una espátula previamente flameada con etanol al 98% (esto se realizó de manera rápida para evitar la descongelación total de la cepa conservada); una vez tomada la muestra, se colocó directamente en una caja con medio Mac Conkey al centro de esta y con un asa bacteriológica se sembró de forma masiva por todo lo largo y ancho de la superficie del medio de cultivo; esto se realizó en condiciones de esterilidad y empleando una caja para cada una de las cepas.

Una vez sembradas las cepas de interés, se incubaron de 24 a 48 horas a 37° C, revisando los medios a las 24 horas para confirmar crecimiento. Una vez crecidas las cepas a las 48 horas, se revisó el crecimiento en las cajas, seleccionando una colonia aislada y empleando la técnica de dilución se resembró en una caja con agar BHI, esto con el fin de

tener suficientes colonias aisladas para utilizarlas cuando así se requiera. Cabe hacer mención que la siembra en cajas con agar BHI se realizó con el propósito de conservar las cepas y de eliminar la coloración violeta de las colonias (por la utilización de la lactosa contenida en el agar Mac Conkey), y así evitar interferencias en la extracción posterior del DNA.

4.2. Cultivo de cepas Gram positivas y Gram negativas.

Fue necesario realizar el cultivo de bacterias Gram positivas y Gram negativas diferentes a *B. bronchiseptica*, para posteriormente llevar a cabo la extracción del DNA de estas cepas y emplearlo en la técnica de la PCR, con el fin de comparar la especificidad del producto amplificado de dicha bacteria. Estas cepas fueron: *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, y *Staphylococcus aureus*, las cuales fueron obtenidas gracias al apoyo del profesor M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez, encargado del laboratorio de Microbiología ubicado en el edificio de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Estas cepas estaban contenidas en caldos BHI, por lo cual se tomó directamente unas asadas de las cepas y se sembraron de manera masiva en medios sólidos de agar BHI, con la intención de obtener biomasa. El sembrado y la purificación se realizó como se describe en el punto 4.1.2.

4.3. Pruebas bioquímicas.

A las colonias seleccionadas de las cepas de *B. bronchiseptica* se les realizaron las pruebas bioquímicas primarias pertinentes que se exponen a continuación.

4.3.1. Gram.

Se colocó una pequeña asada de las colonias de interés bajo condiciones de esterilidad en un portaobjetos estéril con una gota de agua estéril; se fijó con calor y se adicionó posteriormente unas gotas de cristal violeta hasta cubrir la zona fijada dejando reposar durante un minuto. Terminado el tiempo se enjuagó al chorro de agua y se cubrió la muestra con unas gotas de lugol y se dejó reposar durante un minuto, volviendo a enjuagar la muestra al chorro de agua para después adicionar unas gotas de una solución 50/50 de alcohol-acetona dejando actuar unos 7 segundos; finalmente se adicionó safranina hasta cubrir la muestra y se dejó reposar por un minuto, enjuagando la muestra al chorro de agua al término del tiempo observándose al microscopio con el objetivo 100x.

El cristal violeta actúa penetrando en la capa de peptidoglucano de la bacteria, tiñéndola de color violeta y fijando el color con ayuda del lugol, el cuál cierra los poros de la membrana bacteriana. Las bacterias gram negativas tienen una capa de peptidoglucano muy delgada y fácilmente se puede disolver con la solución de alcohol-acetona, retirando dicha capa y dejando al descubierto una membrana interna que es teñida por el colorante de contraste (safranina), observándose al microscopio bacterias de color rojo.

4.3.2. Catalasa.

Con un palillo estéril, se colocó en un portaobjetos una pequeña muestra de una colonia aislada y se adicionaron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 30% observándose la formación de burbujas para una prueba positiva y la ausencia de ellas para una prueba negativa.

Esta prueba se basa en la capacidad que tiene la bacteria para desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre, poniendo de manifiesto la presencia o ausencia de la enzima catalasa, la cual lleva a cabo dicha reacción.

4.3.3. Oxidasa

Con un palillo estéril, se tomó una pequeña muestra de una colonia aislada. y se colocó sobre papel Whatman impregnado con gotas de una solución al 1% de tetrametil-p-fenilendiamina observándose durante los primeros 10 segundos un cambio de coloración azul para una prueba positiva.

Esta prueba se fundamenta en la presencia de la enzima citocromo oxidasa en la bacteria, que tiene como función ceder o transferir electrones al oxígeno en la cadena respiratoria; en presencia de oxígeno, la enzima oxida la tetrametil-p-fenilendiamina incolora a indofenol, que es de color azul.

4.3.4. Motilidad.

Se colocó sobre un cubreobjetos, 4 bolitas de plastilina en las esquinas del mismo y se adicionó al cubreobjetos unas 4 gotas de agua estéril. Posteriormente con un asa bacteriológica, se tomo una muestra de la colonia a tratar y se disolvió rápidamente en la gota de agua del cubreobjetos para después pasarlo a un portaobjetos volteándolo cuidadosamente de manera que la gota de agua formara una interfase entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Se observó finalmente al microscopio con el objetivo de 40x en busca de bacterias móviles individuales para una prueba positiva.

En esta prueba se corrobora la presencia de flagelos por parte de la bacteria, observando movimientos rápidos e individuales; cabe mencionar que una prueba negativa es la observación de las bacterias con movimientos erráticos o vibratorios (movimiento browniano).

4.4. Extracción de DNA por el método de DNAzol.

A partir de un cultivo puro de cada una de las cepas de *B. bronchiseptica*, *Salmonella spp*, *Enterobacter spp* y *Staphylococcus aureus*, se extrajo el DNA de acuerdo a la siguiente metodología:

- Se seleccionaron 6 colonias aisladas y con ayuda de un asa, se colocaron en un vial de 1.5 mL que contenía 100 µL de agua inyectable y se homogenizó la suspensión mediante un vortex.
- Se adicionó 1 mL de solución de DNAzol (Gibco) a la suspensión anterior y se homogeneizaron las células mediante el pipeteo hasta la desaparición de los grumos.
- Se sedimentó el homogeneizado centrifugando por 10 minutos a 10,000 g (10,258 rpm) a 4°C.
- Se transfirió el sobrenadante a un vial de 1.5 mL fresco (se centrifugó más de una vez cuando no se sedimentaba por completo la pastilla).
- Se precipitó el DNA por adición de 0.5 mL de etanol (100%) por cada mL de DNAzol. Se mezcló por inversión, manteniendo una temperatura de 25° C (temperatura ambiente) de 1-3 minutos. El DNA se observó como un precipitado nebuloso.
- Se compactó el DNA centrifugando el precipitado a 4000 g (6487 rpm) por 5 minutos a temperatura ambiente.
- El DNA se lavó con 0.8-1 mL, 2 veces de etanol al 75%. Se centrifugó a 4000g por 5 minutos.
- Se removió el etanol decantando el tubo y se dejó secar el DNA con el vial abierto de 30-90 minutos a temperatura ambiente.
- El DNA se disolvió con 100 µL de TE buffer (Trisma-EDTA) conservándolo en refrigeración al menos 24 horas.

4.5. Cuantificación espectrofotométrica de DNA.

Se obtuvieron los valores de densidad óptica (D.O.) de las muestras obtenidas de DNA a dos longitudes de onda (a 260 nm para leer DNA y a 280 nm para leer proteínas) en un espectrofotómetro de luz UV de marca biotech photometer.

4.5.1. Esterilización de materiales y preparación del espectrofotómetro.

Los materiales a utilizar, como las puntas para micropipetas, agua inyectable y celdas de cuarzo se esterilizaron con una lámpara UV. Los materiales se mantuvieron expuestos a la radiación ultravioleta por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, los materiales se taparon y sellaron hasta su utilización.

El espectrofotómetro de luz UV se encendió y se dejó calentar por aproximadamente 30 minutos antes de su utilización, esto con el fin de que el aparato en cuestión nos arroje lecturas confiables.

4.5.2. Preparación de diluciones y toma de lecturas.

Para poder tomar lecturas de D.O. en el espectro UV, se realizó una dilución previa a la muestra de DNA disuelta en TE buffer (buffer de conservación). Se tomaron 500µL de agua inyectable para diluir 5µL de la muestra de DNA. Con esto se tuvo una dilución 1/100. La solución se realizó directamente en la celda de cuarzo.

Listas las diluciones, se procedió a introducir las celdas en el espectrofotómetro y tomar lectura. Como blanco se utilizó el buffer TE de conservación. Al tomar lecturas, primero se colocó la celda con el blanco para calibrar el aparato a cero y posteriormente se introdujo la celda con la dilución de la muestra de DNA. Esto se realizó con todas las muestras de DNA extraídas.

4.5.3. Cálculos de los valores de pureza y de concentración del DNA.

Los valores de pureza y concentración de DNA se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

- Pureza = lectura a 260nm/lectura a 280nm.

Para la interpretación de los resultados de pureza se tiene establecido el siguiente criterio, cuando el valor de la relación es cercano a 1.8 (1.7-1.9), el DNA obtenido está sin contaminantes. El valor de 1.6 o por debajo de éste, indica que la muestra esta contaminada con proteínas y finalmente si el valor se ubica igual o por arriba de 2.0, la muestra esta contaminada con RNA.

El valor de la proporción entre las lecturas a 260 nm y 280 nm indica un estimado de la pureza del ácido nucleico.

Para la cuantificación de DNA:

- (Absorbancia 260nm x 50*) x Factor de dilución = Cantidad en µg/mL

* Este dato fue utilizado considerando que un valor de D.O. de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg/mL para DNA de doble cadena.

El factor de dilución se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen de diluyente} + \text{volumen de la muestra}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

4.6. Electroforesis para la detección de DNA íntegro en las muestras.

Todas las muestras de DNA obtenidas se corrieron por electroforesis en geles de agarosa para confirmar la integridad de las mismas, esto se realizó con cada una de las muestras de DNA extraídas.

Los geles de agarosa se prepararon a un porcentaje del 0.7%, es decir, se pesaron 0.315 g de agarosa directamente sobre un matraz Erlenmeyer de 250 mL y posteriormente se adicionaron 45 mL de una solución buffer TBE al 0.5X (Tris-borate-EDTA). La solución se llevó a un horno de microondas y se calentó por aproximadamente 2 minutos o hasta que la solución estuviese completamente homogénea, evitando dejar cristales de agarosa sin disolver, se dejó enfriar un poco la solución a temperatura ambiente para después adicionar 1.5 μ L de una solución madre de bromuro de etidio (BrEt) con una concentración de 10 mg/mL teniendo así, 15 μ g de BrEt en 45 mL de gel; finalmente, la solución se vertió en un molde con un peine para 12 carriles, dejando enfriar completamente el gel hasta su solidificación.

Para el llenado de los carriles con las muestras en el gel, se colocaron sobre un trozo de papel parafilm 8 μ L de una muestra de DNA extraído y 1 μ L de un marcador de pares de bases, a ambas preparaciones se les agregó 4 μ L de un buffer de carga al 0.5X (50% glicerol, 15mM EDTA, 0.6% azul de bromofenol) a cada una, se homogenizó la solución por pipeteo y se llenó cada carril con dicha mezcla para cada una de las muestras. Llenos los carriles necesarios, se colocó el gel en una cámara de electroforesis, se llenó la cámara de buffer TBE al 0.5X y se cerró, corriendo el gel de 50 a 60 Voltios durante 30 o 40 minutos; una vez terminado el corrimiento, el gel se observó sobre un transiluminador UV, detectando la aparición de bandas de color naranja como integridad positiva del DNA. Estos resultados se capturaron fotográficamente (cámara Canon G6 Supershot).

4.7. Iniciadores utilizados para la realización de la PCR.

Las características de los iniciadores que se utilizaron en este trabajo fueron las siguientes:

Tabla 4.1. Características de los iniciadores *prn* AF, *prn* BR y β -actina.

Clave interna de los iniciadores	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)
<i>prn</i> AF	GCC-AAT-GTC-ACG-GTC-CAA	1400
<i>prn</i> BR	CGG-ATT-CAG-GCG-CAA-CTC	
Control interno de β actina bovina sentido	GGA-AAT-CGT-GCG-TGA-CAT-TAA-GG	273
Control interno de β actina bovina antisentido	TGT-GTT-GGC-GTA-CAG-GTC-TTT-ACG	

Los iniciadores están reportados para *B. pertussis*, sin embargo la secuencia del fragmento a amplificar por estos iniciadores coinciden en un 100% con las del gen *prn* de *B. bronchiseptica*, reportados en la base de datos “Genbank”, teniendo la certeza de que se puede realizar la amplificación de la región I del gen que codifica a pertactina en ambas especies de *Bordetella*.

4.7.1. Preparación y cuantificación de los iniciadores.

Los iniciadores liofilizados se centrifugaron por aproximadamente 10 segundos a 5000 rpm para después adicionar 200 μ L de agua inyectable a cada uno de los iniciadores, dejándolos reposar por 5 minutos, agitando muy bien los viales con el fin de hidratar el producto.

Estos iniciadores deben estar a una concentración de 1×10^{-5} M para lo cual se procedió a cuantificar, al igual que con las muestras de DNA extraído, utilizando un espectrofotómetro de luz UV y 2 celdas de cuarzo, tomándose 5 μ L del iniciador ya

hidratado y adicionarlo en 500 μ L de agua inyectable para tener una dilución 1/100 realizando esto directamente en la celda de cuarzo con ayuda de una micropipeta; después se obtuvieron las lecturas de D.O. a 260nm y a 280nm, tomando como blanco agua inyectable para calibrar el aparato a cero. Los cálculos de concentración se realizaron como se indicó previamente en el punto 4.5.3. incluyendo lo siguiente:

- $E_m = \text{número total de G (guaninas) (12000) + número total de A (adeninas) (16000) + número total de T (timinas) (9600) + número total de C (citocinas) (7000)}$.

Posteriormente:

- $\text{Absorbancia 260nm} \times \text{dilución} / E_m = \text{Concentración en Molaridad (M)}$

Una vez ajustadas las soluciones de los iniciadores a la concentración deseada (1×10^{-5} M) cada una de ellas se repartió en 3 viales, previamente esterilizados con una lámpara UV por 15 minutos, tomando para cada vial 166 μ L de la dilución final. Los viales se etiquetaron con los datos de cada iniciador.

4.8. Técnica de la PCR para la amplificación del fragmento del gen *prn* que codifica a pertactina de *B. bronchiseptica*.

La técnica de la PCR es un ensayo de biología molecular que se ha venido utilizando más comúnmente como un método rápido, sencillo y específico con el cual podemos obtener productos amplificados del DNA plantilla de interés; en este trabajo se implemento dicha técnica utilizando un par de iniciadores (*prn* AF/*prn* BR) para obtener un producto amplificado del gen *prn* que codifica para pertactina de *B. bronchiseptica* cuyo tamaño es de 1400 pb.

La reacción de la PCR se realizó en un termociclador marca Biometra T gradient, estandarizando las condiciones de trabajo de la PCR mediante la implementación de un periodo de incubación de 30 ciclos, los cuales consistieron en un precalentamiento único

inicial de 3 minutos a 95°C, una desnaturalización a 95°C por 20 segundos, una hibridación a 55°C por 30 segundos, una elongación a 72°C por 1 minuto y una elongación final a 72°C por 7 minutos por cada ciclo lleva cabo en microviales para PCR (de 0.2 mL), previamente esterilizados con lámpara UV por 15 minutos; llevando cada reacción a un volumen final de 50 µL con agua inyectable. Se utilizaron los reactivos de trabajo enlistados en la Tabla 4.2., así como las concentraciones a las que se encontraban las soluciones de trabajo de éstos (todos los reactivos fueron de las marcas Invitrogen y Promega).

Tabla 4.2. Concentraciones de los reactivos utilizados en la técnica de la PCR.

REACTIVO	CONCENTRACION
Buffer PCR	10 X
MgCl ₂	10 mM
DNTP's mix	0.5 mM
Primer AF	1 x 10 ⁻⁵ M
Primer BR	10 nM
DNA plantilla	100 ng
Taq polimerasa	1.5 U
H ₂ O bidestilada o inyectable	c.b.p.

4.8.1. Estandarización de la PCR empleando los iniciadores para β-actina.

La β-actina se utilizó como control interno del sistema (para confirmar el buen funcionamiento de los reactivos empleados y el estado del DNA plantilla); durante la estandarización de la reacción se utilizaron dos pares de iniciadores para amplificar dos tipos diferentes de β-actina, una humana (β-act Sentido hum/β-act AntiSentido hum) y una bovina (β-act Sentido bov/β-act AntiSentido bov), para poder observar con cual de los dos pares de iniciadores específicos para β-actina amplificaba mejor el DNA de las diferentes cepas de *B. bronchiseptica* y de las otras bacterias incluidas en el presente estudio.

Para llevar a cabo la reacción de la PCR empleando los dos pares de iniciadores para β-actina se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador: una desnaturalización de 20 seg a 95° C, un alineamiento de 30 seg a 55° C, una extensión de 60 seg a 72° C y una extensión final de 7 minutos a 72° C por 30 ciclos, con un

precalentamiento de 5 minutos a 92° C y sin precalentamiento. Se utilizó inicialmente una concentración de 0.5 µg y 1 µg/µL de DNA de *B. bronchiseptica*, además de incluir DMSO al 10% por vial.

Así mismo, se probaron otras condiciones propias para β-actina las cuales consistieron de 40 ciclos, en donde para cada uno de ellos se llevó a cabo una desnaturalización de 30 seg a 92° C, un alineamiento de 30 seg a 53° C, una extensión de 30 seg a 72° C y una elongación de 10 minutos a 72° C; estas condiciones se compararon incluyendo un precalentamiento de 5 minutos a 92° C y sin precalentamiento.

Finalmente se optimizó la cantidad de la enzima Taq polimerasa, empleando dos concentraciones (1 U y 2 U) de esta enzima y el par de iniciadores para β-actina bovina; en la Tabla 4.3. se mencionan las cantidades y concentraciones de los reactivos empleados para la realización de la PCR.

Tabla 4.3. Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados para la estandarización de la amplificación de β-actina.

Reactivo de la PCR y concentración de la solución madre	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR 10X	1X	5
MgCl ₂ 50 mM	5mM	5
DMSO conc.	10%	5
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
Iniciador β-actina sent (1 x 10 ⁻⁵ M)	1.0 nM	2
Iniciador β-actina antisent (1 x 10 ⁻⁵ M)	1.0 nM	2
DNA bacteria conc.	0.5 y 1 µg/µl	volumen ajustado
H ₂ O inyectable	----	suficiente para 50 µL
Buffer PCR 10X	5X y 8X	0.5 y 0.8
Taq polimerasa 5 U/ µL	1 y 2 U/ µL	0.2 y 0.5 respectivamente
Volumen final	----	50

4.8.2. Estandarización de la técnica de la PCR utilizando el par de iniciadores *prn* AF/*prn* BR específicos para *Bordetella*.

Para la estandarización de la amplificación del fragmento de pertactina de *B. bronchiseptica*, se utilizaron 3 concentraciones de DNA (0.25, 0.5 y 1 µg por cada vial) y 4 concentraciones de iniciadores (10, 1, 0.1 y 0.01 nM) a partir de un stock de 10 nM realizando diluciones 1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000, respectivamente; en presencia o ausencia de DMSO. Incluyéndose además, el control interno del sistema con las concentraciones óptimas para su amplificación (con DMSO, 2U de Taq polimerasa y 0.5 µg/µl de DNA), condiciones obtenidas a partir de la estandarización para el fragmento del gen de β-actina explicada en el punto 4.8.1 y en la Tabla 4.3.

En la Tabla 4.4. se muestran las concentraciones por vial de los reactivos utilizados en la PCR, así como las cantidades utilizadas para dicho propósito.

Tabla 4.4. Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados para la estandarización de la amplificación del fragmento de pertactina.

Reactivo de la PCR y concentración de la solución madre	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR 10X	1 X	5
DMSO conc.	10 %	5
MgCl ₂ 50 mM	5 mM	5
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
Iniciador <i>prn</i> AF (1 x 10 ⁻⁵ M)	10, 1, 0.1, 0.01 nM	2
Iniciador <i>prn</i> BR (1 x 10 ⁻⁵ M)	10, 1, 0.1, 0.01 nM	2
DNA bacteria conc.	0.25, 0.5 y 1 µg/µl	volumen ajustado
H ₂ O inyectable	----	suficiente para 50 µL
Buffer PCR 10X	5X	0.5
Taq polimerasa 5 U/ µL	2 U/ µL	0.5
Volumen final	----	50

Se probaron las condiciones de la PCR para pertactina (desnaturalización de 20 seg a 95° C, un alineamiento de 30 seg a 55° C, una extensión de 60 seg a 72° C y una extensión final de 7 minutos a 72° C por 30 ciclos) y condiciones para b-actina (40 ciclos:

desnaturalización de 30 seg a 92° C, alineamiento de 30 seg a 53° C, extensión de 30 seg a 72° C y un ciclo final de elongación de 10 minutos a 72° C).

4.8.3. Especificidad de la técnica de la PCR estandarizada con el par de iniciadores *prn AF/prnBR*.

Para probar la especificidad del método de la PCR con los iniciadores *prn AF* y *prn BR* para *Bordetella*, se empleó el DNA extraído de las siguientes cepas: *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, y *Staphilococcus aureus* realizando la técnica de la PCR utilizando las condiciones que se describen en el punto 4.8.2.

4.9. Electroforesis para los productos de la PCR.

Los productos amplificados de la PCR se evidenciaron en geles de agarosa al 1.5%, cabe hacer mención que se realizó una comparación entre 3 diferentes concentraciones de agarosa (1%, 1.5% y 2%) para utilizar la más adecuada. La preparación de los geles así como el llenado de los mismos y su corrimiento se llevo a cabo siguiendo la misma metodología del punto 4.6, pero realizando el corrimiento electroforetico a 45 voltios por aproximadamente 90 minutos. En la mayoría de los geles se incluyó el producto amplificado de β -actina bovina (control interno del sistema) y una muestra del DNA plantilla para corroborar la eficiencia del sistema y detectar posibles falsos positivos.

4.10. Análisis de la intensidad y peso de los productos amplificados.

Pasado el tiempo de electroforesis, los geles se colocaron en un transiluminador UV con un sistema de fotografía especial (Gel logic 100 imagen system), y la intensidad de las bandas teñidas con bromuro de etidio se analizaron mediante la utilización de un software especial “KODAK 1D 3.6”; dicho software detecta la intensidad de luz transmitida en valores de intensidad arbitraria. El análisis de las bandas se realizó en geles recién preparados.

4.11. Secuenciación del producto de la PCR de *B. bronchiseptica*.

El producto obtenido de *B. bronchiseptica* se mandó a secuenciar con la ayuda del servicio de secuenciación proporcionado en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) a cargo del M. en C. Alejandro Monsalvo, que se localiza en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.11.1 Purificación del producto amplificado de *B. bronchiseptica*.

Para poder realizar la secuenciación fue necesario realizar una previa purificación del producto de la PCR; para esto se utilizaron 40 μL del producto fresco o en congelación (por un periodo máximo de un día). Dicho producto se precipitó empleando 3 volúmenes de etanol al 100 % por cada volumen de muestra y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, para después decantar el sobrenadante observando la pastilla de producto; posteriormente la pastilla se resuspendió en 3 volúmenes de etanol al 70 % y después centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos para decantar el etanol y repetir el lavado con etanol al 70 % dos veces más. Una vez terminado el tercer lavado, se decantó el etanol y el tubo se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender la pastilla con 24 μL de agua inyectable, tomando en cuenta que por cada 50 μL de muestra contenida en el vial se debe adicionar 30 μL de agua inyectable.

Para verificar el producto, se corrió un gel de agarosa al 1.5 % con 1.5 μL de BrEt, colocando 5 μL de la muestra mas 2.5 μL de buffer de carga sobre papel parafilm, corriendo el gel a 45 voltios por una hora aproximadamente, colocándolo posteriormente en un transiluminador UV y observando las bandas de color naranja.

4.11.2. Comparación de la secuencia de los productos amplificados.

Los datos obtenidos de la secuenciación se compararon con la base de datos en internet “GenBank” mediante el programa BLAST para nucleótidos, buscando similitudes

en la secuencia del producto amplificado con el genoma de *B. bronchiseptica*. Cabe mencionar que también se compararon con los genomas de *B. pertussis* y *B. parapertussis*, con el fin de comparar secuencias idénticas entre especies del mismo género.

5. RESULTADOS

5.1. Crecimiento, conservación e identificación de cepas de *B. bronchiseptica*.

Se logró el crecimiento de las cepas marcadas como LBF, Gbv3, Gbv4, Gbv8, Chel4 y Chel10 en agar Mac Conkey, presentando colonias pequeñas y translúcidas a las 24 horas de crecimiento a 37° C; dichas colonias eran de color rosado y a las 48 horas se encontraron colonias lisas y pequeñas de forma circular, de poca elevación, brillantes y de bordes regulares y con un color blanco rosáceo translúcido muy tenue. El crecimiento en agar BHI tiene el mismo patrón que el observado en agar MacConkey, y las colonias fueron más blancas y translúcidas en este medio. Cabe mencionar que la cepa LBF mostró un crecimiento colonial mediano, de forma circular, con poca elevación y con bordes regulares. Estos resultados fueron comparados y coincidieron con los reportados en la literatura (McFaddin, 2002, Koneman, 2003).

Las cepas Chel4 y Chel10 (ATCC 4617 y ATCC 10580 respectivamente) fueron tomadas como cepas de referencia de *B. bronchiseptica* para este trabajo, dichas cepas fueron obtenidas en el laboratorio de Inmunología ubicado en el edificio de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

5.2. Pruebas bioquímicas primarias.

Las pruebas bioquímicas se realizaron a las cepas LBF, Gbv3, Gbv4, Gbv8, Chel4 y Chel10 para poder tener la certeza de estar trabajando con cepas de *B. bronchiseptica*. Los resultados de dichas pruebas se reportan en las Tablas 5.1. y 5.2.; cabe aclarar que las pruebas de identificación secundaria se realizaron previamente en un trabajo realizado por Martínez y Francisco, 2008. Los resultados reportados en la literatura (MacFaddin, 2002; Koneman, 2003), coinciden con los obtenidos en nuestras pruebas primarias.

Tabla 5.1. Pruebas bioquímicas primarias realizadas a las cepas LBF, Gbv3, Gbv4, Gbv8, Chel4 y Chel10.

Cepa	LBF	Gbv3	Gbv4	Gbv8	Chel4	Chel10	Resultados McFaddin 2002; Koneman 2003
Prueba Bioquímica							
Gram	Negativo-cocobacilos	Negativo-cocobacilos	Negativo-cocobacilos	Negativo-cocobacilos	Negativo-cocobacilos	Negativo-cocobacilos	Negativo-cocobacilos
Oxidasa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Catalasa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Motilidad	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

Tabla 5.2. Pruebas bioquímicas secundarias.

Cepa	LBF	Gbv3	Gbv4	Gbv8	Resultados McFaddin 2002; Koneman 2003
Prueba Bioquímica					
Manosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Inositol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Sorbitol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ramnosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Sacarosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Lactosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Glucosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Arabinosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Sulfhídrico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Indol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Gelatina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Urea	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo	Positiva

Reportadas por Martínez y Francisco, 2008

5.3. Extracción y cuantificación de DNA de las cepas de *B. bronchiseptica*.

La solución de DNAzol que se utilizó para el presente trabajo ayudó a lisar a las células bacterianas de *B. bronchiseptica*, ya que está compuesta a base de detergentes que barren la membrana de lípidos de la bacteria, ayudando a liberar el contenido del citoplasma bacteriano.

Para dicha extracción de DNA se utilizaron cultivos de 48 horas, teniendo la precaución de haber sembrado dicho cultivo a partir de la cepa madre (un solo pase). Es importante mencionar que por cada extracción de DNA por el método de DNAzol se obtienen 200 μ L de muestra ya que la extracción de *B. bronchiseptica* sólo nos permitió tomar una cierta cantidad máxima de muestra (6 colonias), por lo que se decidió realizar varias extracciones de la misma cepa bacteriana para poder hacer una especie de “pool” de DNA y poder tener suficiente muestra disponible de cada una de las cepas con los mismos valores de pureza y concentración (aproximadamente 1mL). Los resultados reportados en la Tabla 5.3. se obtuvieron a partir del análisis de dichas muestras de DNA.

Tabla 5.3. Valores de concentración y pureza de las muestras de DNA de *Bordetella bronchiseptica* obtenidas por lisis bacteriana con DNAzol.

Cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	Pureza D.O. 260nm/280nm	Concentración DNA (μg/μL)
LBF	0.033/0.025= 1.32	0.166
Chel4	0.021/0.010= 2.1	0.106
Chel10	0.037/0.022= 1.68	0.07
GBv3	0.002/0.002= 1.0	0.01
GBv4	0.012/0.007= 1.71	0.06
GBv8	0.025/0.018= 1.38	0.12

5.4. Análisis de la integridad del DNA extraído de *B. bronchiseptica*.

Para evaluar la integridad del DNA extraído de *B. bronchiseptica* se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, para lo cual se tomaron las muestras de DNA de

cada una de las cepas reportadas en la Tabla 5.3. Los resultados de la electroforesis se muestran en la Figura 5.1.

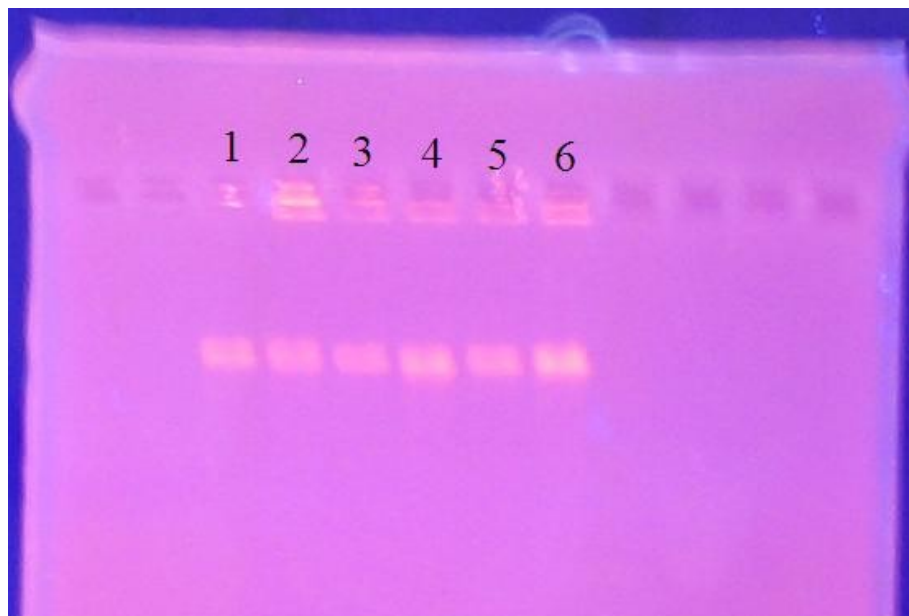


Figura 5.1. Detección del DNA íntegro de las cepas utilizadas de *B. bronchiseptica* mediante electroforesis. El orden de las muestras es el siguiente; carriles, 1-6 = Chel4, Chel10, LBF, GBv3, GBv4, GBv8, respectivamente; El DNA fue teñido con bromuro de etidio, observándose de color naranja. Se colocó un volumen de 10 μ L por cada carril. Gel de agarosa al 0.7%.

5.5. Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación del fragmento del gen de β -actina.

Para la estandarización de la técnica de la PCR es importante tomar en cuenta un control interno y para ello se utilizaron iniciadores que codificaran un fragmento del gen de la β -actina, el cual es un gen constitutivo, que codifica una proteína del citoesqueleto celular presente prácticamente en todas las células (William, C., *et al*, 2005; Loeffler, *et al*, 2001).

Para el empleo óptimo del control interno del sistema antes mencionado, se trabajaron 2 concentraciones de DNA (0.5 y 1 μ g/vial), 2 concentraciones de Taq

polimerasa (1U y 2U), con y sin la utilización de DMSO y haciendo uso de iniciadores para β -actina humana y bovina. Las condiciones para el termociclador consistieron de un precalentamiento de 5 minutos a 92°C, para después aplicar 30 ciclos compuestos de una desnaturalización de 20 segundos a 95° C, un alieamiento de 30 segundos a 55° C, una elongación de 1 minuto a 72° C y un ciclo final de elongación de 7 minutos a 72° C, por ciclo. Con estas condiciones no se logró obtener el producto deseado, por lo que se optó realizar otra PCR para β -actina con la diferencia que ésta no incluía un precalentamiento (con el fin de determinar si los resultados obtenidos anteriormente fuesen falsos negativos), sin embargo no se consiguió amplificar el fragmento del gen de β -actina (resultados no mostrados).

Debido a lo anterior, se cambió el esquema de trabajo de la PCR al reportado para la amplificación propiamente del fragmento del gen de β -actina incluyendo en dicha reacción el reactivo DMSO, mostradas en la figura 5.2. En la Tabla 5.4 se muestran las condiciones de trabajo de la PCR con la que se logró finalmente amplificar al fragmento del gen de β -actina (Loeffler, *et al*, 2001).

Tabla 5.4. Condiciones de la técnica de la PCR para la amplificación del fragmento del gen de β -actina para el DNA de la cepa LBF.

Reactivo de la PCR y concentración de la solución madre	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR 10X	1X	5
MgCl ₂ 50 mM	5mM	5
DMSO conc.	10%	5
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
Iniciador β -actina sent (1 x 10 ⁻⁵ M)	1.0 nM	2
Iniciador β -actina antisent (1 x 10 ⁻⁵ M)	1.0 nM	2
DNA bacteria conc.	0.5 y 1 μ g/ μ l	volumen ajustado
H ₂ O inyectable	----	suficiente para 50 μ L
Buffer PCR 10X	5X y 8X	0.5 y 0.8
Taq polimerasa 5 U/ μ L	1 y 2 U/ μ L	0.2 y 0.5 respectivamente
Volumen final	----	50

Con el esquema anterior, se logró amplificar el producto específico de β -actina (302 pb), obteniéndose un mejor amplificado con los iniciadores para β -actina bovina, con una concentración de Taq polimerasa de 2U y con una cantidad de DNA de 0.5 μ g. En la Figura 5.2. se muestran los resultados del corrimiento electroforético realizado a los productos amplificados de la PCR con las condiciones de trabajo mencionadas anteriormente en la Tabla 5.4. Cabe hacer mención que a partir de este punto se descartó a la cepa GBv3, debido a que con esta cepa no se logró obtener al amplificado de β -actina requerido.

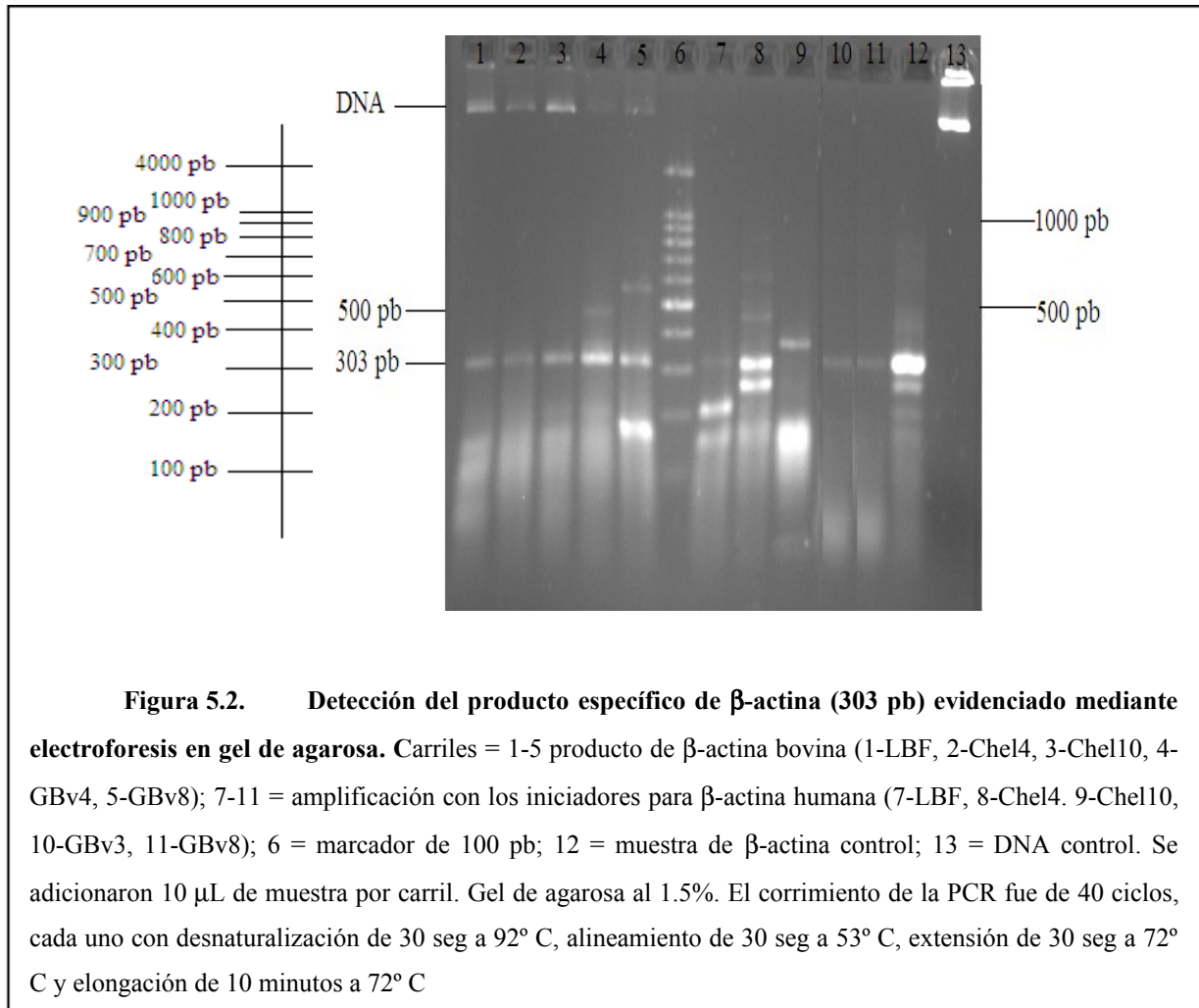


Figura 5.2. Detección del producto específico de β -actina (303 pb) evidenciado mediante electroforesis en gel de agarosa. Carriles = 1-5 producto de β -actina bovina (1-LBF, 2-Chel4, 3-Chel10, 4-GBv4, 5-GBv8); 7-11 = amplificación con los iniciadores para β -actina humana (7-LBF, 8-Chel4, 9-Chel10, 10-GBv3, 11-GBv8); 6 = marcador de 100 pb; 12 = muestra de β -actina control; 13 = DNA control. Se adicionaron 10 μ L de muestra por carril. Gel de agarosa al 1.5%. El corrimiento de la PCR fue de 40 ciclos, cada uno con desnaturalización de 30 seg a 92° C, alineamiento de 30 seg a 53° C, extensión de 30 seg a 72° C y elongación de 10 minutos a 72° C

5.6. Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación del fragmento del gen *prn* que codifica para pertactina.

Con respecto a la estandarización de la técnica de la PCR para obtener el fragmento del gen *prn* de *B. bronchiseptica*, se tomaron en cuenta las siguientes variables: 3 cantidades de DNA bacteriano (0.25 μ g, 0.5 μ g y 1 μ g), 4 concentraciones de iniciadores (10, 1 0.1 y 0.01 nM), Taq polimerasa a 1U y 2U, y cada una de ellas con y sin DMSO; el control interno del sistema se corrió bajo las condiciones óptimas determinadas y mencionadas en el punto anterior. En la Tabla 5.4. se muestran las condiciones iniciales con las que se trabajó, siendo las mismas que para β -actina.

Para las condiciones de incubación el termociclador se programó de la siguiente forma: 30 ciclos consistentes en una desnaturalización de 20 seg a 95° C, un alineamiento de 30 seg a 55° C, una elongación de 1 minuto a 72° C y una elongación final de 7 minutos a 72° C. Con el ensayo anterior no se obtuvo producto alguno con ninguna de las condiciones propuestas (resultados no mostrados), por lo que se optó cambiar las condiciones de trabajo a las empleadas para β -actina, mostradas en el punto 5.5. Los resultados obtenidos empleando las condiciones óptimas se observan en las Figuras 5.3 y 5.4., las cuales fueron las siguientes: Concentración de DNA-0.5 μ g, Taq polimerasa 2U con DMSO y 1 μ g de iniciador. Con estas condiciones se logró obtener la amplificación de un producto con un tamaño de 462 pares de bases empleando el DNA de la cepa LBF, y finalmente se probaron las condiciones con las otras cepas de *B. bronchiseptica*.

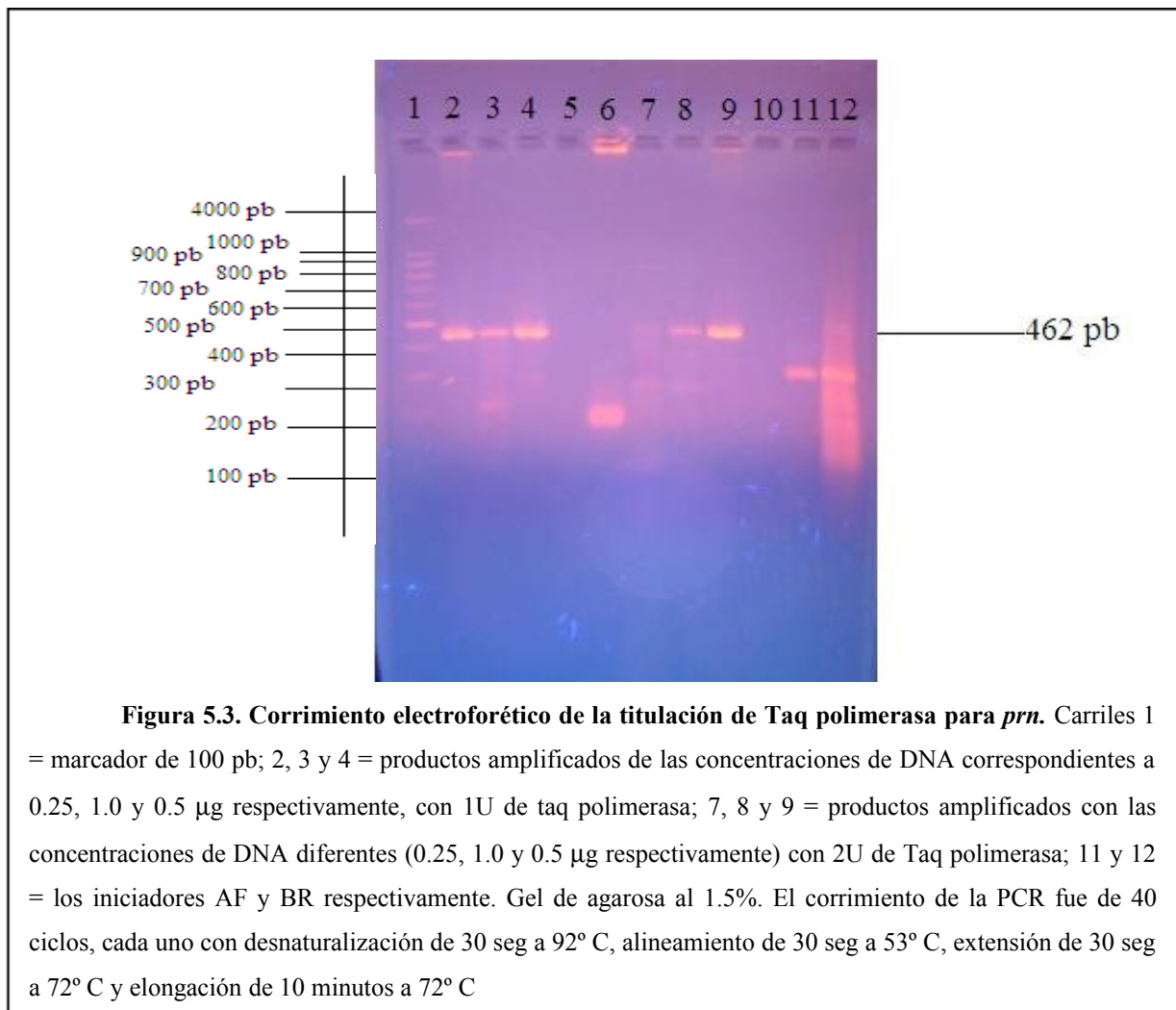


Figura 5.3. Corrimiento electroforético de la titulación de Taq polimerasa para *prn*. Carriles 1 = marcador de 100 pb; 2, 3 y 4 = productos amplificados de las concentraciones de DNA correspondientes a 0.25, 1.0 y 0.5 μ g respectivamente, con 1U de taq polimerasa; 7, 8 y 9 = productos amplificados con las concentraciones de DNA diferentes (0.25, 1.0 y 0.5 μ g respectivamente) con 2U de Taq polimerasa; 11 y 12 = los iniciadores AF y BR respectivamente. Gel de agarosa al 1.5%. El corrimiento de la PCR fue de 40 ciclos, cada uno con desnaturalización de 30 seg a 92° C, alineamiento de 30 seg a 53° C, extensión de 30 seg a 72° C y elongación de 10 minutos a 72° C



Figura 5.4 Corrimiento electroforético de la titulación de iniciadores para *prn*. Carriles 2 = marcador de pares de bases (100 pb); 3, 4, 5 y 6 = productos amplificados con diferentes concentraciones de iniciadores (0.01, 0.1, 10 y 1µg respectivamente), todos con 0.5µg de DNA; 8,9, 10 y 11 = productos amplificados con concentraciones de iniciadores diferentes (0.01, 0.1, 10 y 1µg, respectivamente), con una concentración de 0.5µg DNA por carril; 12 y 13 = iniciadores *prn* AF y *prn* BR. Gel de agarosa al 1.5%. El corrimiento de la PCR fue de 40 ciclos, cada uno con desnaturalización de 30 seg a 92° C, alineamiento de 30 seg a 53° C, extensión de 30 seg a 72° C y elongación de 10 minutos a 72° C

5.7. Evaluación de la especificidad de los iniciadores *prn* AF/*prn* BR.

Fue importante llevar a cabo la evaluación de la especificidad de los iniciadores, para saber si el método implementado amplifica sólo al fragmento del gen de pertactina. Para ello se utilizó el DNA de 3 cepas diferentes: *Salmonella spp*, *Staphylococcus. aureus* y *Enterobacter spp*. Para la extracción del DNA de estas bacterias Gram positivas y Gram negativas, se realizó la técnica de DNAzol utilizada para *B. bronchiseptica* (ver punto 4.5) a partir de cultivos de 24 horas en caldos BHI. En la Tabla 5.5. se muestran las concentraciones y cantidad de DNA obtenido por dicho método.

Tabla 5.5. Valores de concentración y pureza de las muestras de DNA de bacterias Gram positivas y Gram negativas diferentes a *B. bronchiseptica*.

Cepas Gram + y Gram -	Pureza D.O. 260nm/280nm	Concentración DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>Salmonella spp</i>	0.017/0.010= 1.7	0.085
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.009/0.005= 1.8	0.045
<i>Enterobacter spp</i>	0.017/0.015= 1.13	0.085

Las cepas utilizadas fueron previamente caracterizadas por pruebas bioquímicas primarias y secundarias, las cuales se realizaron en el Laboratorio de Microbiología a cargo del M.V.Z. Gerardo Cruz Jimenez, en el edificio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

5.7.1. Técnica de la PCR para verificar la especificidad del método empleado.

Se utilizaron las condiciones de la PCR empleadas para amplificar al fragmento del gen *prn* que codifica a pertactina, descritas en el punto 5.6. Cabe señalar que sólo se utilizó la cantidad de 0.5 μg de DNA por vial, incluyendo las 5 cepas de *B. bronchiseptica* (LBF, Chel4, Chel10, Gbv4 y Gbv8) y el control interno de β -actina bovina estandarizado anteriormente. Los resultados se evidenciaron mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa con una concentración del 1.5%.

Con estos resultados se logró demostrar la especificidad de los iniciadores *prn* AF/*prn* BR para el DNA de *B. bronchiseptica* y como se observa en la Figura 5.5., no hubo producto con las bacterias diferentes a *B. bronchiseptica*, además de que el método empleado es confiable ya que en todas las muestras se logró observar el producto del fragmento del gen de β -actina.

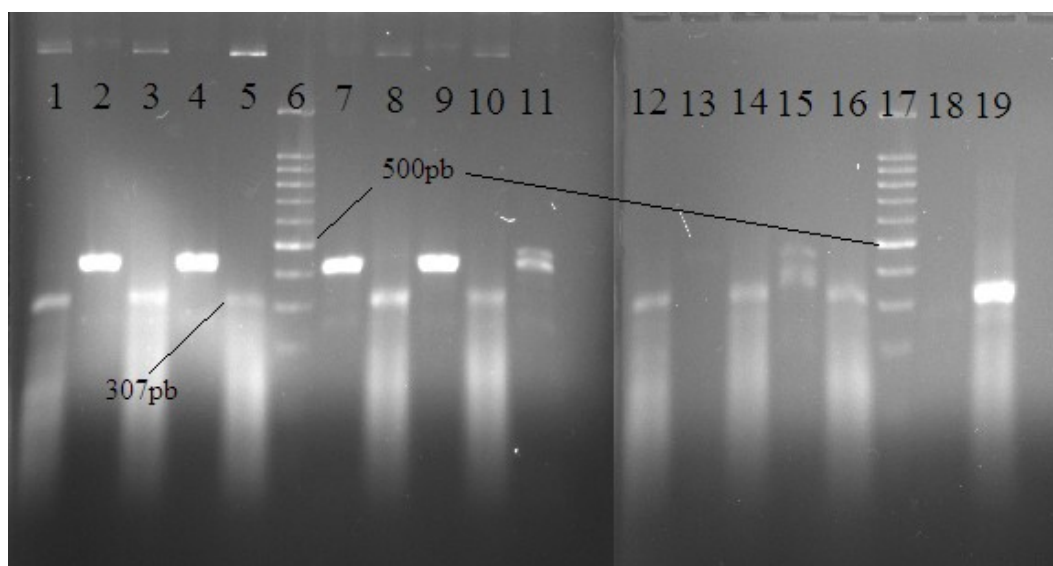


Figura 5.5. Corrimiento electroforético de los productos amplificados del fragmento de β -actina y la especificidad de los iniciadores *prnAF/prnBR*. Carriles 1 y 2 = cepa LBF, 3 y 4 = cepa Chel4, 5 y 7 = cepa Chel10; 8 y 9 = cepa Gbv4; 10 y 11 = cepa Gbv8; 12 y 13 = cepa *Salmonella*; 14 y 15 = cepa *Enterobacter*; 16 y 18 = cepa *Staphylococcus*. Carriles 1, 3, 5, 8, 10, 12, 14 y 16 = iniciadores para el fragmento del gen de β -actina bovina; carriles 2, 4, 7, 9, 13, 15 y 18 = iniciadores para fragmento del gen de *prn* de pertactina; Carriles 6 y 17 = marcadores de 100 pb; carril 19 = control positivo de β -actina Volumen de muestra depositado por carril: 10 μ L. Gel de agarosa al 1.5%. El corrimiento de la PCR fue de 40 ciclos, cada uno con desnaturalización de 30 seg a 92° C, alineamiento de 30 seg a 53° C, extensión de 30 seg a 72° C y elongación de 10 minutos a 72° C

5.8. Secuenciación de los productos amplificados con los iniciadores *prn AF/prn BR*.

Para poder constatar la naturaleza de los productos obtenidos con la técnica de la PCR establecida anteriormente, se mandaron a secuenciar los productos amplificados de las cepas utilizadas en la PCR. Dichas secuencias se compararon con la base de datos "GenBank" y resultaron ser idénticas en un 100% con parte de los genomas de *B. bronchiseptica* y *B. paraptusiss* en una proteína hipotéticamente conservada..

6. DISCUSIÓN.

La bordetelosis es una enfermedad aguda persistente y contagiosa causada por *B. bronchiseptica*, un microorganismo de alta diseminación en mamíferos, teniendo relevancia en especies caninas y porcinas (rinitis atrófica porcina) (Keil *et al*, 1999). En la actualidad, *B. bronchiseptica* ha tenido cierta importancia en las enfermedades respiratorias en el humano, debido a que se ha aislado en análisis clínicos de rutina (exudados faríngeos) de pacientes inmunosuprimidos, sin embargo el vínculo entre *B. bronchiseptica* y dichos padecimientos en humanos no está bien definidos ya que la bacteria también se ha logrado aislar de pacientes clínicamente sanos (Register, 2001; Llombart, 2006).

Una de las principales problemáticas que presenta *B. bronchiseptica* en el ámbito veterinario es estar presente en la rinitis atrófica que en conjunción con *Pasterella multocida*, causa dicha enfermedad en cerdos, perros y en conejos aunque en estos dos últimos no ha sido muy bien establecido (Deeb, 1989). Su importancia radica en destruir las células epiteliales del tracto respiratorio específicamente en la nasofaringe, permitiéndole a *P. multocida* colonizar el tracto respiratorio de las especies animales mencionadas con anterioridad (Cowart, 1989; Deeb, 1989; Ackermann, *et al*, 1994). *B. bronchiseptica* también se ha logrado aislar de felinos domésticos, ovinos, y murinos con enfermedades respiratorias crónicas (Gerlach, *et al.*, 2001); sin embargo, no existen reportes de esta bacteria como agente patógeno para el caso de los bovinos.

De manera inicial, el diagnóstico de *B. bronchiseptica* se realiza mediante el aislamiento y su posterior identificación de esta bacteria a partir de exudados faríngeos, esputos y biopsias, realizando las pruebas bioquímicas correspondientes, de las cuales es importante detectar la actividad positiva de la enzima ureasa en este microorganismo (Hozbor, 1999; Koneman, 2003). En un trabajo realizado en 1996 por McMillan y colaboradores, reportan cepas de *B. bronchiseptica* con ureasa negativa genéticamente manipuladas, demostrando que la urea está regulada por el fenotipo *bvg* y que también se ve afectada por la temperatura, así mismo mencionan que la ureasa no puede ser inducible por la urea o regulada por la disponibilidad del nitrógeno. (McMillan, *et al.*, 1996).

Existen métodos complementarios con los cuales se logra la detección de factores de virulencia como son: la aglutinación de eritrocitos *In Vitro*, la cual indica la presencia de la hemaglutinina filamentosa, un factor de virulencia importante en la colonización e invasión de *B. bronchiseptica* al tracto respiratorio; la identificación de serotipos en fimbrias por medio de pruebas de inmunoensayo (ELISA) y la detección, por medio de electroforesis de geles de acrilamida, de una proteína de autotransporte llamada BrkA (Gross, 1991).

Por otra parte, también existen métodos alternativos para la detección de dicha bacteria utilizando biopsias de tejidos infectados y revelando resultados positivos por medio de tinciones histológicas; técnicas de inmunoensayos (ELISA) con anticuerpos marcados para la detección de proteínas de superficie de *B. bronchiseptica*, pruebas de precipitación protéica para la búsqueda de antígenos contra el dominio RGD, el cual se le denomina a una triada de aminoácidos específicos (Arginina-Glicina-Asparagina) que se pueden encontrar en la secuencia de algún péptido de superficie celular, siendo importante en la adhesión de *B. bronchiseptica* a las células blanco (Register, 2001; Hozbor, 2001).

A pesar de ser confiables las técnicas inmunológicas para la detección de *B. bronchiseptica*, existe otra alternativa apoyada en la biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); la técnica es sencilla y por lo tanto puede ser realizada por personal relativamente inexperto, se puede automatizar, y puede utilizarse como método de escaneo con un número limitado de diluciones de las muestras. Dicha técnica tiene la ventaja de ser un método directo muy sensible, específica, rápida (24-48 horas) y aplicable a muestras obtenidas por diversos métodos. Su principal desventaja hasta la fecha es el costo del equipo (termociclador) con respecto a los inmunoensayos en donde se obtienen resultados cuantitativos; así mismo, permitiendo conocer por ejemplo, la respuesta inmunológica de las diferentes clases de Ig. Entre los inconvenientes de esta prueba serológica están la difícil selección del antígeno más adecuado para la prueba; la definición del "punto de corte", la verificación diaria de la confiabilidad de la prueba y también la reducción de los costos, relativamente elevados, del equipo necesario al igual que con la PCR. En comparación, existen también diversos factores que pueden afectar la concordancia entre la PCR y los inmuno ensayos, como la secuencia elegida como blanco para la amplificación y el método para purificar DNA en la PCR, el antígeno utilizado en

los métodos serológicos o las características de la población animal en estudio, entre otros (Venier, 1984; Kamps, 1990; Register *et al*, 1998).

En el presente estudio se utilizó la técnica de la PCR, como una herramienta para la detección del gen *prn*, el cual codifica para la proteína pertactina de *B. bronchiseptica*, con el fin de llevar a cabo (de forma temprana, rápida, específica y económica) la amplificación de un fragmento del gen que codifica a este factor de virulencia en cepas recién aisladas, lo que permitirá dar un criterio más de soporte a la identificación de cepas de dicha bacteria.

En investigaciones por parte de Hozbor y colaboradores, se ha detectado a *B. bronchiseptica* tomando iniciadores del gen que codifiquen a la flagelina, proteína importante en la estructura base de los flagelos de esta bacteria, (Hozbor *et al*, 2001). Register y colaboradores realizaron una comparación de las secuencias de genes importantes y compartidos entre *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*, aplicando la técnica de la PCR en tiempo real (RT) utilizada con anterioridad para *B. pertussis* por parte de Vincart en un ensayo anterior (Register, 1998; Vincart, 2007).

Un paso importante en la realización de una técnica de PCR es la elección del método de extracción de DNA y usarlo con la mejor calidad posible; entre las propiedades que hace que un método de extracción sea aceptable, están el rendimiento y la pureza del material genético obtenido, tiempo de realización corto, reducir el empleo de equipo sofisticado y usar reactivos con baja toxicidad (Jewtuchowicz, V. M., *et al*, 2007); es por eso que se utilizó la técnica de DNAzol la cual se ha reportado como un método rápido y confiable donde se emplean reactivos poco tóxicos, además de que se puede obtener un DNA bacteriano de calidad (Ausubel, *et al*, 1998).

Otro punto inicial que se estableció en el presente estudio fue el trabajar precisamente con la bacteria de interés (*B. bronchiseptica*), por lo cual se realizaron las pruebas primarias pertinentes (tinción de Gram, catalasa, oxidasa, motilidad, entre otras) y compararlas con la literatura. Las características fenotípicas observadas fueron: cocobacilos Gram negativos (sin agrupación), oxidasa positivos, catalasa positivos y motilidad positiva, pruebas bioquímicas las cuales son indicativas del género de

Bordetella. Las pruebas bioquímicas secundarias fueron realizadas en un trabajo de tesis para la caracterización de *B. bronchiseptica* y los resultados obtenidos coinciden con los reportados en la literatura, con la excepción de la prueba de la ureasa la cual resultó ser negativa para las tres cepas de origen bovino. Esta discrepancia no nos permite afirmar con seguridad la especie de estas cepas del género de *Bordetella*; por lo tanto, sería necesario hacer uso de técnicas de biología molecular, como el ensayo de secuenciación del gen 16S del RNA ribosomal (rRNA) el cual nos permite una identificación más clara del género y especie, teniendo la posibilidad de descubrir nuevas especies (Martínez y Francisco, 2009 tesis en proceso; Michael, 2007).

Con respecto a la extracción de DNA por medio de la técnica de DNAzol, únicamente fue necesario determinar la cantidad de muestra empleada para dicha extracción; la técnica por medio de DNAzol sugiere una cantidad aproximada de entre $1-3 \times 10^7$ células para lo cual se utilizaron como máximo 6 colonias aisladas, realizando varias extracciones para lograr la obtención de suficiente material genético. Cabe hacer mención que se realizó una modificación en uno de los pasos indicados en el manual para la extracción con DNAzol (Cat. No. 10503 DNAzol®. Gibco); este cambio se llevó a cabo en el paso que consistía en lavar el DNA obtenido con 1mL de etanol al 75% invirtiendo el tubo 6 veces, ya que el DNA se perdía al decantar el DNA lavado, implementándose como una buena alternativa, el centrifugar a 2000 rpm el DNA lavado con etanol al 75% y posteriormente decantarlo; con este paso se evitó la pérdida del DNA en el momento de los lavados y la obtención de una mayor cantidad de DNA extraído.

El corrimiento electroforético del DNA extraído de las diferentes cepas de *B. bronchiseptica* nos permitió observar una buena integridad del mismo, notando así que la técnica de extracción por DNAzol nos proporciona óptimos resultados de extracción de DNA bacteriano, a reserva de algunos cambios en el método propuesto, dependiendo de las necesidades de cada investigación.

La técnica de la PCR incluye como componentes, al DNA molde, soluciones amortiguadoras, cloruro de magnesio, los dNTPs, ambos iniciadores y la enzima DNA polimerasa, todos estos reactivos deben estar presentes en concentraciones óptimas para que en caso de presencia del DNA de interés, el cual sirve como molde, se logre la

amplificación del producto específico. Cabe aclarar que el producto específico obtenido con este estudio resultó estar en una localización distinta a la esperada, cuestión que se detallara más adelante.

Los reactivos para la técnica de la PCR utilizados involucran condiciones y parámetros que llegan a inhibir la reacción o a presentar inespecificidad de dicha técnica, como por ejemplo la utilización excesiva de cantidad de iniciadores que puede llegar a inhibir la reacción o producir una amplificación inespecífica, por lo que algunos autores recomiendan como máximo 200 picomoles (Ceja, 2009); así como la concentración de cloruro de magnesio, que cuando se usa más del requerido produce una disminución en la especificidad de la técnica, y si por el contrario se disminuye, se ve afectada la actividad de la enzima Taq polimerasa, la cual puede ser prácticamente nula no obteniendo ningún tipo de producto amplificado. Con respecto al DNA plantilla se debe utilizar una concentración estandarizada, ya que su utilización en exceso puede amplificar productos inespecíficos (siendo importante también para dicha cuestión la pureza del DNA) y utilizando una cantidad muy baja produce una deficiente cantidad de productos específicos amplificados por la PCR (Barrera, *et al*, 1993).

Considerando los reportes de las condiciones de trabajo empleadas por Frits para la realización de la PCR en cepas del género *Bordetella* (Frits, 1998), en la presente investigación se optimizaron los siguientes cuatro componentes de la técnica: la cantidad de DNA plantilla empleado (μg), la concentración de los iniciadores utilizados (nM), la concentración de la enzima Taq polimerasa (U) y la utilización u omisión de del reactivo DMSO (Frits, *et al*, 1998).

Con respecto al DNA bacteriano, la cantidad óptima para la amplificación del producto específico de 462 pb fue de 0.5 μg ; en este caso no hay comparación alguna, debido a que sólo se encontró un dato de cantidad utilizada de DNA molde para un método de RT-PCR descrito por Register que sugiere la utilización de 0.1 μg , pero utilizando un par de iniciadores diferentes (Frits *et al*, 1997) (Register, 2007).

Por otra parte, la concentración ideal de la enzima Taq polimerasa fue de 2 U, evidenciando el producto de 462 pb utilizando una cantidad menor no se obtuvo la

amplificación del producto específico para PRN. Comparado con otras investigaciones, Frits y colaboradores sugieren una concentración de 0.75 U de Taq, cabe señalar que en esta publicación los autores no mencionan el peso del producto amplificado el cual obtuvieron con las condiciones que especifican. Por otro lado, Vincart y Register utilizando un kit para PCR en el cual todos los componentes para la técnica ya vienen mezclados y no indican la concentración de la enzima Taq empleada (Frits *et al*, 1997; Register, 2007; Vincart, 2007).

Es importante mencionar que en el presente estudio fue necesario el uso del reactivo DMSO en el sistema de reacción de la PCR, debido a que solo se obtuvo la amplificación del producto específico cuando se incluyó este componente extra dentro de la reacción; omitiendo dicho reactivo no se obtuvo ningún producto amplificado, corroborando de esta forma que el DMSO ayuda a aumentar la especificidad de la reacción minimizando interferencias, además de inhibir las estructuras secundarias que puedan contener tanto el DNA molde como los iniciadores (Chakrabarti, 2001).

En cuanto a la cantidad de los iniciadores *prn AF* y *prn BR*, la concentración óptima de los mismos resultó ser de 0.01nM, ya que utilizando esta concentración se logró observar la amplificación del producto específico, dicha amplificación se confirmó realizando una electroforesis de geles de agarosa al 1.5%; cabe mencionar que utilizando concentraciones más altas de iniciadores también se obtenía el amplificado de 462 pb, pero se observaba difuso en los geles. Esta concentración de iniciadores es la misma que sugiere Frits en su investigación. En otros trabajos se recomienda un rango de 200 a 300 nM de cada uno de los iniciadores, dependiendo del fragmento de DNA que se requiera amplificar; considerando este aspecto se puede mencionar que el aporte de este trabajo con relación a los iniciadores es relevante, ya que la utilización de concentraciones más bajas de todos los componentes de la PCR, permitió la amplificación de un producto específico para *Bordetella* empleando el par de iniciadores *prn AF* y *prn BR* (Register, 2007; Vincart, 2007; Frits *et al*, 1997).

Para poder evaluar el buen funcionamiento de un sistema es importante incluir un control interno para el mismo, asegurando el correcto funcionamiento de las condiciones de trabajo estandarizadas, como son las cantidades de cada uno de los componentes

empleados y las condiciones de incubación en el termociclador; por lo tanto, en el presente estudio se decidió incluir en cada corrida de la PCR a un par de iniciadores que amplificaran un fragmento del gen que codifica para β -actina, obteniendo un producto de 303 pb. La β -actina cumple con los requerimientos para ser usado como control interno, debido a que es un componente estructural de la actina, una proteína importante del citoesqueleto de las células (William, C., *et al*, 2005).

Para poder utilizar a la β -actina como control interno del sistema de la PCR, también se evaluaron varias condiciones de trabajo, las cuales fueron las siguientes: 2 concentraciones de DNA (0.5 y 1 μ g/vial), 2 concentraciones de Taq (1U y 2U) y la utilización u omisión de DMSO.

Utilizando las condiciones del termociclador empleadas para amplificar el fragmento del gen *prn*, adicionando DMSO (al 10%) y trabajando cantidades de DNA, enzima Taq y de cada uno de los iniciadores (para β -actina) de 0.5 μ g, 2U y 1nM, respectivamente; se logró amplificar un producto de 303 pb, el cual es específico para el gen de β -actina. Cabe señalar que cuando se realizó la comparación de dos pares de iniciadores de diferentes especies (bovina y humana, iniciadores disponibles en laboratorio) para la amplificación del fragmento del gen de β -actina; obteniéndose mejores resultados con el par de iniciadores para β -actina bovina, debido a que se logró una mejor observación en el corrimiento electroforético del producto específico cuando se empleó este par de iniciadores que con los iniciadores para β -actina humana.

La especificidad del método implementado fue dictada por la utilización de DNA de otras bacterias Gram negativas y Gram positivas, diferentes a *B. bonchiseptica*, observando que al utilizar los iniciadores para la amplificación del fragmento del gen *prn* (*prn* AF y *prn* BR) no se amplificó el producto de 462 pb, y en algunos casos no se observó ningún producto.

Posteriormente, los valores de intensidad de la banda observada en los corrimientos electroforéticos fueron evaluados con el apoyo de un programa computarizado Kodak ID

3.6, con el fin de obtener un dato semicuantitativo y así poder comparar los productos deseados con los inespecíficos y descartar numéricamente esta cuestión.

Los datos obtenidos por el programa Kodak ID 3.6 los traduce en “unidades arbitrarias” (UA), por lo tanto, en la mayoría de los corrimientos de los geles analizados, los valores de intensidad correspondientes al producto amplificado de 462 pb, resultaron estar en un rango de 82 a 86 UA ubicando al producto específico amplificado por la técnica de la PCR en el mismo nivel en los geles de agarosa, empleando las condiciones definidas en el presente trabajo; no se obtuvieron datos de UA para las cepas diferentes a *B. bronchiseptica* debido a que no se observaron bandas que evidencien algún producto amplificado utilizando los iniciadores *prn* AF y *prn* BR, confirmando de esta forma la amplificación específica para *B. bronchiseptica*. Debido a que no se encontraron reportes en la literatura con respecto al análisis de la intensidad de las bandas, no se pudo comparar lo obtenido en el presente trabajo.

Cabe mencionar que en la realización de la estandarización de la técnica de la PCR utilizando los iniciadores *prn* AF y *prn* BR para la amplificación del fragmento del gen *prn*, se obtuvo un producto de 462 pb, que difiere con el reportado en la literatura (1400 pb); sin embargo este producto obtenido es específico de esta bacteria, evidenciado por las pruebas de secuenciación realizadas en el UBIPRO, localizado en la FESC Iztacala, UNAM, y corroborado en la base de datos “GenBank” con la cepa Tohama 50 de *B. bronchiseptica*; la comparación nos da una semejanza del 100% con las 323 pares de bases de la secuencia del genoma de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* exclusivamente. Cabe aclarar que aunque la secuencia del producto amplificado es específica para el genoma de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*, dicha secuencia nos remite a una proteína hipotéticamente conservada diferente a pertactina, indicando que la secuencia del producto amplificado en el presente trabajo no se encontró dentro del gen de pertactina.

Se sugiere utilizar como complemento al presente trabajo la técnica de la secuenciación del gen 16S del RNA ribosomal, ya que este gen se encuentra en toda la bacteria, la función y estructura del gen 16S (rRNA) no cambia con el tiempo descartando la posibilidad de variaciones al azar en las secuencias, es una técnica con una eficiencia del 97% en bacterias de fácil crecimiento, el gen de la sección 16s del RNA ribosomal (con un

peso de 1500 pb) es lo suficientemente grande para utilizarlo con fines informáticos; esta técnica se puede utilizar con el fin de realizar una identificación un poco más precisa del género y especie mediante la secuencia del gen 16s del RNA ribosomal, ya que es única para cada especie. Sin embargo, presenta una limitante con respecto a la técnica de la PCR propuesta en el presente estudio, que consiste en su bajo rendimiento (68%) en la identificación con bacterias de difícil crecimiento (Patel, 2001; Petti, 2007). La realización a futuro del análisis comparativo de secuencias de 16S rDNA la es necesaria para la identificación confirmativa de la especie de las cepas de *Bordetella* de origen bovino (ureasa negativa).

7. CONCLUSIONES

- Se logró el crecimiento y conservación de la cepa de *B. bronchiseptica* para ser utilizada en la extracción de material genético.
- Se obtuvo la identificación mediante pruebas bioquímicas de las cepas de *Bordetella* de origen bovino, ureasas negativas.
- Se obtuvieron buenos rendimientos con el método de DNAzol modificado resultando ser muy adecuado para la extracción de DNA bacteriano.
- La concentración óptima de los geles de agarosa fue de 1.5% para el corrimiento electroforetico y la identificación de los productos amplificados.
- Se lograron las condiciones de trabajo de la PCR mas apropiadas para la amplificación del producto del control interno del sistema (β -actina; 303pb), las cuales fueron 0.5 μ g de DNA molde, 2U de enzima Taq polimerasa y la adición con utilización de DMSO al 10%.
- Se estandarizó la técnica de PCR para lograr la amplificación de un producto específico de *Bordetella* (462pb) obteniendo las siguientes condiciones : 0.5 μ g de DNA molde, 2U de la enzima taq polimerasa, 1nM de iniciadores (*prnAF* y *prnBR*) y la utilización de DMSO al 10%.
- Se obtuvo un producto que codifica para una proteína hipotéticamente conservada y que es específica para *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*.

8. ANEXO

Solución Tris (1 M Trizma- 10mM EDTA).

Se pesaron 248.2 mg de EDTA y 1.83 g de Trizma, se mezclaron en 15 ml de agua destilada hasta disolución total y se almacena a temperatura ambiente en un frasco ambar.

Solución de etanol al 70 y 90%.

Se ponen 70 ml y 90 ml, de etanol absoluto en probeta respectivamente y se aforan a 100 ml con agua destilada. Se almacenan en tubos de plástico o de vidrio a temperatura ambiente, perfectamente tapados

Buffer de conservación.

La concentración de este buffer es de 10 mM trizma-1 mM EDTA a pH 8. Para preparar 15 ml, se pesan 23.85 mg de trizma y se disuelven en un volumen adecuado para ajustar el pH a 8, a esta solución se le agregan 5.6 mg de EDTA y se afora a 15 ml. Puede guardarse a temperatura ambiente o en refrigeración.

Preparación de gel de agarosa para electroforesis.

Dependiendo de la concentración se pesa la cantidad de agarosa. En el caso del gel de agarosa al 0.7%, para preparar 45 ml de gel, se pesan 315 mg de agarosa y se disuelven en matraz Erlenmeyer por calor en horno de microondas por 30 segundos, con 45 ml de BTE 0.5 X (Tris-borate-EDTA) recientemente preparado, asegurando que la mezcla se mantenga dentro del matraz Erlenmeyer y se agita hasta disolución total, se deja enfriar a temperatura ambiente a alrededor de 40 o 50 ° C, se añaden de 1.35 µL BrEt a una concentración de 10 mg/ ml, se agita levemente, se vacía (antes de que gelifique) en la cámara de electroforesis, y se coloca un peine de 12 u 8 carriles, después de gelificación, se retira el peine, quedando listo para poner las muestras en los carriles correspondientes y después correr la electroforesis.

Buffer de carga 5X

50% Glicerol

15mM de EDTA

0.6% Azul de bromofenol

Bromuro de Etidio (BrEt) 10 mg/mL

Solo se disuelven los 10 mg de BrEt en agua destilada, el BrEt es muy soluble y se preparan los mL que se vayan a emplear.

Dimetilsulfóxido al 10% (DMSO)

0.1 g de Dimetilsulfóxido

10mL de agua destilada

Solución de DNazol

Tiocianato de guanidina al 60%

Las marcas de los reactivos empleados fueron: Sigma, Invitrogene, Baker, Dibico, Bioxon, Gibco.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Ackerman, M and Researcher Group of ISUS College of Veterinary Medicine. 1997 in: Iowa State University Office of Biotechnology. Vol. XI, 6th Edition.
2. Ackermann, M.R.; Debey, M.C.; Register, K.B.; Larson, D.J.; Kinyon, J.M.; 1994. Tonsil and turbinate colonization by toxigenic and nontoxigenic strains of *Pasteurella multocida* in conventionally raised swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6, 375–377.
3. Ausubel; 1998; The epidemiology of resistance to ofloxacin and oxacillin among clinical coagulase-negative staphylococcal isolates: analysis of risk factors and strain types. *Clin Infect Dis.* 72-9.
4. Barrera; 1993: Simple method for isolation of very high molecular weight DNA from *Drosophila* embryos. *Nucleic Acid Res.* 4985-6.
5. Bassinet; 2000; Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immunology.* 1934-41.
6. Bauwens, E.J; Spach, D.H.; Schacker, T.W.; Mustafa, M.M.; Bowden, R.A.; 1992. *Bordetella bronchiseptica*. Pneumonia and Bacteriemia following bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, pp 2474-2475.
7. Bemis, D.A.; Wilson, S.A.; 1985. Influence of potential virulence determinants on *Bordetella bronchiseptica*- induced ciliostasis. *Infection and Immunity.* 50, pp 35-42.
8. Burns, E.H; Norman, J.M; Hatcher, M.D.; Bemis, D.A.; 1993. Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, pp 1838-1844.

9. Carter, G. R., et al., 1994 Bacteriología y Micología Veterinarias Aspectos Esenciales. El manual Moderno S.A de C.V, México D. F Pág. 341-345.
10. Ceja; H.; 2009; Implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando el par de iniciadores 18S-A1/18S-A2 para la identificación de *Aspergillus*. UNAM FESC.
11. Chakrabarti, R.; Schutt, C.E.; 2001. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones, *Gene* 274 (1-2): 293–298.
12. Confer; 1982; Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*. 948-50.
13. Cowart; 1989; *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. *Can J Ven Res*. 295-300.
14. D'Amore, E.; Quondam, G.; Borrello, P.; Panzini, G.; Lorenzini, R.N.; 2000. An outbreak of bacterial pneumonia in a group of guinea pigs: All glass impinger as a method to isolate the pathogens from the environment. *Animal Technology*, 51, pp 9-12.
15. Deeb, B.J; Digiacomio, R.F; Bernard, B.L; Silbernagel, S.M.; 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infection in rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*. Jan, pp70-75.
16. Dworkin; 1998; Pertussis in adults. *Ann Inter Med*. 1047-1048.
17. Gerlach; 2001; Vital bleaching with whitening strips: summary of clinical research on effectiveness and tolerability, 1-16.
18. Good, R.C.; May B.D., 1971. Respiratory pathogen monkeys. *Infec Immun*. 3, pp87-93.
19. Goodnow R., 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Review*. 44 (4), 728–733.

20. Griffith, J.W.; Brasky, K.M; Lang, C.M.; 1997. Experimental pneumonia virus of mice infection of guineapigs spontaneously infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Laboratory Animals*, 31, pp 52-57.
21. Gross R, Arico B, Rappuoli R, 1989. Families of bacterial signal transducing proteins. *Mol. Microbiol*, 3, pp 1661-7.
22. Gueirard; 1995; Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *Journal Clinical Microbiology*. 2002-6.
23. Gyles, L.C., et. al., 2004 *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 3ed Blackwell Publishing USA Pág.259-267
24. Harris D.L., Switzer W.P., 1972. Immunization of pigs against *Bordetella bronchiseptica* infection by parenteral vaccination. *Am. J. Vet Res*, 33, pp 197-84.
25. Hoskins, J.D; Williams, J; Roy A.F.; Peters J.C; McDonough, 1998. Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* from cats in southern Louisiana. *Vet. Immunopathol* 65:173-176.
26. Hozbor D., Fouque F., Guiso Nicole. 2001. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol*. 150 pp. 333-341.
27. Hozbor; 1999; Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiology*. 333-341.
28. Jewtuchowicz, V.M; Finquelievich, J.L.; E. Durán, M. T. Mujica, C. A. Iovannitti. (2007).
29. Comparación de métodos de extracción de ADN de sangre para detectar ADN fúngico por PCR. *Revista Argentina de Microbiología*. 39: 15-18

30. Kadlec, K.; 2005. Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother.* 485-90.
31. Kamps, A.M.; Buys, W.E.; Kamp, E.M.; Smits, M.A.; 1990. Specificity of DNA probes for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 1858–1861.
32. Keil, D.J.; Burns, E.H.; Kisker, W.R.; Bemis, D; Fenwick, B.; 1999. Cloning and immunologic characterization of a truncated *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin fusion protein. *Vaccine*; 18:860-867.
33. Keil, D.J.; Fenwick, B.; 2000. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infections tracheobronchitis in dogs. *JAVMA*, Vol 212, No2, 200-207.
34. Kobisch, M.; Novotny, P.; 1990. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. and Immunity.* 58, pp 352-357.
35. Koneman, 2003, *Diagnóstico Microbiológico*, 2da edición, Editorial Médica Panamericana.
36. Kraft, V.; Deeny, A. A.; Blanchet, H.M.; Boot, R.; Hansen, A.K.; Hem, A.; Van Herck, H.; Kunstyr, I.; Milite, G.; Needham, J.R.; Nicklas, W.; Perrot, A.; Rehbinde, C.; Richard, Y.; Vroey, G.; 1994. Report of the FELASA Working Group on Animal Health. Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. *Laboratory Animals*, 28, pp 1-12.
37. Llombart; 2006: Necrotizing pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in an immunocompetent woman. *Arc Bronconeumol.* 255-256.
38. Locht, C.; Bertin, F.; Menozzi, F.D.; Renauld, G.; 1993. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella spp.* *Molecular microbiology*, 9, pp 653-660.

39. Loeffler J., 2001. Nucleic acid sequence-based amplification of *Aspergillus* RNA in blood samples, *Journal of clinical Microbiology*. vol. 39, Nro. 4, p. 1626-1629
40. Luque, J. y Herráez, A. 2001. "Biología Molecular e Ingeniería Genética". Editorial Harcourt. Madrid, España. Pág.:188-192
41. Martínez y Francisco; 2009; Aislamiento, Identificación Y Caracterización De Cepas De *Bordetella bronchiseptica* De Origen Bovino Y Humano. Tesis en proceso.
42. Matoo; 2005; Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical Microbiology Rev.* 326-82.
43. McFaddin. *Pruebas bioquímicas en la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Panamericana. México, 1994.
44. McGowan; 1998, Concomitant viral and *Bordetella pertussis* infections in infants. 343-344.
45. McMillan; 1996; Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*. *Microb. Pathog.* 379-94.
46. Merchant L.A, Parker R.A, 1973. *Bordetella bronchiseptica*. *Bacteriología y Virología veterinarias*. Editorial Acribia. España. pp 390-393.
47. Michael B., 1982. *Bordetella*. *Bacteriologie Medicale*. Cap 25, pp 462-473.
48. Parkhill, J.; 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics* 35, 32-40.

49. Phillips; 1943; *Alcaligenes* (*Brucella*) *Bronchisepticus*: as a factor in Porcine Pneumonias. 58-9.
50. Pitman, M., 1974. Genus *Bordetella* Moreno-López 1952, 282-283. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
51. Portugal, Q. S., 1995 Tesis de Licenciatura. Estudio Preeliminar de la Hemolisina de *Bordetella bronchiseptica*. FESC – C1 UNAM. Pág.1-10, 34-35.
52. Register K.B., Lee R.M., Thompson C., 1998. Two-color hybridization assay for simultaneous detection of *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* from swine. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3342–3346.
53. Register, K.B. 2000. Ribotyping and restriction endonuclease analysis reveal a novel clone of *Bordetella bronchiseptica* in seals.
54. Register K.B., DeJong K.D., 2006. Analytical verification of multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Veterinary Microbiology*, 117, pp 201-210.
55. Register, K.B. 2007. Misidentification of *Bordetella bronchiseptica* as *Bordetella pertussis* using a newly described real-time PCR targeting the pertactin gene. *Journal Medical Microbiology*, 399-400.
56. Smith, I.M.; Baskerville, A.J.; Bronthwell, E.; 1982. Immunogenicity of Killed *Bordetella bronchiseptica* vaccine in the mouse. *Res. Vet. Sci.* 32, pp 248-252.
57. Songer, G. J., Post, W. K., 2005 *Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Elsevier Saunders. China. Pág. 147-153.
58. Venier, L.; Rothschild, M.F.; Warner, C.M.; 1984. Measurement of serum antibody in swine vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*: comparison of agglutination

- and enzyme-linked immunosorbent assay methods. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 2634–2636.
59. Vincart, B.; De Mendoza, R.; Rottiers, S.; Vermeulen, F.; Struelens, M.J.; Denis O.; 2007. A specific real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis*. *J Med Microbiol* 56, 918–920.
60. William, C., Pain, A., Anderson, M, J., Wortman, R., Stanley, H., Arroyo, J., *et al* , (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature. Letters*. Vol. 439. Pag. 1151-56.
61. Winsser J.A., 1960. Study of *Bordetella bronchiseptica*. *Proc. Anim. Care Panel*. 10. pp 87-104.
62. Wollfrey B.F, Moody J.A., 1991 Human Infections Associated with *Bordetella bronchiseptica*, *Clin Microbiol. Rev* 4, 243-255.
63. Zeligs, B.J.; Zeligs, J.D.; Bellant, J.A.; 1986. Functional and ultrastural changes in alveolar macrophages from rabbits colonized with *Bordetella bronchiseptica*. *Inf. Imm.* 53, pp 702-706.