

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas
causantes de traqueobronquitis infecciosa canina, Arequipa – 2024**

Tesis presentada por la Bachiller:

Machaca Quecara, Evangelina Yessenia

ORCID: 0009-0007-6843-6264

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:

Dr. Fernández Fernández, Fernando

ORCID: 0000-0001-6910-157X

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 21 de Mayo del 2025

Dictamen: 012448-C-EPMVZ-2025

Visto el borrador del expediente 012448, presentado por:

2019230162 - MACHACA QUECARA EVANGELINA YESSENIA

Titulado:

**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIACIÓN MOLECULAR DE DOS CEPAS CAUSANTES
DE TRAQUEOBRONQUITIS INFECCIOSA CANINA, AREQUIPA - 2024**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

**29470814 - ZEGARRA PAREDES JORGE LUIS
DICTAMINADOR**



**29327492 - VALDEZ NUÑEZ VERONICA ROCIO
DICTAMINADOR**



**29729675 - ZUÑIGA VALENCIA ELOISA GABRIELA
DICTAMINADOR**



Análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina, Arequipa – 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	15%	2%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	2%
3	dispositivosmedicos.org.mx Fuente de Internet	1%
4	ncgovote.org Fuente de Internet	1%
5	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
7	patents.google.com Fuente de Internet	1%
8	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	1%
9	www.clubensayos.com Fuente de Internet	1%
10	repositorioinstitucional.uabc.mx Fuente de Internet	1%
11	repository.ucc.edu.co	

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado con mi gratitud y amor a Dios, por ayudarme a sobresalir e inspirarme en el proceso, por darme fortaleza, salud por haber concluido las metas y el objetivo del presente estudio.

A mis seres queridos con mucho amor, cariño y gratitud, Aderlin mi pareja y James mi hijo, mis padres Basilio y Francisca. Por último, a mis hermanas y a mis compañeros de la universidad que me dieron fortaleza, confianza y su apoyo incondicional, moral a lo largo de la carrera.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme las fuerzas, voluntad, salud y fuerzas en todo momento para finalizar la investigación realizada.

A la Universidad Católica Santa María de Arequipa, a la Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas, en especial a la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a los docentes por haber impartido sus conocimientos en mi formación profesional.

Al Dr. Fernández Fernández, Fernando, Asesor de la presente investigación por la dedicación, por su experiencia, comprensión, confianza que contribuyo en la conformación fundamental de contenido del estudio.

A los miembros del jurado: Dra. Eloísa Gabriela Zúñiga Valencia, Dra. Verónica Rocío Valdez Núñez y Dr. Jorge Luis Zegarra Paredes, por su valioso tiempo, observaciones y aportes que permitieron mejorar la redacción y calidad final de este trabajo de investigación.

Finalmente, a todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente en la culminación y desarrollo del trabajo de investigación.

RESUMEN

La investigación titulada “Análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina, Arequipa – 2024” tuvo como objetivo analizar la secuenciación molecular de dos cepas bacterianas aisladas de 20 perros con signos clínicos de traqueobronquitis infecciosa. Para ello, se realizaron hisopados traqueales a los perros, en los cuales se identificaron bacterias mediante la tinción de Gram como parte del diagnóstico bacteriológico preliminar. Posteriormente, dos muestras fueron enviadas al laboratorio LABVETSUR para su aislamiento, identificación y purificación bacteriana. Inmediatamente después, las muestras fueron trasladadas al Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo E.I.R.L., a cargo del Dr. Julio César Bernabé. Donde se realizó la extracción de ADN y amplificación, luego fueron enviados para la secuenciación molecular al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Harvard, en Estados Unidos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las registradas en la base de datos GenBank utilizando herramientas bioinformáticas como BLAST y Sequence Match. Además, se construyeron árboles filogenéticos mediante el software MEGA 6 para analizar las relaciones evolutivas de las cepas, la reconstrucción filogénica se llevó a cabo aplicando el método Neighbour-joining y el método Kimura de dos parámetros. Los resultados mostraron que la cepa aislada de uno de los perros pertenece a una nueva especie del género *Enterococcus sp.*, con una alta similitud (99.89%) con la cepa TSGB1211 de *Enterococcus faecalis*. La segunda cepa fue clasificada como una nueva subespecie de *Enterococcus faecalis*, con una similitud del 99.59% respecto a la cepa O51 de *Enterococcus faecalis*. Los análisis filogenéticos confirmaron que ambas cepas son nuevas variantes dentro del género *Enterococcus*, respaldado por la robustez de los árboles filogenéticos generados. En conclusión, este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre las variantes bacterianas responsables de la traqueobronquitis infecciosa canina. Destaca la importancia de la bioinformática en la identificación y caracterización de nuevas cepas bacterianas, contribuyendo al avance de la microbiología veterinaria y al manejo de enfermedades respiratorias en caninos.

Palabras clave: Bioinformática, *Enterococcus faecalis*, Tos de las perreras.

ABSTRACT

The research titled “Bioinformatic Analysis of the Molecular Sequencing of Two Strains Causing Canine Infectious Tracheobronchitis, Arequipa – 2024” aimed to analyze the molecular sequencing of two bacterial strains isolated from 20 dogs showing clinical signs of infectious tracheobronchitis. To achieve this, tracheal swabs were taken from the dogs, in which bacteria were identified using Gram staining as part of the preliminary bacteriological diagnosis. Subsequently, two samples were sent to the LABVETSUR laboratory for bacterial isolation, identification, and purification. Immediately afterward, the samples were transferred to the Uchumayo DNA Biotechnology Institute E.I.R.L., under the direction of Dr. Julio César Bernabé, where DNA extraction and amplification were performed. The samples were then sent for molecular sequencing to the Molecular Biology Laboratory at Harvard University in the United States. The obtained sequences were compared with those registered in the GenBank database using bioinformatic tools such as BLAST and Sequence Match. In addition, phylogenetic trees were constructed using MEGA 6 software to analyze the evolutionary relationships of the strains. Phylogenetic reconstruction was carried out using the Neighbour-Joining method and the Kimura two-parameter model. The results showed that the strain isolated from one of the dogs belongs to a new species of the genus *Enterococcus* sp., with a high similarity (99.89%) to the *Enterococcus faecalis* strain TSGB1211. The second strain was classified as a new subspecies of *Enterococcus faecalis*, with a similarity of 99.59% to the *Enterococcus faecalis* strain O51. Phylogenetic analyses confirmed that both strains are new variants within the *Enterococcus* genus, supported by the robustness of the generated phylogenetic trees. In conclusion, this study provides new insights into the bacterial variants responsible for canine infectious tracheobronchitis. It highlights the importance of bioinformatics in the identification and characterization of new bacterial strains, contributing to the advancement of veterinary microbiology and the management of respiratory diseases in dogs.

Keywords: Bioinformatics, *Enterococcus faecalis*, Kennel Cough.

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Enunciado del Problema	3
1.2. Descripción del problema.....	3
1.3. Justificación del trabajo.....	3
1.3.1. Aspecto general	3
1.3.2. Aspecto tecnológico	4
1.3.3. Aspecto social.....	5
1.3.4. Aspecto económico	5
1.3.5. Importancia.....	5
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo general	6
1.4.2. Objetivos específicos.....	6
1.5. Hipótesis.....	6
CAPÍTULO II.....	7
2. MARCO TEORICO	8
2.1. Análisis bibliográfico	8
2.1.2. Traqueobronquitis infecciosa canina.....	8
2.1.2.1. Etiología	8
2.1.2.2. Transmisión	22
2.1.2.3. Patogenia	22

2.1.2.4. Sintomatología.....	23
2.1.2.5. Tratamiento.....	24
2.1.2.6. Prevención	25
2.1.3. Secuenciación molecular.....	26
2.1.3.1. El método de secuenciación de Sanger.....	27
2.1.4. El Gen 16S	30
4.1.5. Bioinformática.....	33
4.1.6. Herramientas bioinformáticas	34
2.2. Antecedentes de investigación	36
2.2.1. Análisis de tesis	36
2.2.2. Análisis de trabajos de investigación.....	39
CAPÍTULO III	42
3. MATERIALES Y METODOS	43
3.1. Materiales	43
3.1.1. Localización del trabajo	43
3.1.2. Materiales biológicos.....	43
3.1.3. Materiales de laboratorio	43
3.1.4. Materiales de escritorio	44
3.1.5. Equipos y maquinarias	44
3.1.6. Otros materiales.....	44
3.2. Métodos.....	45
3.2.1. Muestreo	45
3.2.2. Métodos de evaluación	46
3.3. Variables de respuesta.....	48
3.3.1. Variables independientes.....	48
3.3.2. Variable dependiente	48
CAPÍTULO IV	49

4. RESULTADOS Y DISCUSION	50
4.1. Resultados	50
4.1.1. Identificación de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina.	50
4.1.2. Comparación las secuencias obtenidas de las dos cepas con las 10 primeras secuenciaciones del banco de genes.	52
4.1.3. Análisis filogenéticos comparativo entre las cepas encontradas con las cepas registradas en GenBank.	56
4.2. Discusión.....	57
CAPÍTULO V	61
5. Conclusiones.....	62
CAPÍTULO VI.....	63
6. Recomendaciones	64
CAPÍTULO VII.....	65
7. Referencias.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de bronconeumonía por (Bb) en cachorros.....	14
Figura 2. Colonias de <i>Bordetella bronchiseptica</i> , cultivadas en agar sangre bovina a 37°C durante 48 h.	15
Figura 3. Colonias de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> cultivadas en agar sangre bovina a 37 °C durante 48 horas.....	17
Figura 4. Colonias de <i>Streptococcus canis</i>	18
Figura 5. Vista de colonias de <i>S. canis</i>	19
Figura 6. Tinción de Gram de <i>Streptococcus canis</i>	19
Figura 7. Representación esquemática de un posible ciclo de transmisión de <i>S. canis</i> ..	21
Figura 8. Factores de virulencia y fisiopatología de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	22
Figura 9. Secuenciación: método de degradación química	27
Figura 10. El método de secuenciación de Sanger en 7 pasos.	29
Figura 11. Ilustración de diferentes regiones variables	32
Figura 12. Árbol filogénico de la cepa de tráquea de Perro 1	56
Figura 13. Árbol filogénico de la cepa de tráquea de Perro 2	57
Figura 14. Placa Petri #1 (Pedro) debidamente identificada para envío a EE.UU	77
Figura 15. Placa Petri #2 (Candy) debidamente identificada para envío a EE.UU.....	77
Figura 16. Obtención de Muestra Canino #1 (Pedro).....	78
Figura 17. Obtención de Muestra Canino #2 (Candy).....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Agentes virales y bacterianos de traqueobronquitis infecciosa canina	9
Tabla 02. Informes de infección por <i>S. canis</i> en humanos.	21
Tabla 03. Operacionalización de las variables:	48
Tabla 04. Análisis bioinformático de la cepa de tráquea de Perro 1	52
Tabla 05. Análisis bioinformático de la cepa de tráquea de Perro 2	54



INTRODUCCIÓN

La traqueobronquitis infecciosa canina (TIC) es una enfermedad respiratoria de gran relevancia en la medicina veterinaria, cuya prevalencia afecta de manera significativa la salud de la población canina. Esta patología, causada por una interacción compleja de agentes virales y bacterianos, se ha identificado en diversas regiones del mundo, incluidas áreas de América Latina como Arequipa, donde se reportan casos recurrentes en caninos tanto domésticos como de establecimientos veterinarios (1). En este contexto, el análisis molecular de los agentes causantes de la TIC se convierte en una herramienta clave para comprender su diversidad genética, mecanismos de virulencia y posibles estrategias de prevención y tratamiento.

La presente investigación tiene como objetivo llevar a cabo un análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de esta enfermedad en la ciudad de Arequipa, a fin de caracterizar sus perfiles genéticos y obtener una visión más detallada de su comportamiento y evolución. Mediante el uso de técnicas avanzadas de bioinformática y genómica, se busca proporcionar un enfoque innovador en la identificación de variantes genéticas y su relación con los fenotipos patogénicos observados en las cepas estudiadas.

El estudio se enfoca en la caracterización de los datos de secuenciación obtenidos, con el fin de identificar posibles patrones epidemiológicos y biológicos que contribuyan al entendimiento de la etiología de la traqueobronquitis infecciosa canina en la región. Además, este trabajo pretende aportar al campo de la medicina veterinaria y la biotecnología, abriendo nuevas vías para la investigación de otras enfermedades respiratorias en caninos y otros animales de compañía.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enunciado del Problema

“Análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina, Arequipa – 2024”

1.2. Descripción del problema

La traqueobronquitis infecciosa canina, comúnmente conocida como tos de las perreras, es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa que afecta a perros de todas las edades. Esta enfermedad es causada principalmente por la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, la cual coloniza las vías respiratorias superiores y provoca síntomas como tos, estornudos y secreción nasal.

En la ciudad de Arequipa, Perú, se ha observado un incremento en los casos de traqueobronquitis infecciosa canina durante el año 2024. Es importante comprender las características genéticas de las cepas de causantes de dicha enfermedad presentes en la región para obtener información importante sobre su identificación molecular de la cepa en estudio.

El objetivo de esta tesis es realizar un análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas aisladas de perros con traqueobronquitis infecciosa en la ciudad de Arequipa durante el año 2024.

El análisis bioinformático permitirá identificar y comparar las secuencias genómicas de estas cepas con las existentes en el banco de genes. Mediante este estudio, se busca obtener información detallada sobre las características genéticas de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina presentes en Arequipa.

1.3. Justificación del trabajo

1.3.1. Aspecto general

El realizar el análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina en Arequipa se fundamenta en

la necesidad de obtener información precisa sobre las características genéticas de estas cepas y su implicación en la enfermedad. Este análisis permitirá identificar las variantes genéticas presentes en las cepas de causantes de traqueobronquitis infecciosa canina, lo cual es fundamental para comprender su diversidad genética, origen y posibles rutas de transmisión en la región. Además, el análisis bioinformático puede revelar genes asociados a la virulencia y posibles factores de resistencia a los tratamientos existentes.

La información obtenida a través del análisis bioinformático contribuirá a mejorar la comprensión de la epidemiología local de la traqueobronquitis infecciosa canina en Arequipa y permitirá el diseño de estrategias de control y prevención más efectivas. Asimismo, los resultados del análisis pueden ser utilizados para desarrollar herramientas de diagnóstico más precisas y vacunas más efectivas contra la enfermedad.

1.3.2. Aspecto tecnológico

El análisis bioinformático de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina en Arequipa se basa en el aprovechamiento de las herramientas y avances tecnológicos disponibles en el campo de la bioinformática y la secuenciación genómica. La secuenciación molecular ha experimentado un notable progreso en términos de eficiencia y costo, lo que ha permitido obtener secuencias genómicas a gran escala con mayor facilidad y asequibilidad. El análisis bioinformático es esencial para el procesamiento, análisis e interpretación de estos datos masivos de secuenciación genómica.

La aplicación de técnicas y algoritmos bioinformáticos avanzados permite identificar y comparar secuencias genéticas, encontrar variantes genéticas, predecir estructuras de proteínas, identificar genes de virulencia y analizar interacciones genéticas. Estas herramientas bioinformáticas ofrecen una visión detallada de la genética de las cepas causantes y su relación con la traqueobronquitis infecciosa canina. El análisis bioinformático también se beneficia del desarrollo de potentes computadoras, software especializado y bases de datos genómicas, que facilitan el procesamiento.

1.3.3. Aspecto social.

Conocer las características genéticas de las cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina en Arequipa puede ayudar a los profesionales veterinarios a realizar diagnósticos más precisos y brindar tratamientos más efectivos. Además, esta información puede contribuir a una mejor planificación de servicios veterinarios, mejorando la atención de los animales y fortaleciendo la relación entre los veterinarios y los dueños de mascotas.

El análisis bioinformático de las cepas causantes de tos de las perreras contribuirá al conocimiento científico en el campo de la genética y la microbiología. Estos avances pueden tener un impacto más amplio en la comprensión de otras enfermedades infecciosas y en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento tanto para animales como para seres humanos.

1.3.4. Aspecto económico

Al realizar el análisis bioinformático de las cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina en Arequipa radica en la mejora de la eficiencia en el diagnóstico y tratamiento, el desarrollo de herramientas diagnósticas y terapéuticas, la reducción de los costos de salud animal y el impacto positivo en la industria relacionada con las mascotas. Estos aspectos pueden contribuir a un manejo más eficiente de la enfermedad y generar oportunidades económicas tanto para los dueños de mascotas como para la industria veterinaria local.

1.3.5. Importancia

El análisis bioinformático permitirá obtener información precisa sobre las características genéticas de las cepas de esta enfermedad presentes en Arequipa. Esta información es determinante para comprender la epidemiología local de la traqueobronquitis infecciosa canina, incluyendo la diversidad genética de las cepas circulantes, su origen y posibles rutas de transmisión. Esta comprensión es principal para implementar estrategias de control y prevención adecuadas.

Así mismo, puede identificar variantes genéticas y genes de virulencia en las cepas de causantes de tos de las perreras. Esto puede ayudar a mejorar el diagnóstico de la enfermedad y a seleccionar tratamientos más efectivos y específicos. La identificación de factores de resistencia también puede guiar el uso adecuado de los antimicrobianos, evitando tratamientos ineficaces y la aparición de resistencia bacteriana.

El análisis bioinformático proporcionará información valiosa para el diseño de estrategias de control y prevención más efectivas de la traqueobronquitis infecciosa canina en Arequipa. Al comprender las características genéticas de las cepas, se pueden implementar medidas específicas dirigidas a prevenir la transmisión, limitar la propagación de la enfermedad y reducir su impacto en la población canina.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Analizar la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina mediante secuenciación molecular.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina.
- Comparar las secuencias obtenidas de las dos cepas con las 10 primeras secuenciaciones del banco de genes.
- Realizar análisis filogenéticos comparativo entre las cepas encontradas con las cepas registradas en GenBank.

1.5. Hipótesis

Dado que para determinar la secuenciación molecular es posible que al analizar y determinar la secuenciación molecular del gen 16S de las dos cepas en estudio se pueda identificar molecularmente la etiología de la traqueobronquitis infecciosa canina.



2. MARCO TEORICO

2.1. Análisis bibliográfico

2.1.2. Traqueobronquitis infecciosa canina

La traqueobronquitis infecciosa o “tos de las perreras” resulta de la inflamación de las vías respiratorias superiores. Es una enfermedad leve que normalmente mejora por sí sola. Sin embargo, puede progresar a bronconeumonía fatal en cachorros o a bronquitis crónica en perros debilitados, enfermos o ancianos. La enfermedad se propaga rápidamente entre perros susceptibles alojados en confinamiento cerrado, como hospitales veterinarios o perreras (1).

El estrés y los cambios ambientales, como los extremos de ventilación, temperatura y humedad, parecen aumentar la susceptibilidad del perro a la enfermedad, así como su gravedad (1).

2.1.2.1. Etiología

La traqueobronquitis infecciosa canina es una enfermedad multifactorial. Los agentes implicados en este complejo han incluido históricamente el virus de la parainfluenza canina (CPiV), el adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) y el herpesvirus canino tipo 1 (CHV), a menudo en conjunto con *Bordetella bronchiseptica* (2). Sin embargo, en las últimas dos décadas, los avances en la detección de patógenos han permitido la identificación de agentes adicionales en los casos de CIRDC, incluidos el coronavirus respiratorio canino (CRCoV), la influenza canina (CIV), el neumovirus canino (CPnV), *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus* y *Mycoplasma cynos*. (3,4). Otros agentes respiratorios caninos nuevos incluyen el neumovirus canino, el bocavirus canino, el hepacivirus canino, adenovirus caninos (especialmente CAV-2), reovirus y el picornavirus canino (5). Existe un debate sobre si estos son patógenos emergentes verdaderamente nuevos o patógenos preexistentes que ahora son más fáciles de detectar debido al advenimiento de herramientas de diagnóstico molecular sofisticadas y pruebas de diagnóstico más frecuentes. En los

últimos años, se ha cuestionado el papel de otros agentes bacterianos como *Mycoplasma canis* (5).

Tabla 01. Agentes virales y bacterianos de traqueobronquitis infecciosa canina (4).

Agente	Abreviación
<i>Virus de la parainfluenza canina</i>	CPiV
<i>Adenovirus canino tipo 2</i>	CAV-2
<i>Coronavirus respiratorio canino</i>	CRCoV
<i>Herpesvirus canino</i>	CHV
<i>Pneumovirus canino</i>	CnPnV
<i>Virus del moquillo canino</i>	CDV
<i>Virus de la influenza canina</i>	CIV
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
<i>Mycoplasma cynos</i>	<i>M. cynos</i>
<i>Streptococcus equi subespecie zooepidemicus</i>	<i>Strep. zoo</i>
<i>Streptococcus canis</i>	<i>S.canis</i>

2.1.2.1.1. Patógenos virales

- ***Virus de la Parainfluenza Canina (CPiV)***

El CPiV es un virus de ARN de cadena sencilla y envuelto de la familia Paramyxoviridae, encontrado en todo el mundo y considerado uno de los causantes más comunes de enfermedades respiratorias en perros. Los primeros estudios demostraron que el CPiV se propaga rápidamente en perros alojados en grupo; en perros militares y de laboratorio, la seroprevalencia del CPiV aumentó del 3% al ingreso al 72% después de seis semanas en alojamiento grupal, y el CPiV fue recuperado de un 50% de los perros con signos respiratorios. La prevalencia de CPiV ha disminuido con el tiempo gracias a los programas de vacunación agresivos. Sin embargo, el CPiV sigue siendo regularmente identificado en muestras de laboratorio diagnóstico, con tasas de prevalencia reportadas de hasta el 29% y una asociación significativa con signos clínicos leves y moderados/severos en al menos un estudio; lo más común es que ocurra en coinfecciones con *M. cynos* y *B. bronchiseptica* (5). El CPiV sigue estando implicado en brotes de enfermedades

respiratorias en perros y continúa siendo una preocupación para las poblaciones alojadas en grupo, incluidos aquellos en clínicas veterinarias (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria

Reino: Orthornovirae

Clase: Monjiviricetes

Orden: Mononegavirales

Familia: Paramyxoviridae

Género: Respirovirus

Especie: *Virus de la Parainfluenza Canina* (6).

- ***Adenovirus Canino Tipo 2 (CAV-2)***

Son virus de ADN no envueltos de la familia Adenoviridae. El CAV-2 fue reportado por primera vez en 1962 como la causa de un brote en un grupo de perros de laboratorio alojados en una universidad. El CAV-2 se replica en el epitelio de las cavidades nasal y faríngea, y en las células caliciformes de la tráquea, causando laringotraqueítis de inicio agudo. Similar al CPiV, el CAV-2 causa daño en las vías respiratorias superiores, lo que resulta en una tos característica de tipo "ronco". La replicación viral alcanza su pico dentro de una semana y luego disminuye rápidamente. Aunque el CAV-1 se asemeja a los adenovirus que causan infecciones respiratorias en los humanos, no se cree que sea zoonótico (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria

Reino: Bamfordvirae

Clase: Tectiliviricetes

Orden: Rowavirales

Familia: Adenoviridae

Género: Mastadenovirus

Especie: *Mastadenovirus canino A* (7).

- **Coronavirus respiratorio canino**

El CRCoV es un virus de ARN envuelto de la familia Coronaviridae, detectado por primera vez en 2003. Es importante señalar que el CRCoV es un Betacoronavirus, distinto del coronavirus canino GI (CCoV), que es un Alphacoronavirus. El CRCoV ha sido llamado el "virus cortacésped" debido a su característica de despojar los cilios respiratorios, lo que resulta en los signos clínicos clásicos de CIRD. Se ha recuperado CRCoV de muestras de tráquea y pulmones tanto de perros afectados como no afectados, aunque se recupera con mayor frecuencia de la tráquea de perros con tos leve (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria

Reino: Orthornovirae

Clase: Pisoniviricetes

Orden: Nidovirales

Familia: Coronaviridae

Género: Betacoronavirus

Especie: *Betacoronavirus 1*

- ***Herpesvirus canino***

Es un varicellovirus de la subfamilia Alphaherpesviridae; es un virus de ADN envuelto con distribución mundial. El CHV causa una infección sistémica fatal en cachorros neonatos. En perros adultos, el CHV afecta el epitelio respiratorio; los perros infectados experimentalmente muestran conjuntivitis, rinitis y faringitis. Se ha secuenciado CHV en muestras de pulmones y tráquea de perros alojados en refugios con enfermedad respiratoria, aunque con mayor frecuencia en perros severamente afectados con signos del tracto respiratorio inferior que en aquellos con Enfermedad Respiratoria Infecciosa Canina (CIRD, por sus siglas en inglés) clásico y leve (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria

Reino: Heunggongvirae

Clase: Herviviricetes

Orden: Herpesvirales
Familia: Orthoherpesviridae
Género: Varicellovirus
Especie: *Varicellovirus 1* (8).

- ***Pneumovirus canino***

Es un virus de ARN envuelto estrechamente relacionado con el pneumovirus murino (MPV), así como con el virus respiratorio sincitial humano (hRSV) y el virus respiratorio sincitial bovino (bRSV). El CnPnV se considera actualmente una enfermedad emergente y no se comprende bien la extensión de su patogenicidad. Fue descrito por primera vez en un estudio de 2010 sobre enfermedades respiratorias en dos refugios de animales de EE. UU (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria
Reino: Orthornavirae
Clase: Mononegavirales
Orden: Mononegavirales
Familia: Paramixoviridae
Género: Pneumovirus
Especie: *Pneumovirus canino* (9).

- **Virus del moquillo canino**

El CDV es un virus de ARN de cadena simple, relativamente grande, con envoltura, de la familia Paramyxoviridae y el género Morbillivirus. Durante las exposiciones naturales, se transmite por gotas aerosolizadas al epitelio respiratorio. La infección puede ser inaparentemente leve, grave o fatal. Los signos respiratorios, incluyendo conjuntivitis, ocurren de días a semanas después de la exposición, seguidos por signos gastrointestinales y luego anomalías neurológicas. El CDV tiene un período de eliminación relativamente largo, de hasta 16 semanas, en comparación con otros agentes de CIRD. El CDV es una enfermedad para la cual la

vacunación es protectora. Sin embargo, los perros no vacunados y los perros jóvenes son altamente susceptibles a la enfermedad (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria

Reino: Orthornavirae

Clase: Mononegavirales

Orden: Mononegavirales

Familia: Paramixoviridae

Género: Morbillivirus

Especie: *Morbillivirus canis* (10)

- **Virus de la influenza canina**

Los CIV son virus de ARN de cadena simple, envueltos, de la familia Orthomyxoviridae, que se clasifican en tipos A, B o C. Los virus de la influenza afectan a una gran variedad de mamíferos y aves, siendo el tipo A el que tiene el rango de hospedadores más amplio y la mayor tasa de mutabilidad (11). Los subtipos de A se especifican por dos glicoproteínas superficiales: hemaglutininas (HA 1-18) y neuraminidasas (NA 1-11), que se incorporan en la nomenclatura de diferentes cepas de la influenza. Las mutaciones puntuales frecuentes en el genoma viral permiten el "derrame" genético, contribuyendo a la impresionante capacidad de la influenza para saltar entre especies y evadir las estrategias de vacunación. El CIV no es zoonótico (4).

Taxonomía

Dominio: Riboviria

Reino: Orthornavirae

Clase: Mononegavirales

Orden: Articulavirales

Familia: Orthomyxoviridae

Género: Influenzavirus A

Especie: Virus de la influenza canina

2.1.2.1.2. Patógenos bacterianos

- ***Bordetella bronchiseptica***

Las bacterias del género *Bordetella* son de primera importancia en medicina humana y veterinaria debido a su capacidad para colonizar el tracto respiratorio, causando una amplia gama de infecciones pulmonares y bronquiales (1).

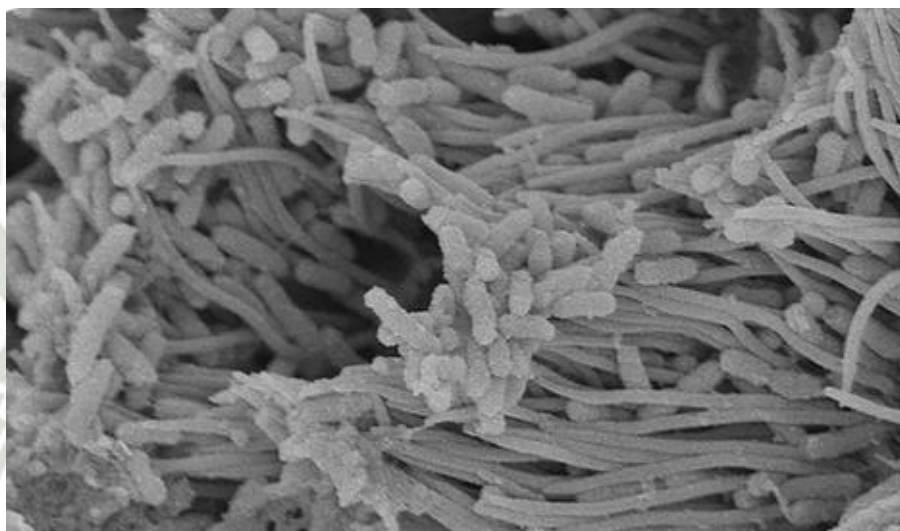


Figura 1. Microscopía electrónica de bronconeumonía por (*Bb*) en cachorros (12)

(A) *Numerosos cocobacilos se adhieren a los cilios de la mucosa bronquial*

Taxonomía

Dominio: Bacteria

Reino: Proteobacteria

Clase: Beta proteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Alcaligenaceae

Género: *Bordetella*

Especie: *Bordetella bronchiseptica* (3)

Características de *Bordetella bronchiseptica*

- **Macromorfología:**

Colonias pequeñas, de color blanco grisáceo y brillantes (1-2 mm de diámetro tras 24-48 horas de incubación). Puede producir una

fina zona de hemólisis en agar sangre bovina (pero no en agar sangre de caballo).

- **Micromorfología:**

Pequeños bastones móviles (0,2-0,5 x 0,5-2,0 μm), que aparecen solos o en pares (ver figura 2).

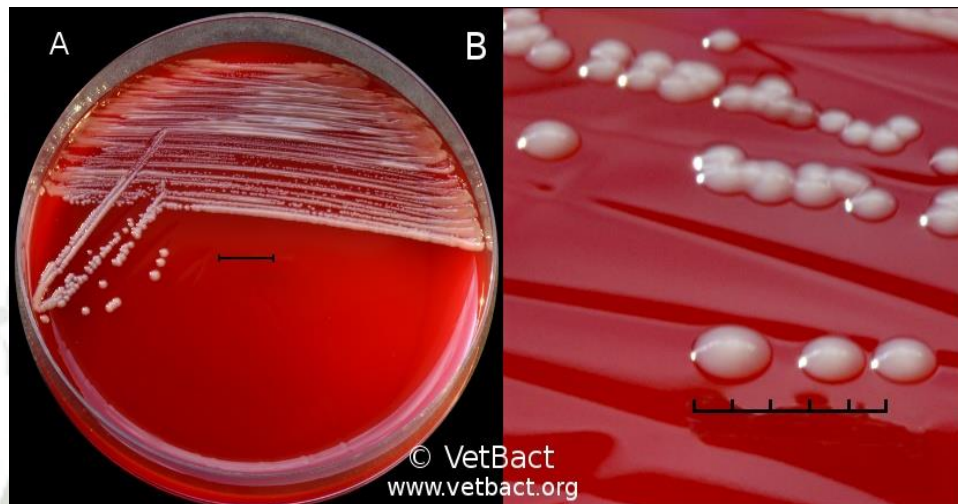


Figura 2. Colonias de *Bordetella bronchiseptica*, cultivadas en agar sangre bovina a 37°C durante 48 h (13).

Iluminación desde arriba durante la fotografía. B es un primer plano parcial de A. La longitud de las barras de escala en A y B corresponde a 10 y 5 mm, respectivamente.

- ***Mycoplasma cynos***

Mycoplasma es un género de bacterias que carecen de pared celular. Debido a que son organismos exigentes que requieren medios de cultivo complejos para ser cultivados, los micoplasmas probablemente no han sido reconocidos de manera adecuada a lo largo de la historia (4).

M. cynos se transmite a través de gotas de secreciones nasales y oculares, así como de la saliva. Colonizan tanto el epitelio respiratorio superior como inferior, pero esta colonización no siempre resulta en signos clínicos (4).

Un estudio de muestras enviadas a un laboratorio de diagnóstico veterinario encontró que *M. cynos* era uno de los patógenos más prevalentes, identificado en casi el 25% de todas las muestras. *M. cynos* se identificó más frecuentemente en perros sintomáticos, y hubo

una asociación significativa entre su presencia y signos clínicos moderados o graves. El mismo estudio también encontró una asociación significativa entre la gravedad de los signos clínicos y la presencia de *M. canis*, que no se había encontrado previamente asociada de manera significativa con enfermedades respiratorias. Ambas especies fueron reportadas en este estudio como infecciones comunes junto con otros agentes, particularmente con CPiV (4).

Taxonomía

Dominio: Bacteria

Reino: Monera

Clase: Mollicutes

Orden: Mycoplasmoide

Familia: Mycoplasmoidaceae

Género: Mycoplasma

Especie: *Mycoplasma cynos*

• ***Streptococcus equi subespecie zooepidemicus***

Strep. zoo es una bacteria beta-hemolítica que es un comensal de caballos, pero también se ha encontrado en perros, vacas, cerdos, monos, focas, llamas y humanos. Aunque generalmente se considera comensal, *Strep. zoo* puede actuar como patógeno primario en perros, especialmente en entornos densamente poblados, como perreras, donde puede causar neumonía aguda, hemorrágica y fibrinosupurativa, llevando a la muerte súbita en 24-48 horas. La enfermedad se caracteriza por signos respiratorios leves que rápidamente progresan a síntomas graves como fiebre, depresión, hemorragias nasales, y dificultad para respirar (4).

El huésped reservorio de *Strep. zoo* es el caballo, con transmisión presumida desde los caballos hacia todas las demás especies afectadas, incluidos los humanos y los perros. Hay un informe de transmisión de *Strep. zoo* de un perro a un manejador humano, confirmado mediante secuenciación molecular (4).

Taxonomía

Dominio: Bacteria

Reino: Bacillati

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae;

Género: Streptococcus

Especie: *Streptococcus equi* (14)

Características de *Strep zoo*

- **Macromorfología:**

Colonias pequeñas (1 mm de diámetro), transparentes y redondas después de la incubación durante 24 h a 37 °C en agar sangre. Las colonias se parecen a gotas de agua. Zona de hemólisis clara y amplia en agar sangre (beta-hemólisis).

- **Micromorfología:**

Cocos inmóviles en cadenas

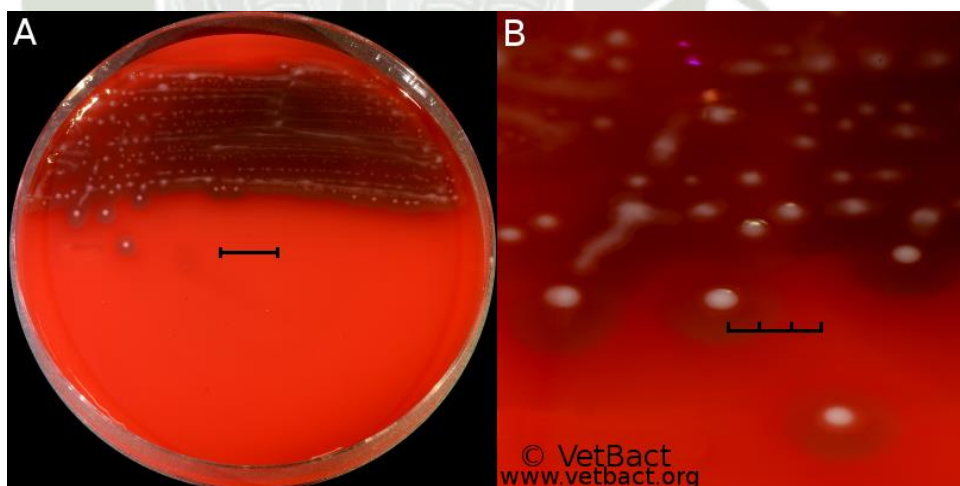


Figura 3. Colonias de *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* cultivadas en agar sangre bovina a 37 °C durante 48 horas (15).

La placa de agar fue fotografiada con luz desde arriba. B. Primer plano de algunas colonias de la placa de agar a la izquierda. Se puede observar la β-hemólisis en ambos paneles. La longitud total de las barras de escala es equivalente a 1 cm.

- ***Streptococcus canis***

Es un estreptococo β -hemolítico, del grupo G (piógeno) que coloniza la faringe, los tractos gastrointestinales (especialmente la boca), la mucosa genital y la piel de perros y gatos sanos.

Taxonomía

Dominio: Bacteria

Reino: Bacillati

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae;

Género: Streptococcus

Especie: *Streptococcus canis* (16)

Características de *S. canis*

- **Macromorfología:**

Colonias β -hemolíticas de tamaño mediano (1-2 mm de diámetro) después de la incubación durante 24 h a 37 °C en agar sangre.

- **Micromorfología:**

Cocos, que aparecen en pares o cadenas cortas (17).

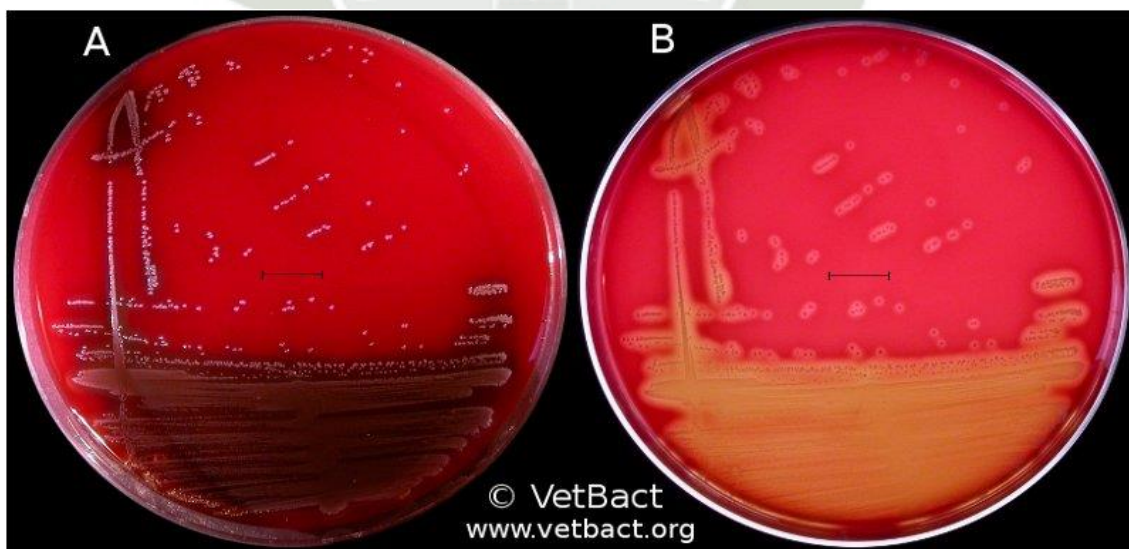


Figura 4. Colonias de *Streptococcus canis* (18).

A, Fotografiada con iluminación desde arriba. Nótese el color oscuro de la placa de agar. *S. canis* es esculinasa positiva. B, Fotografiada con iluminación desde abajo. Nótese la zona de hemólisis relativamente amplia, que se puede observar alrededor de las colonias en la placa B. La longitud de la barra de escala es equivalente a 1 cm.

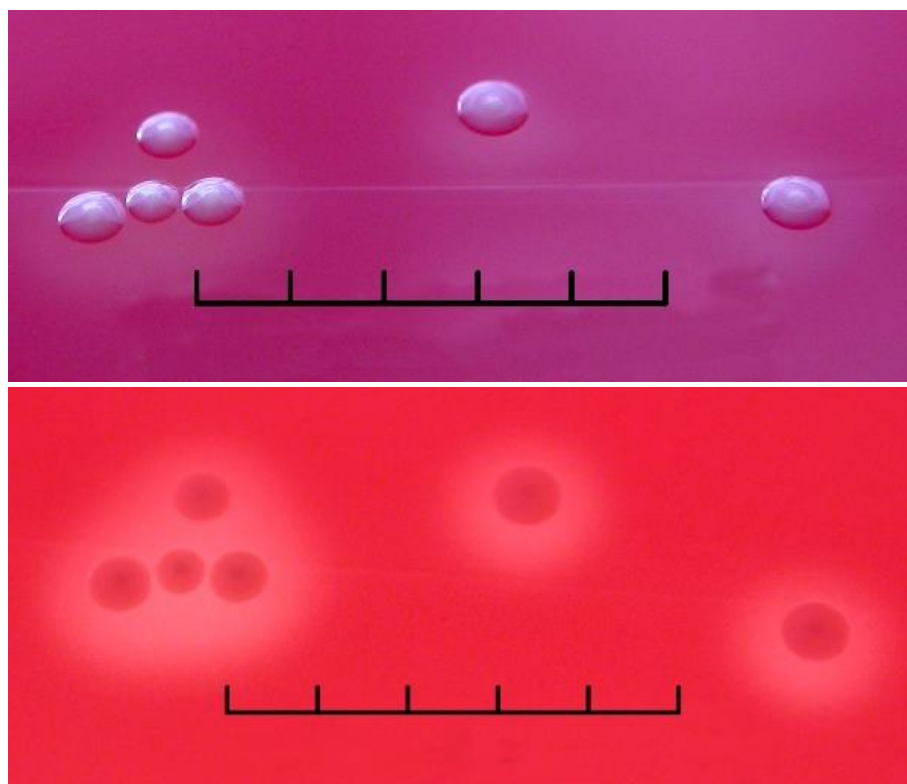


Figura 5. Vista de colonias de *S. canis* (19).

Cultivadas aeróbicamente en agar sangre bovina con esculina a 37 °C durante 24 h. Fotografiadas con iluminación desde arriba. La longitud de la barra de escala equivale a 1 cm.

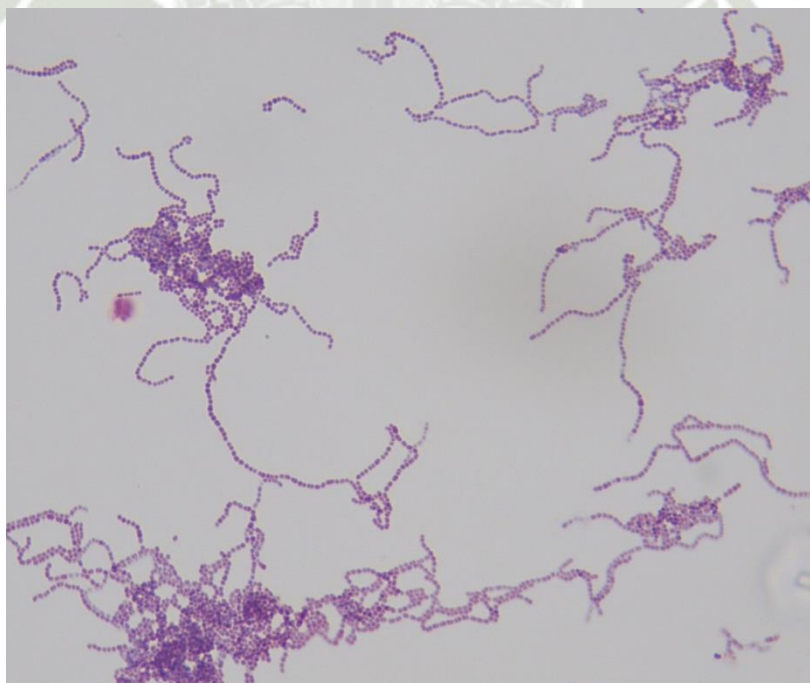


Figura 6. Tinción de Gram de *Streptococcus canis* (20).

Nótese que los cocos grampositivos forman cadenas largas.

Streptococcus canis es un patógeno multihuésped que causa enfermedades de diversa gravedad en una amplia gama de mamíferos, incluidos los humanos (21).

Epidemiología y presentaciones clínicas de la infección por *S. canis*

En animales de compañía: En perros y gatos, *S. canis* se considera un patógeno oportunista que puede colonizar la piel y las mucosas de individuos asintomáticos. Cuando está implicado en la enfermedad, *S. canis* se asocia principalmente con infecciones de la piel, siendo los sitios de aislamiento más comunes las cavidades oral y nasal, el canal auditivo externo, el recto y las mucosas genitales. Sin embargo, la infección en perros y gatos puede a veces provocar síndromes clínicos graves como artritis, miocarditis, fascitis necrosante, neumonía, meningitis, sepsis y síndrome de shock tóxico estreptocócico (STSS) (21).

En animales de producción: En el ganado, *S. canis* es una causa reconocida de mastitis. Eibl et al. informaron de un caso similar de un brote de mastitis subclínica bovina por *S. canis* asociado a un gato (22). Estos informes destacan la posible propagación de agentes infecciosos de las mascotas al ganado, lo que debe tenerse en cuenta al evaluar las medidas de bioseguridad en las granjas lecheras. Król et al. demostraron el potencial contagioso de *S. canis* entre vacas (23).

Papel en la salud humana

Parece que *Streptococcus canis* rara vez se aísla de los seres humanos, aunque la carga de infección real es difícil de estimar. Comparte la misma clasificación de Lancefield (grupo G) con otros estreptococos β -hemolíticos, como *S. dysgalactiae* y *S. anginosus*, reconocidos por infectar a los seres humanos. La determinación del grupo antigénico de Lancefield suele ser suficiente para fines de diagnóstico y salud pública y, por este motivo, es probable que se subestime la prevalencia de la infección por *S. canis* (21). Los informes de casos revisados de enfermedad humana asociada a *S. canis* se resumen en la tabla 02.

Tabla 02. Informes de infección por *S. canis* en humanos.

Especie hospedante	N° de casos	Manifestaciones clínicas	Factores predisponentes sugeridos	Referencia
Humano	1	Endocarditis	Comorbilidades, contacto directo con perro, > 60 años	(24) 2016
	1	Celulitis y bacteriemia	Comorbilidades, mordedura de perro, > 60 años	(25) 2017
	1	Infección articular periprotésica y septicemia	Prótesis de rodilla, arañazo de perro, > 60 años	(26) 2018
	1	Endocarditis	Comorbilidades, contacto directo con perro, > 60 años	(27) 2019
	1	Infección articular periprotésica	Comorbilidades, contacto directo con perro, > 60 años	(28) 2021

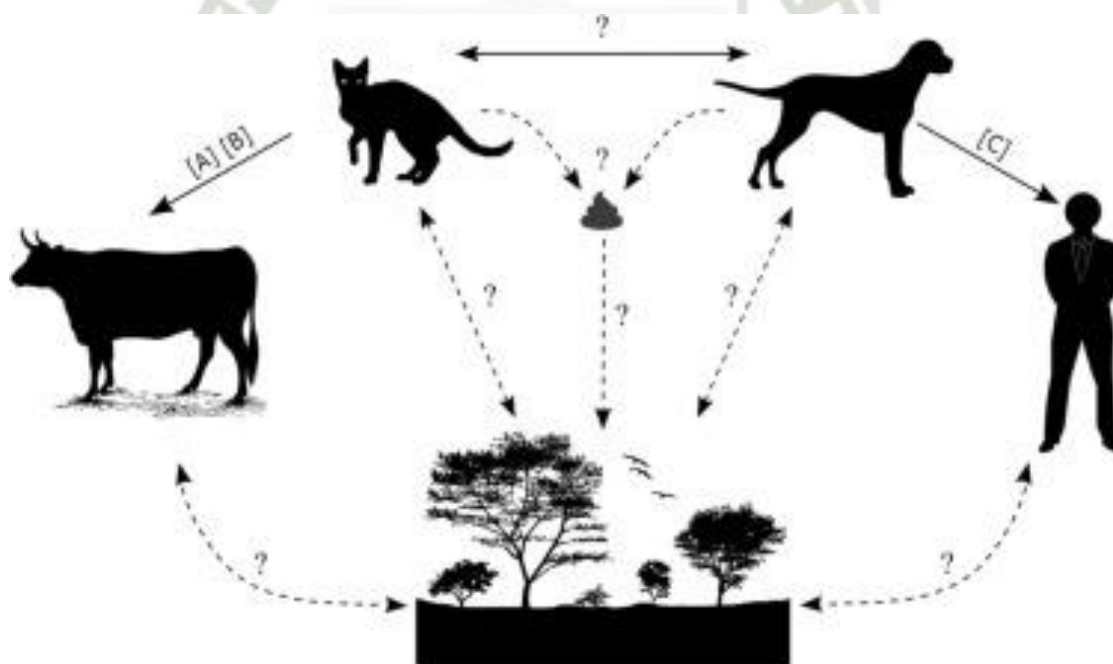


Figura 7. Representación esquemática de un posible ciclo de transmisión de *S. canis* (21).

Las principales especies hospedadoras de *S. canis* parecen ser los perros y los gatos. Se ha informado que los perros y los gatos son una fuente potencial de infección para los humanos y el ganado, respectivamente (A: (29) B: (22); C: (30)). *Streptococcus canis* se puede aislar con frecuencia del recto de perros y gatos, lo que implica que puede producirse una contaminación fecal del medio ambiente, aunque nunca se ha demostrado hasta donde sabemos. La contaminación ambiental puede ser una fuente de infección no solo para perros y gatos, sino también para otras especies susceptibles, a saber, la fauna silvestre y los seres humanos. En el diagrama, la transmisión de *S. canis* se representa mediante flechas sólidas (vía directa) y flechas discontinuas (vía indirecta). Se añaden signos de interrogación junto a las vías de transmisión que aún no se han demostrado.

2.1.2.2. Transmisión

La transmisión traqueobronquitis infecciosa canina es por vía aérea y es altamente contagiosa (31), la tos y los estornudos de un perro infectado pueden liberar gotas de saliva y moco al aire en forma de aerosoles. Estas partículas pueden contener la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, que es uno de los principales agentes causantes de la enfermedad. Los perros no infectados pueden inhalar estas partículas contaminadas y contraer la infección (32). También puede propagarse por contacto directo y a través de fómites (33).

2.1.2.3. Patogenia

Una vez inhalados, los organismos se adhieren a los cilios respiratorios por medio de moléculas de adhesión (adherencias fimbriales, hemaglutinina filamentosa, pertactina y lipopolisacáridos) (33).

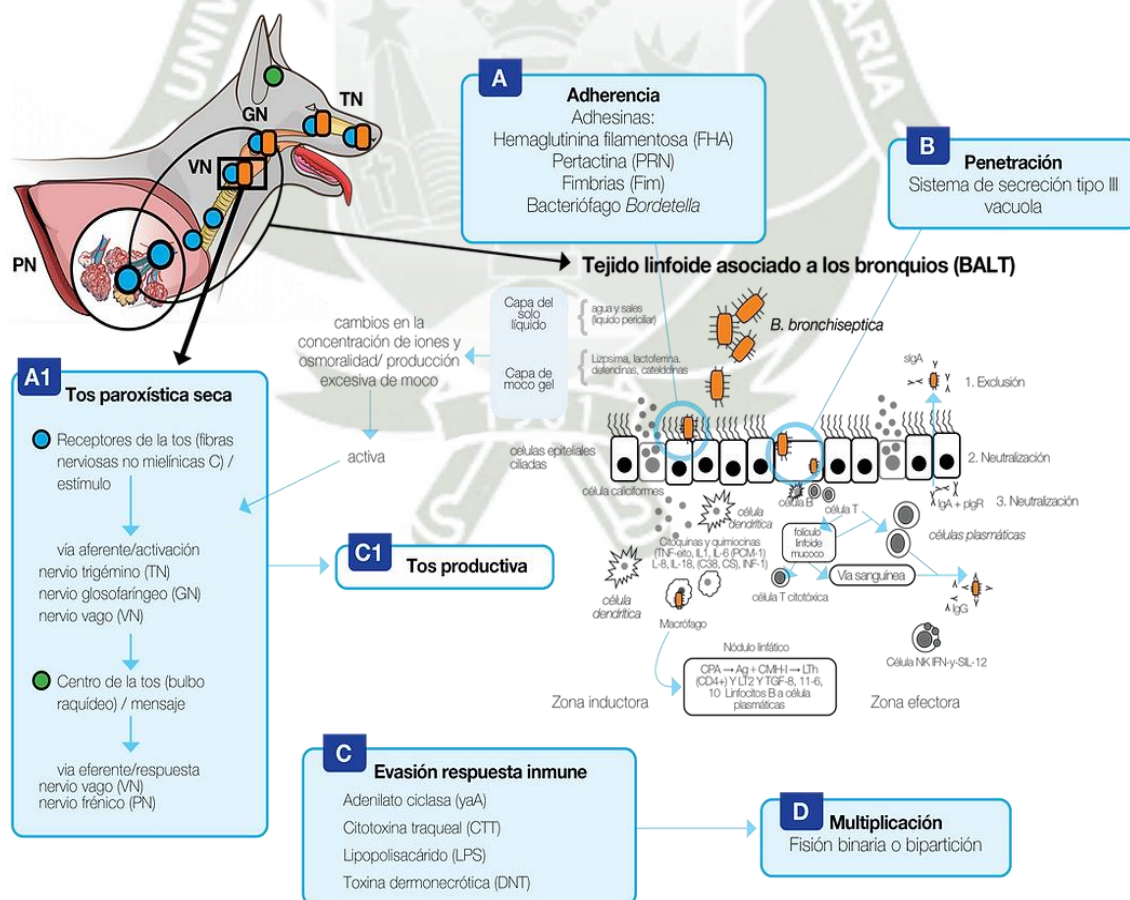


Figura 8. Factores de virulencia y fisiopatología de *Bordetella bronchiseptica* (34).

Los organismos pueden evadir las defensas del huésped utilizando factores de virulencia, como la cápsula externa o el antígeno O, que protege a las bacterias de la fagocitosis y los ataques mediados por el complemento (35). También se han descrito otros factores de virulencia, como los sistemas de secreción tipo III que permiten la colonización bacteriana, toxina adenilato ciclasa con propiedades antiinflamatorias y de evasión inmune y exotoxinas que provocan necrosis de las células epiteliales (36). Una vez que se ha establecido la colonización, la función alterada de las células epiteliales respiratorias provoca una secreción excesiva de moco y un mayor deterioro de las defensas inmunitarias innatas locales, lo que predispone al huésped a la infección por patógenos secundarios oportunistas. El período de incubación de *B. bronchiseptica* va de 2 a 10 días (31).

2.1.2.4. Sintomatología

La presentación clínica más frecuente es autolimitante si no se complica. Consiste en un cuadro de tos seca paroxística e hipertermia debido a la infección viral que causa traqueobronquitis (37).

Los perros afectados suelen estar alerta, activos y tener apetito. Pueden presentar secreción nasal serosa, estornudos y la tos suele ser cavernosa. El reflejo traqueal habitualmente es positivo (38).

En cuadros moderados puede haber tos productiva o estornudo inverso y disfonía si presentan laringitis y tonsilitis (38).

Los signos clínicos que provoca la infección por *B. bronchiseptica* varían en su gravedad porque dependen de la cepa bacteriana implicada, la inmunidad del hospedador y la presencia de confecciones. El periodo de incubación varía de 2 a 10 días, de forma que la sintomatología clínica se inicia entre el tercer y décimo día de la exposición. La rinitis y traqueobronquitis pueden cursar con secreción serosa o mucopurulenta, descarga nasal, estornudos, estertor y tos persistente, que suele ser paroxística. En algunos perros, cursa con bronconeumonía, fiebre, tos productiva, letargo y disminución del apetito (39).

Las presentaciones complicadas aparecen en cachorros y perros inmunodeprimidos, donde se produce coinfección viral y bacteriana. La tos se hace productiva y hay descarga nasal mucopurulenta. La infección progresa a bronconeumonía o neumonía, con surgidos sistémicos de fiebre, depresión y anorexia. Los casos de neumonía y bronconcumonía están más relacionados con la infección o confección bacteriana. La presencia de taquipnea y disnea es característica, así como los sonidos pulmonares (estertores y estridores) detectados en la auscultación. La presentación de queratitis suele deberse a la infección por CHV-1. La infección por CIV, en algunos casos, cursa con neumonía (40).

2.1.2.5. Tratamiento

La mayor parte de los casos leves no requieren intervención terapéutica al ser un proceso autolimitante. Pueden prescribirse antitusígenos cuando el cuadro de tos seca y paroxística persiste más de una o dos semanas. No se prescriben antitusígenos ante una tos productiva. Suele resultar útil sustituir el collar por un arnés para evitar que se estimule la tos y persista (37).

Debe administrarse un tratamiento antibiótico, generalmente doxiciclina, en los casos que no remiten y cuando se sospecha o confirma la infección bacteriana. No ayuda a eliminar la infección viral, pero se prescribe habitualmente para tratar o evitar la infección bacteriana oportunista. La doxiciclina tiene algunas ventajas, como presentar un espectro antibacteriano amplio y una baja incidencia de resistencias frente a *B. bronchiseptica*, pero tiene la desventaja de ser un bacteriostático y no un bactericida. Las resistencias bacterianas son relativamente frecuentes y hacen aconsejable el realizar cultivo y antibiograma.

En el caso de las infecciones por *B. bronchiseptica* son comunes las resistencias a antimicrobianos como la amoxicilina y el trimetoprim-sulfametoxazol (37).

Los casos graves, con bronconeumonía o neumonía bacteriana, requieren tratamiento de soporte con flui doterapia, masaje mediante golpes suaves, rápidos y secos (compage), oxigenoterapia y nebulización (37).

2.1.2.6. Prevención

La vacunación puede reducir la prevalencia de la enfermedad respiratoria en los perros. Las vacunas actuales no protegen contra todos los agentes etiológicos y no se consigue una inmunidad completamente efectiva, pero sí es posible que el desarrollo de la infección en perros vacunados de lugar a una clínica moderada.

Muchas de las vacunas contienen una combinación de virus y bacterias, mientras que otras incluyen un solo agente infeccioso. Se dispone de vacunas para CAV-2, CHIV-1, CIV y CPiV. Existen vacunas frente a CAV-2 y CPiV de administración intranasal y parenteral, pero los estudios que evalúan una u otra vía no son concluyentes en cuanto a duración de la inmunidad, interferencia con la inmunidad materna y rapidez o persistencia de la respuesta inmunitaria. Sí que se ha sugerido que la vacuna intranasal pueda tener menos interferencia con la inmunidad materna y provoque una respuesta inmunitaria más temprana, pero menos duradera. Por otra parte, la respuesta inmunitaria obtenida con una vacuna parenteral sería más prolongada e intensa (37).

Existe una vacuna inactivada de CIV que se emplea en países endémicos. Requiere la administración de una primera dosis a las 6 semanas de edad, 2 revacunaciones cada 3 semanas y una revacunación anual (37).

Las vacunas vivas atenuadas para *B. bronchiseptica* de administración oral o intranasal estimulan la inmunidad de las mucosas (IgA) en 3 días, no presentan interferencia con la inmunidad materna y confieren protección durante un año. Este tipo de vacunas no pueden administrarse a la vez que los antibióticos y resultan más adecuadas para cachorros que ingresarán en colectividades. Las vacunas inactivadas son de uso parenteral y confieren protección a partir de una semana después de la segunda dosis. A lo largo de los años, se han realizado diversos estudios sobre la eficacia de las vacunas contra *B. bronchiseptica* para conocer la respuesta inmunológica sistémica y local. Sin embargo, muchos de los estudios publicados presentan limitaciones debidas a su diseño experimental.

Persisten muchas dudas respecto a la duración de la inmunidad conferida por la vacuna, así como respecto a la inmunidad efectiva en condiciones naturales. Por lo tanto, existen dudas fundadas sobre la idoneidad y eficacia de las citadas vacunas (38).

2.1.3. Secuenciación molecular

Todos los organismos (bacterias, vegetales, mamíferos) tienen un código genético único, o genoma, que está compuesto de bases de nucleótidos (A, T, C y G). Si conoce la secuencia de las bases de un organismo, habrá identificado su huella o patrón de ADN único. La determinación del orden de las bases se llama secuenciación. La secuenciación del genoma completo es un procedimiento de laboratorio que determina el orden de las bases en el genoma de un organismo en un solo proceso (41).

Los científicos realizan la secuenciación del genoma completo siguiendo estos cuatro pasos principales:

- 1) Corte de ADN: los científicos comienzan usando tijeras moleculares para cortar el ADN, que está compuesto por millones de bases (A, C, T y G), en pedazos que son lo suficientemente pequeños como para que la máquina secuenciadora los lea (41).
- 2) Codificación de barras de ADN: los científicos añaden pequeños trozos de etiquetas de ADN, o códigos de barras, para identificar qué trozo de ADN cortado pertenece a qué bacteria. Esto es similar a cómo un código de barras identifica un producto en una tienda de comestibles (41).
- 3) Secuenciación de ADN : el ADN con código de barras de múltiples bacterias se combina y se coloca en un secuenciador de ADN. El secuenciador identifica las A, C, T y G, o bases, que componen cada secuencia bacteriana. El secuenciador utiliza el código de barras para realizar un seguimiento de qué bases pertenecen a qué bacteria (41).
- 4) Análisis de datos: los científicos utilizan herramientas de análisis informático para comparar secuencias de múltiples bacterias e identificar diferencias. La cantidad de diferencias puede indicar a los

científicos qué tan estrechamente relacionadas están las bacterias y qué probabilidad hay de que formen parte del mismo brote (41).

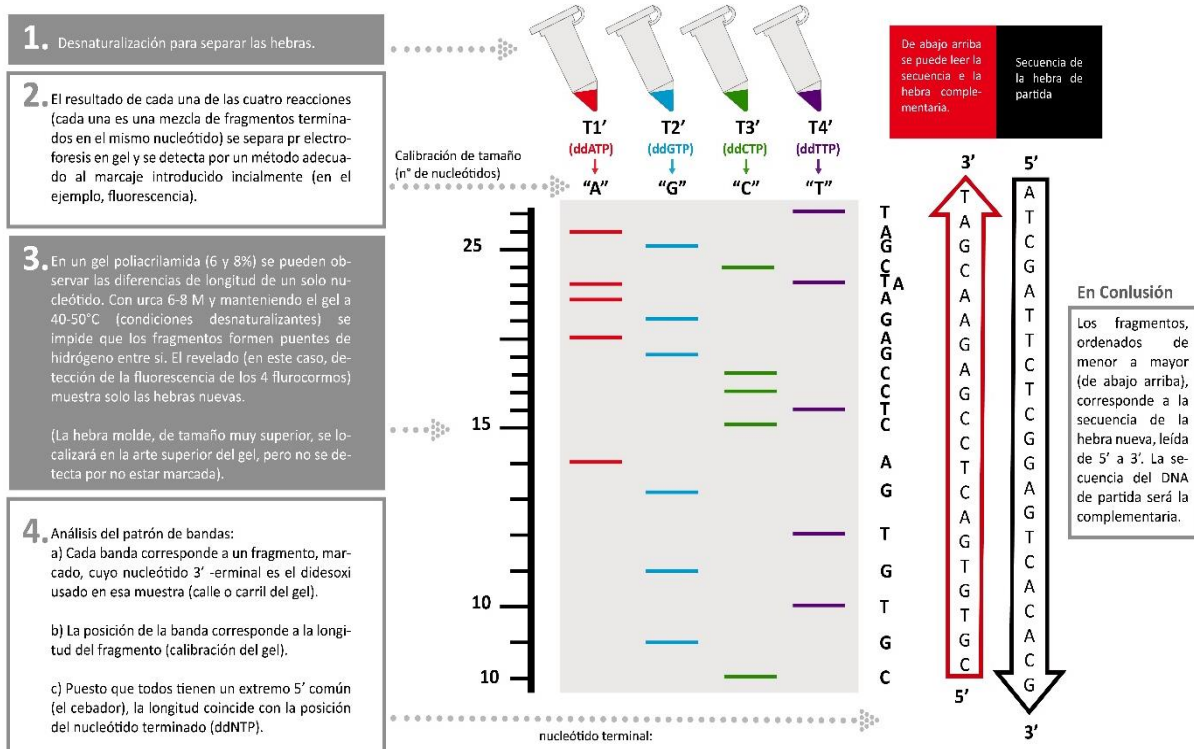


Figura 9. Secuenciación: método de degradación química (42).

2.1.3.1. El método de secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger es el método de secuenciación en el que se produce la incorporación de oligonucleótidos terminales de cadena como cebadores durante la replicación del ADN in vitro (43).

- **Principio de secuenciación de Sanger:** El método de secuenciación de Sanger sintetiza el ADN complementario a una plantilla de ADN monocatenario mediante la adición de trifosfato de desoxinucleótido y trifosfato de didesoxinucleótido marcados con un marcador fluorescente diferente que finaliza el alargamiento. En base a estas etiquetas, se identifica la secuencia (44).
- **Componentes de la secuenciación:** son los siguientes:

Plantilla de ADN: El material de partida para la secuenciación es una plantilla de ADN monocatenario que se va a secuenciar. En el método tradicional, el ADN monocatenario se obtenía utilizando un vector o desnaturalizando el ADN bicatenario con un método alcalino o de ebullición. Sin embargo, hoy en día, el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ayuda a obtener ADN monocatenario (45).

Cebador: El cebador es un oligonucleótido corto complementario a una secuencia corta de plantillas de ADN y se hibrida con él. La región de la molécula plantilla que se secuenciará es el papel crucial que desempeña el cebador (45).

Enzima ADN polimerasa: Extiende el cebador y agrega nucleótidos complementarios a la plantilla. Esta polimerasa carece de actividad exonucleasa, ya que puede degradar el nucleótido de 5'-3' o 3'-5' y afecta la precisión de la determinación de la secuencia (45).

Trifosfato de nucleótidos: En este método se utilizan dos tipos diferentes de nucleótidos: trifosfatos de desoxirribonucleótidos y trifosfatos de didesoxirribonucleótidos (45).

- Trifosfatos de desoxirribonucleótidos: son trifosfatos de nucleótidos típicos, que comprenden bases nitrogenadas (A, T, G, C), azúcar ribosa con un grupo hidroxilo en el carbono 3' y un grupo fosfato en el carbono 5' respectivamente, lo que ayuda a la formación de un enlace fosfodiéster. entre cada desoxirribonucleótido trifosfatos (45).
- Trifosfatos de didesoxirribonucleótidos: Son trifosfatos de nucleótidos modificados para que el carbono 3' del azúcar ribosa no tenga un grupo hidroxilo. Por lo tanto, se utilizan como terminadores de cadena de 3' extremos, ya que el enlace fosfodiéster no se forma con el siguiente nucleótido entrante (45).

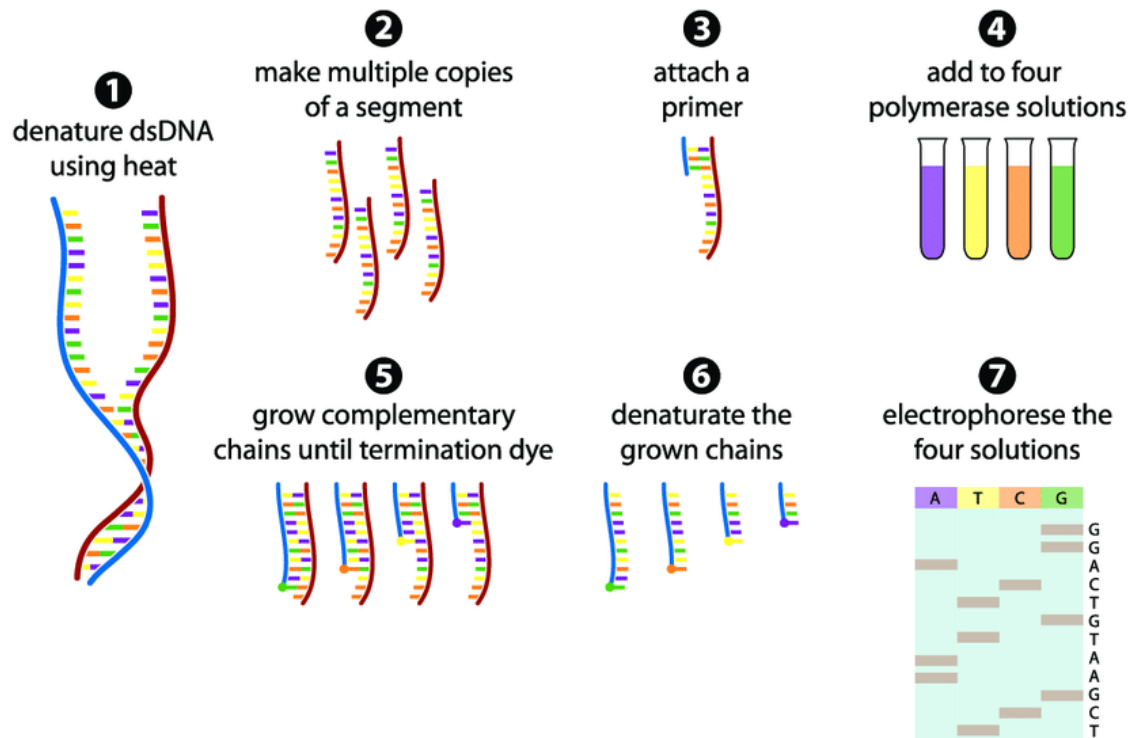


Figura 10. El método de secuenciación de Sanger en 7 pasos (46).

(1) El fragmento de ADNds se desnaturaliza en dos fragmentos de ADNss. (2) Un fragmento de ssDNA se multiplica en millones de copias. (3) Se adjunta un cebador que corresponde a un extremo del fragmento. (4) Los fragmentos se añaden a cuatro soluciones de polimerasa. Cada solución contiene los cuatro tipos de bases pero sólo un tipo de nucleótido de terminación. (5) La cadena crece hasta que se agrega aleatoriamente un nucleótido de terminación. (6) Los fragmentos de ADN ss resultantes se desnaturalizan para obtener una serie de ADN ss de diversas longitudes. (7) Los fragmentos se separan mediante electroforesis y se lee la secuencia.

- Pasos involucrados en la secuenciación de Sanger

Elongación y terminación de cadena.

La plantilla de ADN a secuenciar se somete a Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), excepto que también se incluye trifosfato de didesoxinucleótido. Los dNTP, la ADN polimerasa, el cebador y la plantilla se encuentran en la reacción de PCR típica (47).

El cebador se hibrida con el ADN molde y la ADN polimerasa extiende el cebador agregando aleatoriamente dNTP o ddNTP, pero una vez que se incorpora el ddNTP, la reacción finaliza. Estos desoxinucleótidos son más grandes que los didesoxinucleótidos, por lo que la terminación no se produce cerca de la región del cebador. Por ejemplo, si dATP se une durante el alargamiento, cesa el

alargamiento y la secuencia se lee como A (como se muestra a continuación). De manera similar, si se agrega ddGTP, ddTTP o ddCTP, la secuencia se lee como G, T o C, respectivamente (47).

Electroforesis e identificación de secuencias.

Después de la amplificación se lleva a cabo la electroforesis. La mezcla se carga en gel de poliacrilamida (en el método tradicional) o en un tubo con sistema de gel capilar. Estas moléculas están separadas según su longitud; cada uno contiene didesoxinucleótido en su extremo (47).

En el método tradicional, los productos se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en cuatro carriles separados y se puntúan según sus masas moleculares, como se muestra a continuación. En función de sus masas y de los ddNTP radiomarcados, se identifican las bases. Sus secuencias se muestran en el lado izquierdo de la figura siguiente. La identificación se realiza con la ayuda del espectrofotómetro (47). En la nueva técnica, los productos se separan en un único capilar de vidrio lleno de un polímero y se pasan a través de un detector fluorescente que determina si cada molécula termina en A, T, G o C según la etiqueta adherida a los didesoxinucleótidos (47).

2.1.4. El Gen 16S

El ARNr 16S (ARN ribosómico 16S) es un componente constituyente de la subunidad 30S en los ribosomas procarióticos. La "S" en 16S pertenece a la unidad de Svedberg, una medida que refleja la velocidad de sedimentación de moléculas grandes en un campo centrífugo: cuanto mayor es el valor, más grande es la molécula. El gen 16S rRNA es la secuencia de ADN que codifica el rRNA bacteriano y se encuentra en los genomas de todas las bacterias. Significativamente, el ARNr 16S está altamente conservado y es muy específico, con una secuencia genética de longitud suficiente (48).

Las secuencias de ARN ribosómico 16S se han utilizado ampliamente en la clasificación e identificación de bacterias y arqueas. La comparación de secuencias casi completas del gen 16S rRNA se ha utilizado ampliamente para establecer relaciones taxonómicas entre cepas procarióticas, reconociéndose actualmente una similitud del 98,65% como límite para delimitar especies. La comparación de la secuencia del gen 16S rRNA de un aislado con secuencias de cepas tipo de todas las especies procarióticas proporciona una manera precisa y conveniente de clasificar e identificar procariotas de forma rutinaria (49).

Detección de genes – ARNr 16S

La técnica de detección del gen 16S rRNA se ha convertido en la herramienta más utilizada para identificar y detectar patógenos como resultado de la tecnología de PCR y los avances sostenidos en la tecnología de investigación de ácidos nucleicos.

La tecnología es aplicable para reconocer, categorizar y encontrar patógenos a un ritmo más rápido y con precisión. Implica estos pasos: se recopila ADN genómico, se recolectan fragmentos del gen 16S rRNA y se analiza la secuencia genética del 16S rRNA (49).

Análisis de secuencia de ARNr 16s

El principio fundamental implicado en la técnica de análisis del ARNr 16S es obtener la información de la secuencia del ARNr 16S a partir de su fragmento del gen en la muestra del microbio mediante clonación. A esto le sigue la secuenciación o hibridación de sondas y el corte de enzimas, y luego su comparación con los datos de secuencia o información relacionada en la información del ARNr 16S. Esto se lleva a cabo para encontrar su lugar en el árbol evolutivo, identificando así las muestras probables (48).

La secuenciación del ARN ribosómico 16S se utiliza ampliamente en microbiología para encontrar diversidad en entidades procarióticas y otras entidades y, por tanto, estudiar la asociación filogenética entre ellas (49).

La secuenciación del gen rRNA implica los siguientes pasos:

- aislamiento de ADN
- Calentamiento para separar las hebras y primers específicos.
- Extensión del cebador con ADN polimerasa.
- Repita los pasos anteriores para obtener múltiples copias del gen 16S rRNA
- Ejecute gel de agarosa, verificando que el producto tenga el tamaño exacto.
- Purificación y secuenciación del producto de PCR (50).

ARNr 16S como marcador molecular

El gen 16S rRNA, debido a su presencia universal y características evolutivas únicas, ha sido ampliamente reconocido como un marcador molecular fundamental en la ecología microbiana. El trabajo pionero de Carl Woese y George E. Fox anunció su uso en estudios filogenéticos. Como señalaron Yang et al., las zonas rojas (es decir, V2 y V8) en el ARNr 16S, como se ilustra en la Figura 11, tienden a exhibir una resolución más baja a nivel del filo. Por el contrario, las zonas verdes (específicamente V4, V5 y V6) se correlacionan con la distancia geodésica más corta, lo que sugiere que pueden ser opciones superiores para análisis filogenéticamente orientados, incluidos aquellos que se centran en la delimitación de nuevos filos bacterianos (51).

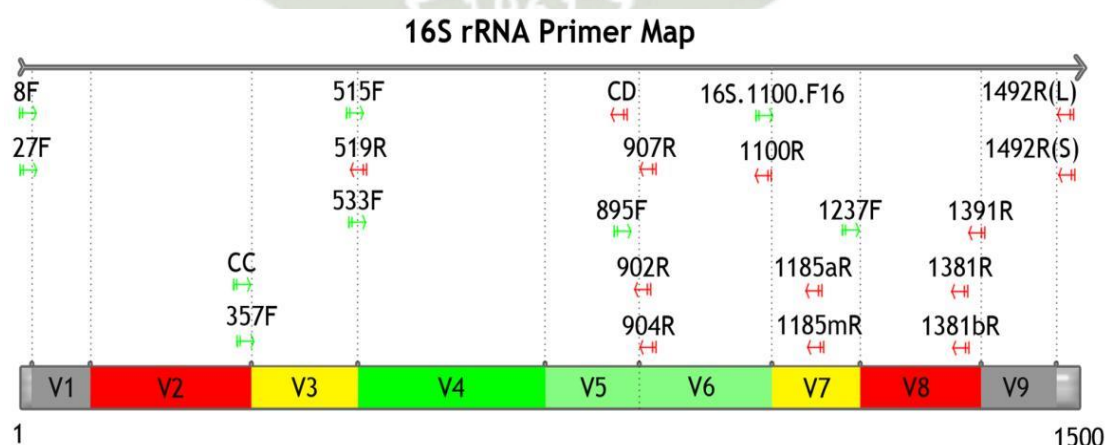


Figura 11. Ilustración de diferentes regiones variables (51).

4.1.5. Bioinformática

La bioinformática, relacionada con la genética y la genómica, es una subdisciplina científica que implica el uso de tecnología informática para recopilar, almacenar, analizar y difundir datos e información biológicos, como secuencias de ADN y aminoácidos o anotaciones sobre esas secuencias (52). El papel de la bioinformática en la investigación biológica se puede comparar con el papel del análisis de datos en la era de la información e Internet.

- **El análisis bioinformático**

El análisis bioinformático es una disciplina que combina la biología y la informática para interpretar y analizar datos biológicos, especialmente datos de alta dimensionalidad, como secuencias de ADN, ARN, proteínas y otros datos moleculares. La bioinformática utiliza enfoques computacionales y herramientas informáticas para extraer información valiosa, identificar patrones, realizar comparaciones y generar conocimiento a partir de datos biológicos complejos (53).

En el contexto de la biología molecular y genómica, el análisis bioinformático se utiliza para:

- **Secuenciación Genómica y Transcriptómica:** Analizar las secuencias de ADN o ARN para identificar genes, regiones reguladoras, mutaciones y otros elementos genómicos. También se utiliza para analizar la expresión de genes en diferentes condiciones (53).
- **Análisis de Proteínas y Estructuras:** Identificar dominios proteicos, predicción de estructuras secundarias y terciarias de proteínas, y análisis de interacciones proteína-proteína (53).
- **Filogenia y Evolución:** Construir árboles filogenéticos que representen las relaciones evolutivas entre especies utilizando secuencias moleculares (53).
- **Análisis de Rutas Metabólicas:** Modelar y analizar rutas metabólicas para comprender cómo las moléculas se transforman y se interconectan en los procesos celulares (53).

- **Diseño de Fármacos:** Identificar blancos terapéuticos, realizar cribado virtual y modelado molecular para el diseño de fármacos (53).
- **Biología de Sistemas:** Integrar datos de múltiples fuentes para comprender sistemas biológicos en su conjunto y cómo los componentes interactúan (53).
- **Predicción de Estructura y Función de Proteínas:** Utilizar algoritmos para predecir la estructura tridimensional y la función de proteínas a partir de secuencias (53).
- **Análisis de Expresión Génica:** Evaluar la expresión de genes en diferentes condiciones y contextos, como enfermedades o tratamientos (53).

4.1.6. Herramientas bioinformáticas

Las principales herramientas de un bioinformático son los programas informáticos e Internet. Una actividad fundamental es el análisis de secuencias de ADN y proteínas utilizando diversos programas y bases de datos disponibles en la red mundial. Cualquiera, desde médicos hasta biólogos moleculares, con acceso a Internet y sitios web relevantes ahora puede descubrir libremente la composición de moléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas mediante el uso de herramientas bioinformáticas básicas. Esto no implica que la manipulación y el análisis de los datos genómicos sin procesar puedan ser realizados fácilmente por todos (54).

La bioinformática es una disciplina en evolución, y los bioinformáticos expertos ahora usan programas de software complejos para recuperar, clasificar, analizar, predecir y almacenar datos de secuencias de ADN y proteínas (55).

Las grandes empresas comerciales, como las compañías farmacéuticas, emplean bioinformáticos para realizar y mantener las necesidades bioinformáticas complicadas y a gran escala de estas industrias. Con una necesidad cada vez mayor de aportes constantes de expertos en

bioinformática, la mayoría de los laboratorios biomédicos pronto tendrán su propio bioinformático interno. El investigador individual, más allá de una adquisición y análisis básico de datos simples, seguramente necesitaría asesoramiento bioinformático externo para cualquier análisis complejo (55).

El crecimiento de la bioinformática ha sido una empresa global, la creación de redes informáticas que han permitido un fácil acceso a los datos biológicos y han permitido el desarrollo de programas de software para análisis sin esfuerzo. Múltiples proyectos internacionales destinados a proporcionar bases de datos de genes y proteínas están disponibles gratuitamente para toda la comunidad científica a través de Internet (55).

- **Bases de datos biológicas**

Las bases de datos biológicas son repositorios electrónicos que almacenan y organizan una amplia variedad de información relacionada con la biología, la genética, la bioquímica, la ecología y otros campos de las ciencias de la vida. Estas bases de datos contienen datos experimentales, secuencias genéticas, información estructural, datos de expresión génica, información sobre proteínas, registros taxonómicos y más. Son herramientas esenciales para los científicos, investigadores y profesionales que trabajan en diversas áreas de la biología y la investigación biomédica (56).

- **GenBank:** Una de las bases de datos más grandes y conocidas que almacena secuencias genéticas de diversos organismos. GenBank es administrado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos. Esta base de datos está diseñada para proporcionar y fomentar el acceso dentro de la comunidad científica a la información de secuencias de ADN más actualizada y completa. Por lo tanto, NCBI no impone restricciones sobre el uso o la distribución de los datos de GenBank. Sin embargo, algunos remitentes pueden reclamar patentes, derechos de autor u otros derechos de propiedad intelectual sobre la totalidad o una parte de los datos que han enviado. El NCBI no está en condiciones de evaluar la validez de dichas afirmaciones y, por lo tanto, no puede proporcionar comentarios ni permisos sin restricciones sobre el

uso, la copia o la distribución de la información contenida en GenBank. (56).

- **BLAST:** No es una base de datos en sí, sino una herramienta que permite comparar secuencias genéticas o proteicas con las secuencias almacenadas en diferentes bases de datos, como GenBank. BLAST encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la importancia estadística (56).

2.2. Antecedentes de investigación

2.2.1. Análisis de tesis

Flores, L. (57) **Detección molecular de *Bordetella bronchiseptica* en Canis familiaris, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022.** “*Bordetella bronchiseptica* es el agente causal de la enfermedad respiratoria de Traqueobronquitis infecciosa canina conocida como “tos de las perreras”, siendo su contagio muy fácil y rápido, llegando a producir cuadros graves de inflamación en las vías respiratorias. Esta investigación tuvo como objetivo principal la identificación de *B. bronchiseptica* en *Canis familiaris* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos de secuencias cortas de DNA (primers generales y específicos) para una detección molecular certera. Asimismo, se determinó la incidencia de *B. bronchiseptica* en los caninos según el tipo de raza, sexo, edad y estilo de vida. La muestra fue de 45 caninos de la urbanización Andrés Araujo Morán, los cuales fueron muestreados mediante hisopado nasofaríngeo y llevados posteriormente para su estudio al laboratorio de Biología molecular de la Universidad de Tumbes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de t-student, y mostró que los datos fueron estadísticamente no significativos. Los resultados mostraron que un 4.44% de los caninos muestreados resultaron positivos a *B. bronchiseptica* y un 2.22 % a otras especies del género *Bordetella*” (57).

Quispe, M. (58) **Secuenciación molecular del gen 16 "s" para la identificación del agente causal de linfadenitis en cuyes (*Cavia porcellus*) Arequipa – 2017.** “El presente estudio se realizó en 4 etapas; la primera consistió en obtener muestras de abscesos cervicales de cuatro cuyes con linfadenitis durante el desarrollo de prácticas del curso de Patología Veterinaria. La linfadenitis es una enfermedad que se caracteriza por la formación de abscesos crónicos en los linfonódulos, principalmente cervicales; los ganglios linfáticos inguinales y retroperitoneales pueden estar ocasionalmente involucrados. La segunda etapa consistió en que dichas muestras pasaran por un proceso de cultivo de bacterias dentro de las cuales se realizaron 4 pasajes para purificar las muestras. Este procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Lavetsur en un periodo de 4 días Inmediatamente después las muestras purificadas fueron llevadas a las instalaciones del Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo E.I.R.L. del Dr. Julio Cesar Bernabé y la Dra. Jani Pacheco, donde se procedieron a extraer el ADN de cada muestra hasta la fase de obtención de las cadenas de ADN de dichas bacterias mediante procesos de amplificación y electroforesis. Finalmente, una vez obtenidas las cadenas de ADN estas fueron enviadas para su secuenciación molecular, esto se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Harvard en Estados Unidos. Cada secuencia obtenida fue analizada y comparada con secuencias existentes mediante el uso de programas de bioinformática con base de datos, GenBank, utilizando el algoritmo BLAST y Sequence Match. El objetivo general del presente trabajo estuvo orientado a identificar molecularmente al agente etiológico causante de la linfadenitis en cuyes (*Cavia porcellus*) mediante secuenciación molecular del gen 16S a partir del aislamiento de 04 cepas bacterianas de los abscesos cervicales de cuyes, de los cuales se obtuvieron 04 secuencias de nucleótidos. Al asociar las secuencias de las 04 cepas bacterianas aisladas de abscesos cervicales de cuyes, en el Software de Gen Bank, se observó que las 04 cepas aisladas se encuentran con una identidad menor de 100 %, por lo que se puede concluir que las 04 secuencias bacterianas provenientes de las cepas aisladas NO corresponden a ninguna de las registradas en el Gen Bank. Las 04 secuencias de las cepas bacterianas aisladas presentan una identidad con cepas registradas en el Gen Bank entre 95% y 99% como máximo de identidad, de las cuales 3 cepas se asemejan en gran porcentaje a

Streptococcus equi, y 01 cepa tiene alto porcentaje de similitud con *Staphylococcus warneri*. Al construir el árbol filogénico de las secuencias se observó que de las 04 secuencias 01 se presenta en forma alejada del centro de la rama principal, indicando que se trata de una cepa de la familia bacteriana pero mucho más antigua y 03 cepas se encuentran dentro de las ramas del árbol filogénico” (58).

Villacis, J. (59) **Análisis bioinformático de cuatro secuencias de genoma completo de Salmonella entérica de origen avícola.** “La investigación epidemiológica molecular aplicada a microbiología constituye una herramienta fundamental en la elucidación del origen de brotes clínicos y otorga información valiosa para la toma oportuna de medidas de control. En los últimos años, el surgimiento de nuevas tecnologías como la secuenciación de genoma completo y el desarrollo de herramientas bioinformáticas han revolucionado la microbiología, la misma que en la última década ha pasado de un ámbito totalmente laboratorial a uno computacional. La implementación de estas herramientas nos ha permitido estudiar en tiempo real y a un menor costo, potenciales patógenos presentes en nuestro medio. Una de ellas es *Salmonella enterica*, que representa una bacteria de interés en los sectores productivo y clínico a nivel mundial; es por este motivo que es importante realizar investigaciones epidemiológicas que nos permitan analizar su origen, diseminación, mecanismos de virulencia y resistencia. Es por esta razón que se realizó el análisis de cuatro secuencias de *Salmonella enterica sub. enterica serovar Infantis y Kentucky* aisladas dentro del sector avícola en la provincia de Tungurahua y Cotopaxi, determinando que pertenecen al tipo de secuencia ST32 y ST152 respectivamente. Ambas poseen un amplio perfil de multirresistencia a fármacos, destacando la presencia de los genes de resistencia a betalactámicos blaCTX-M-148 y blaCTX-M-65, los cuales otorgan a la bacteria de resistencia a penicilinas y cefalosporinas. Con la ayuda de estas plataformas se detectaron la presencia de islas de patogenicidad y plásmidos, los cuales están relacionados a los factores de la virulencia y patogenicidad de los aislados en estudio. Finalmente, se compararon las secuencias de este estudio con aislamientos de *S. Infantis* y *S. Kentucky* de diversas fuentes y países alrededor del mundo, utilizando arboles filogenéticos, llegando a la conclusión que presentan un

elevado grado de similitud con secuencias de muestras clínicas en Estados Unidos, lo que sugiere que podrían compartir un ancestro en común” (59).

2.2.2. Análisis de trabajos de investigación

Molina, G et al (60) **La identificación de *Bordetella bronchiseptica* a partir de aislados caninos de secuenciación de ADN ribosómico 16S.** “La amplificación y secuenciación del ADN 16S son herramientas útiles para identificar bacterias importantes que causan enfermedades en las vías respiratorias de una variedad de animales domésticos. *Bordetella bronchiseptica*, una de esas bacterias, ha demostrado algunos cambios en su núcleo metabólico, generando una mayor necesidad de identificación mediante amplificación y secuenciación del ADN 16S. Aplicamos esta metodología a once aislados nasales y faríngeos de perros para detectar *B. bronchiseptica*. Se completaron ocho cepas de las cuales siete mostraron una homología del 98-99%; y tres cepas fueron secuenciadas sólo parcialmente. Las secuencias de las once cepas se depositaron en el GenBank (NCBI). Lo que descubrimos fue que la secuenciación del ADN 16S de *B. bronchiseptica* es una excelente herramienta que certifica los métodos convencionales de identificación y evita desafíos ambientales”.

Fastres, A et al (61) **Análisis de la microbiota pulmonar en perros con infección por *Bordetella bronchiseptica* y correlación con cultivo y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.** “La infección por *Bordetella bronchiseptica* (Bb), un patógeno implicado en el complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas, se puede confirmar mediante cultivo o qPCR. Los estudios sobre la microbiota pulmonar canina (LM) son recientes, escasos y solo se ha publicado un artículo sobre infección pulmonar canina. En este estudio, nuestro objetivo fue comparar el LM entre perros infectados con Bb y perros sanos, y correlacionar la secuenciación con los resultados del cultivo y la qPCR. Se incluyeron veinte perros infectados con Bb diagnosticados mediante qPCR y/o cultivo y 4 perros sanos. La qPCR para *Mycoplasma cynos* (Mc) también estuvo disponible en 18 perros enfermos y todos sanos. Los resultados de la secuenciación, obtenidos del líquido de lavado broncoalveolar después de la extracción de ADN, la PCR dirigida a la región V1-V3 del ADNr 16S y la

secuenciación, mostraron la presencia de Bb en todos los perros enfermos, aproximadamente la mitad estaban coinfectados con Mc . En perros enfermos en comparación con perros sanos, la diversidad β cambió ($P = 0,0024$); la riqueza bacteriana y la diversidad α fueron menores ($P = 0,012$ y $0,0061$), y la carga bacteriana fue mayor ($P = 0,004$). Las clases de Bb qPCR y los resultados de los cultivos se correlacionaron con la abundancia de Bb ($r = 0,71$, $P < 0,001$ y $r = 0,70$, $P = 0,0022$). Las clases de Mc qPCR también se correlacionaron con la abundancia de Mc ($r = 0,73$, $P < 0,001$). La infección por Bb indujo disbiosis pulmonar, caracterizada por una alta carga bacteriana, baja riqueza y diversidad y una mayor abundancia de Bb , en comparación con perros sanos. Los resultados de la secuenciación se correlacionan altamente con los resultados de la qPCR y del cultivo, lo que demuestra que la secuenciación puede ser confiable para identificar microorganismos involucrados en enfermedades infecciosas pulmonares”

Jinnerot, T; Malm, Karin; Eriksson, E & Johansson, J (62) **Desarrollo de un ensayo de PCR en tiempo real Taqman para la detección de *Bordetella bronchiseptica*.** “La infección por *Bordetella bronchiseptica* es la causa bacteriana más común de tos de las perreras o enfermedad respiratoria infecciosa canina (CIRD) en perros. Otros agentes patógenos incluyen varios virus respiratorios y la coinfección puede exacerbar los signos clínicos. El CIRD es muy contagioso y puede propagarse rápidamente, especialmente entre perros que se encuentran en espacios reducidos. Un diagnóstico rápido y preciso permite la selección del manejo adecuado. Nuestro objetivo fue desarrollar una PCR en tiempo real sensible y específica para la detección de *B. bronchiseptica* en muestras de perros con signos respiratorios. Se utilizó un programa de comparación de genomas para seleccionar una secuencia de ADN diana adecuada. Se desarrolló una PCR dirigida al gen *bfrZ* que no mostró reactividad cruzada in silico o cuando se probó con un panel de aislados bacterianos. El límite de detección se determinó en 4×10^3 bacterias por ml de muestra de hisopo nasal y menos de 10 copias de ADN objetivo por reacción de PCR. De los 23 aislados de *B. bronchiseptica* analizados, un aislado de erizo no fue amplificado. La secuenciación del ADNr 16S mostró que el aislado era similar a las cepas de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis*, pero se consideró de menor

importancia para el diagnóstico en perros. En un panel de hisopos nasofaríngeos con cultivos negativos de perros con (n=57) o sin (n=17) signos clínicos de CIRDC, tres resultaron positivos para la PCR para *B. bronchiseptica*. En conjunto, el nuevo ensayo es muy específico y sensible para la detección de *B. bronchiseptica* en muestras clínicas”.

Bridel, S. *et al* (63) **Un recurso completo para estudios de biodiversidad y epidemiología genómica de Bordetella**. “El género *Bordetella* incluye bacterias que se encuentran en el medio ambiente y/o asociadas con humanos y otros animales. Algunas especies estrechamente relacionadas, incluida la *Bordetella pertussis*, son patógenos humanos que causan enfermedades como la tos ferina. Aquí, presentamos una gran base de datos de aislamientos y genomas de *Bordetella* y desarrollamos sistemas de genotipado para el género y para el clado *B. pertussis*. Para generar la base de datos, fusionamos bases de datos previamente existentes de la Universidad de Oxford y el Instituto Pasteur, importamos genomas de repositorios públicos y agregamos 83 genomas de *B. bronchiseptica* recién secuenciados. La base de datos pública incluye actualmente 2582 *Bordetella* aislamientos y sus datos de procedencia, y 2085 genomas (<https://bigsd.bpasteur.fr/bordetella/>). Utilizamos la tipificación de secuencias multilocus del genoma central (cgMLST) para desarrollar sistemas de genotipado para todo el género y para *B. pertussis* , así como esquemas específicos para definir perfiles antigénicos, de virulencia y de resistencia a macrólidos. Los análisis filogenéticos nos permiten redefinir las relaciones evolutivas entre las especies conocidas de *Bordetella* y proponer nuevas especies potenciales. Nuestra base de datos proporciona un recurso ampliable para el genotipado de aislamientos ambientales y clínicos de *Bordetella*, lo que facilita la investigación evolutiva y epidemiológica sobre la tos ferina y otras infecciones por *Bordetella*” (63).



3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Localización del trabajo

3.1.1.1. Espacial

La presente investigación se llevó a cabo en la ciudad de Arequipa, excepto por la secuenciación molecular la cual se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Harvard en Estados Unidos. La ciudad de Arequipa presenta las siguientes coordenadas geográficas: Latitud 16°23'56" sur y Longitud 71°32'6" oeste (64); y limita con la provincia de Caylloma por el norte, con el departamento de Puno por el sur y por el oeste con la provincia de Camaná. Tiene una altitud de 2 355 m.s.n.m. el clima es seco y una temperatura que oscila entre los 10°C y 35°C (65).

3.1.1.2. Temporal

Este trabajo de investigación tuvo una duración de 8 meses empezando con la presentación del proyecto en el mes de mayo del 2024 y la presentación del borrador en diciembre del mismo año.

3.1.2. Materiales biológicos

- 2 cepas causantes de Traqueobronquitis infecciosa canina

3.1.3. Materiales de laboratorio

- Materiales de toma de muestra
 - Hisopos estériles
 - Tubo transportador de hisopos
- Materiales de cultivo
 - Placas Petri
 - Agar sangre
 - Agar nutritivo
 - Mechero

- Materiales de secuenciación
 - Centrífuga
 - Tempblock Module Heater
 - Cámara de flujo laminar
 - Tubos eppendorf
 - Vórtex
 - Termociclador
 - Cámara de electroforesis
 - PCR
- Materiales de análisis bioinformático
 - Base de datos GenBank
 - BLAST

3.1.4. Materiales de escritorio

- Lápiz
- Hojas bond
- Laptop y/o computadora

3.1.5. Equipos y maquinarias

- Refrigeradora
- Horno microondas
- Cámara fotográfica

3.1.6. Otros materiales

- Cuaderno de apuntes
- Mandil
- Barbijo
- Guantes estériles

3.2. Métodos

3.2.1. Muestreo

3.2.1.1. Universo:

20 muestras de exudado traqueal.

3.2.1.2. Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra en esta investigación fue de naturaleza exploratoria, debido a que inicialmente se obtuvieron 20 muestras de exudado traqueal de perros con signos clínicos compatibles con traqueobronquitis infecciosa canina, recolectadas mediante hisopado estéril con vaina protectora. Sin embargo, tras la observación microscópica con tinción de Gram, solo dos muestras presentaron morfología compatible con cocobacilos gramnegativos, motivo por el cual únicamente estas dos muestras fueron seleccionadas para continuar con los análisis bacteriológicos y la secuenciación molecular.

Esta estrategia respondió a un enfoque diagnóstico y confirmatorio, donde la selección final del tamaño muestral estuvo condicionada por los resultados preliminares obtenidos en el laboratorio, priorizando la calidad del análisis molecular sobre la cantidad de muestras.

3.2.1.3. Procedimiento de muestreo

Muestreo no probabilístico por conveniencia. En el presente estudio se aplicó un muestreo no probabilístico por conveniencia, seleccionando 20 caninos que presentaban signos clínicos compatibles con traqueobronquitis infecciosa canina (como tos seca, estornudos, descarga nasal, entre otros). Esta técnica fue utilizada debido a la accesibilidad y disponibilidad de los animales en el momento del muestreo, así como a la necesidad de enfocar la investigación en individuos con sospecha clínica de la enfermedad (66).

3.2.2. Métodos de evaluación

3.2.2.1. Metodología de la experimentación

En primer lugar, se llevó a cabo el proceso de aislamiento e identificación del agente causante presente en la muestra clínica. Después, se procedió a la extracción del ADN de esta muestra, seguida de la amplificación y secuenciación de las cepas bacterianas aisladas. Finalmente, se realizó el análisis y la comparación de las secuencias obtenidas con aquellas ya existentes en la base de datos GenBank.

Recolección de muestras

Se obtuvieron muestras de exudado traqueal de 20 caninos con signos clínicos compatibles con traqueobronquitis infecciosa, mediante hisopado estéril con vaina protectora para evitar la contaminación cruzada. Las muestras fueron rotuladas individualmente y transportadas bajo cadena de frío para su procesamiento inmediato.

Diagnóstico bacteriológico preliminar

En el laboratorio, se realizó un frotis directo de las muestras sobre láminas portaobjetos, seguido de la técnica de tinción de Gram para la observación microscópica. El objetivo fue obtener un diagnóstico bacteriológico preliminar. De las 20 muestras, se identificaron dos casos positivos con estructuras morfológicas compatibles con cocobacilos gramnegativos.

Aislamiento bacteriano y envío al laboratorio especializado

Las dos muestras con morfología sugestiva de infección bacteriana fueron enviadas al laboratorio LABVETSUR (Arequipa, Perú) para su aislamiento, purificación y caracterización. En este laboratorio, se realizaron 10 pasajes bacterianos en medios de cultivo selectivos y diferenciales, con el objetivo de obtener cultivos puros antes del análisis molecular. El aislamiento bacteriano se llevó a cabo mediante siembras en medios selectivos, agar sangre MacConkey, incubando las placas a una temperatura de 37 °C durante 48 horas. Para la observación de la pureza, se realizó en agar Nutritivo.

Extracción de ADN y secuenciación molecular

Posteriormente, las muestras purificadas fueron enviadas al Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo E.I.R.L., a cargo del Dr. Julio César Bernabé. Para la extracción de ADN se utilizó el kit MasterPure™ DNA Purification Kit, seguido de la amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR con los primers universales 27F y 1492R. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Qiagen PCR Purification Kit, luego fueron enviados para la secuenciación molecular al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Harvard, en Estados Unidos.

Amplificación del gen 16S rRNA

La región del gen ARN ribosomal 16S fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los primer universales:

- 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3').

Las condiciones de la PCR fueron:

- 95 °C por 30 segundos (desnaturalización)
- 50 °C por 30 segundos (alineamiento)
- 72 °C por 45 segundos (extensión)

Los productos obtenidos fueron purificados mediante el kit Qiagen PCR Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciación

La secuenciación de los productos purificados se llevó a cabo mediante la técnica de Sanger, utilizando colorantes Big Dye Terminator v3.1 y el equipo automatizado ABI 3730xl.

Análisis y comparación de secuencias:

- a) Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar similitudes con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank.

- b) Se utilizó el software ClustalW, integrado en MEGA versión 6.0, para realizar un alineamiento múltiple de secuencias.

Árbol filogenético

La reconstrucción del árbol filogenético se realizó aplicando el método Neighbor-Joining y el modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros (K2P). Las distancias evolutivas se calcularon a partir de las diferencias en las secuencias del gen 16S rRNA.

3.2.2.2. Recopilación de la información

a. En el laboratorio

Se realizó el cultivo de las muestras de exudado traqueal. Se obtuvo la secuencia molecular de las dos cepas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Harvard.

b. En la biblioteca

Se realizó la revisión de libros, guías, artículos y revistas relacionados al tema de interés de esta tesis.

c. En otros ambientes generadores de la información científica

Se obtiene información de páginas web, revistas indexadas y de entrevistas con profesionales especializados en el tema.

3.3. Variables de respuesta

3.3.1. Variables independientes

- Dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina.

3.3.2. Variable dependiente

- Secuencia molecular de las dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina.

Tabla 03. Operacionalización de las variables:

Variable	Dimensión	Indicador	Medición
Independiente	Cepas bacterianas	Presencia de cepas causantes	Identificación bacteriana en las muestras clínicas
Dependiente	Secuenciación molecular	Secuencias obtenidas de las cepas bacterianas	Número de bases secuenciadas y comparación con GenBank



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados

4.1.1. Identificación de la secuenciación molecular de dos cepas causantes de traqueobronquitis infecciosa canina.

Secuenciación de cepa de tráquea de Perro 1:

```
GCAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCCTCAATTG
GAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAAT
ACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGG
CGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG
CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACA
AGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA
ACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT
GTA ACTGACGCTGaggCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTanaCGATGAGTGCTAAG
TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGC AgcaaacgCATTAAG
CACTCCGCCtggggagTACGACCGCAAGGTtgaactcaaaggAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGgtgGaGCATGTGGTTTAATT
```

Secuenciación de cepa de tráquea de Perro 2:

GCAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATT
GGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTA
ATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAA
GGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGC
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAG
AAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTAT
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG
TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACT
TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT
GCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCtggggagTACGaCcG
CAAGGTtgaactcaaaggAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTg
GagcATgtgggtTATTcgaagcAcggaagaaacttaCCAGGTCTTGACAt
CCTTTGaCcaCT

4.1.2. Comparación las secuencias obtenidas de las dos cepas con las 10 primeras secuenciaciones del banco de genes.

Las secuencias del ARN ribosomal 16S de cada cepa, obtenidas mediante secuenciación, fueron alineadas individualmente y comparadas con las registradas en la base de datos GenBank, utilizando los algoritmos BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y Sequence Match. Se seleccionaron y analizaron las secuencias que presentaron alineamientos significativos con los mayores índices de similitud (Max ident).

Tabla 04. Análisis bioinformático de la cepa de tráquea de Perro 1

Descripción	Nombre científico	Puntuación máxima	Puntuación total	Consulta de portada	Por Identidad	Acc. Len	Adhesión
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa TSGB1211 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1470	MN255510.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa Efs-R12 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1465	PQ510243.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa IMAU98467 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1474	MW135193.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa Efs-Z8 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1465	PQ510287.1

Descripción	Nombre científico	Puntuación máxima	Puntuación total	Consulta de portada	Por Identidad	Acc. Len	Adhesión
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa Huang34 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1433	ON974158.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa hhe94 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1444	ON974826.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa M49 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1428	OQ775350.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa MG4607 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1435	OP102460.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa HZB-03 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1701	1701	100%	99,89%	1413	MZ144056.1
Secuencia parcial del gen CSCRZR7.2 de <i>Enterococcus sp.</i> para el ARN ribosómico 16S	Bacterias del género <i>Enterococcus</i>	1701	1701	100%	99,89%	1455	LC484733.1

Tabla 05. Análisis bioinformático de la cepa de tráquea de Perro 2

Descripción	Nombre científico	Puntuación máxima	Puntuación total	Consulta de portada	Por Identidad	Acc. Len	Adhesión
Gen del ARN ribosómico 16S de la bacteria NLAE-zl-H529, secuencia parcial	<i>Bacteria NLAE-zl-H529</i>	1768	1768	100%	99,49%	1447	JX006734.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa 10342M de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1772	1772	100%	99,59%	1079	OM935975.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa Efs-R12 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1766	1766	100%	99,49%	1465	PQ510243.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa Efs-Z8 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1766	1766	100%	99,49%	1465	PQ510287.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa IMAU98467 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1766	1766	100%	99,49%	1474	MW135193.1

Descripción	Nombre científico	Puntuación máxima	Puntuación total	Consulta de portada	Por Identidad	Acc. Len	Adhesión
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa O51 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1772	1772	100%	99,59%	1457	OQ405998.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa TMPC 20518 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1772	1772	100%	99,59%	1272	ON778706.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa TMPC 2054B de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1768	1768	99%	99,59%	1254	ON778611.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa TMPC 2071N de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1772	1772	100%	99,59%	1034	ON778704.1
Secuencia parcial del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa TSGB1211 de <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1766	1766	100%	99,49%	1470	MN255510.1

4.1.3. Análisis filogenético comparativo entre las cepas encontradas con las cepas registradas en GenBank.

El empleo de herramientas informáticas facilitó la elaboración de árboles filogenéticos que representan gráficamente la genealogía molecular de diferentes bacterias, destacando su posición evolutiva en relación con otros organismos comparados.

En la presente investigación, se analizó el agrupamiento de las secuencias parciales del gen RNAr 16S del microorganismo analizado y de las cepas que mostraron similitud, identificadas mediante el alineamiento global realizado con BLAST. Para este análisis, se utilizó el software MEGA 6 (67) en combinación con ClustalW (68).

La reconstrucción filogenética se llevó a cabo aplicando el método neighbour-joining (69) y el modelo Kimura de dos parámetros. Las distancias evolutivas y los agrupamientos fueron determinados utilizando el método de máxima parsimonia, incorporando un valor bootstrap basado en 1000 replicaciones para asegurar la robustez de los resultados.

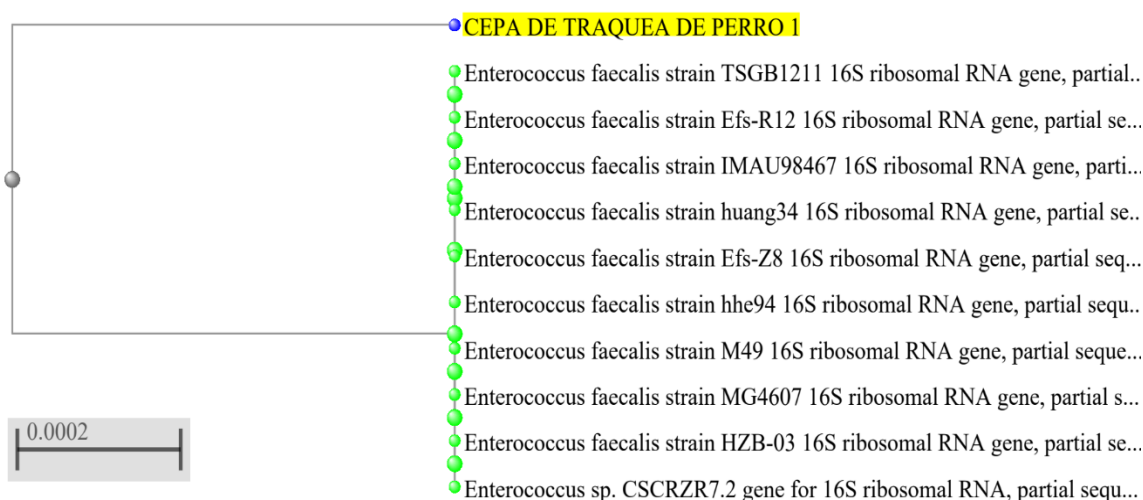


Figura 12. Árbol filogenético de la cepa de tráquea de Perro 1

La bacteria aislada CEPA DE TRAQUEA DE PERRO 1, corresponde a una nueva especie del género *Enterococcus sp.* Siendo su especie más cercana *Enterococcus faecalis* Cepa TSGB1211.

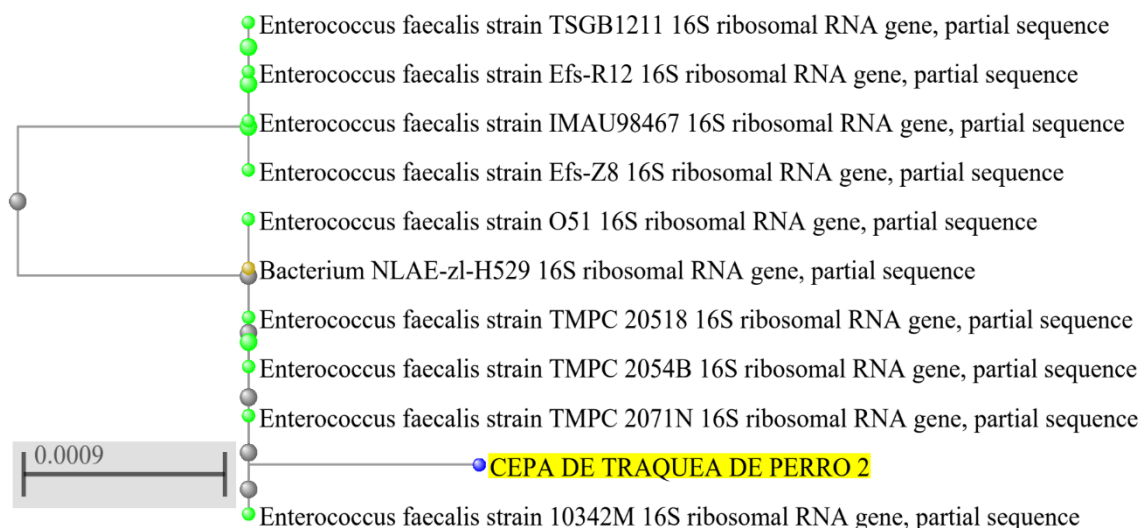


Figura 13. Árbol filogenético de la cepa de tráquea de Perro 2

El análisis filogenético muestra que la CEPA DE TRAQUEA DE PERRO 2 es una nueva sub-especie de *Enterococcus faecalis*. La especie más cercana es *Enterococcus faecalis*, cepa O51 con un 99.59% de similitud.

4.2. Discusión

La identificación molecular de las cepas Tráquea de perro 1 y 2 mediante la secuenciación del gen ARN ribosomal 16S permitió confirmar su pertenencia al género *Enterococcus*. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos como el de Janda y Abbott (70) que destacan el uso del gen 16S rRNA como marcador molecular clave para la taxonomía y filogenia bacteriana. Los resultados de este estudio sugieren que *Enterococcus* podría desempeñar un papel relevante en el contexto de infecciones respiratorias en perros, aunque tradicionalmente se ha asociado más frecuentemente con infecciones del tracto gastrointestinal. En estudios previos, otras bacterias como *Bordetella bronchiseptica* han sido reportadas como agentes etiológicos predominantes en casos de traqueobronquitis infecciosa canina (71). Sin embargo, en este caso, la secuenciación molecular identificó *Enterococcus faecalis* en las muestras analizadas, lo que sugiere que esta bacteria también podría estar involucrada en procesos respiratorios caninos. Es probable que la presencia de *Enterococcus* en el tracto respiratorio sea el resultado de una colonización secundaria

favorecida por una alteración en la microbiota normal o un compromiso en los mecanismos de defensa del huésped, como lo han sugerido estudios de Moriss et al (72) sobre coinfecciones en enfermedades respiratorias en animales.

En este caso, la cepa tráquea de perro 1 mostró una similitud del 99.89% con la cepa TSGB1211 de *Enterococcus faecalis*, mientras que la cepa tráquea de perro 2 presentó un 99.59% con la cepa O51. Este alto grado de similitud genética es consistente con investigaciones previas sobre *Enterococcus faecalis*, donde se han identificado variaciones genéticas dentro del mismo género, indicando una notable diversidad en las cepas (73). Estos resultados coinciden con los reportados por Seng et al. (74), quienes también encontraron alta similitud entre cepas de *Enterococcus* en diferentes nichos ecológicos. Sin embargo, mi estudio aporta un hallazgo importante al identificar una nueva especie dentro del género *Enterococcus*, lo cual no ha sido ampliamente documentado en la literatura para cepas aisladas del tracto respiratorio canino.

Además, estudios como el de Weng et al. (75) han demostrado una alta diversidad genética entre cepas de *E. faecalis* aisladas de diferentes fuentes, incluyendo muestras clínicas y ambientales, utilizando técnicas como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la tipificación por secuencias multilocus (MLST). Estos hallazgos refuerzan la idea de que *E. faecalis* posee una notable capacidad para adaptarse y diversificarse en diversos entornos, lo que podría explicar su presencia en el tracto respiratorio de los perros en este estudio.

El análisis filogenético reveló que la cepa tráquea de perro 1 podría ser clasificada como una nueva especie dentro del género, mientras que la cepa tráquea de perro 2 corresponde a una subespecie de *E. faecalis*. Esto respalda la idea de que el género *Enterococcus* presenta una notable diversidad genética, un fenómeno ampliamente documentado por Fisher y Phillips (73), quienes describen la amplia variabilidad genética de *Enterococcus* en diversas condiciones ambientales y animales. Este resultado subraya la notable diversidad genética presente en este grupo bacteriano, la cual ha sido bien documentada en el contexto de su plasticidad genómica y adaptaciones evolutivas (76,77). Mi estudio añade una nueva dimensión al contexto de esta diversidad al identificar variantes específicas asociadas con infecciones

respiratorias caninas, ampliando así el conocimiento sobre las adaptaciones del género *Enterococcus* en este nicho ecológico.

Utilizando el método Neighbor-Joining y el modelo de Kimura-2 parámetros, se logró ubicar a las cepas Tráquea de perro 1 y Tráquea de perro 2 dentro de las secuencias registradas en GenBank. Este enfoque es similar al utilizado por Saitou & Nei (78), quienes validaron la efectividad de este método para la reconstrucción de árboles filogenéticos de bacterias. En mi estudio, los resultados obtenidos aseguran la robustez de las agrupaciones y fortalecen la clasificación taxonómica de las cepas, lo que es consistente con otros estudios que destacan la precisión del método Neighbor-Joining en el análisis de relaciones evolutivas dentro de géneros bacterianos como *Enterococcus*.

La identificación de variantes específicas de *Enterococcus* en el tracto respiratorio de perros tiene importantes implicaciones clínicas. En mi estudio, los hallazgos sugieren que las cepas Tráquea de perro 1 y Tráquea de perro 2 podrían tener características particulares de virulencia o resistencia antimicrobiana, similar a lo observado por Torres et al. (79), quienes documentaron cepas de *Enterococcus faecalis* con perfiles de resistencia antimicrobiana complejos en infecciones respiratorias (80).

En línea con estos hallazgos, el estudio de McBride et al. (81) resalta la capacidad de *E. faecalis* para adquirir y diseminar genes de resistencia a múltiples antibióticos, lo que representa un desafío significativo en el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno.

Un aspecto relevante en este estudio es la discrepancia entre los resultados obtenidos en el laboratorio Labvetsur y los obtenidos mediante secuenciación molecular. Inicialmente, Labvetsur identificó *Bordetella bronchiseptica* utilizando pruebas morfológicas y bioquímicas, mientras que la secuenciación del gen 16S rRNA confirmó la presencia de *Enterococcus faecalis*. Es probable que esta diferencia se deba a las limitaciones de las pruebas fenotípicas, ya que los métodos bioquímicos pueden ser menos precisos en la identificación bacteriana en comparación con la secuenciación genética (82). Estudios previos han demostrado que la identificación basada en características bioquímicas puede llevar a errores de clasificación en

bacterias con perfiles metabólicos similares (83). Esto resalta la importancia del análisis molecular en el diagnóstico microbiológico, ya que permite una identificación más precisa y evita posibles errores que podrían impactar en el tratamiento de infecciones respiratorias en animales.

Estos hallazgos sugieren que *Enterococcus* podría ser un patógeno subestimado en el contexto de infecciones respiratorias caninas y que la identificación precisa de los agentes etiológicos requiere métodos moleculares complementarios a las pruebas fenotípicas tradicionales.





5. Conclusiones

PRIMERA: Se analizaron las secuencias del gen ARN ribosomal 16S obtenidas de ambas cepas. Estas secuencias fueron procesadas utilizando herramientas bioinformáticas como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y Sequence Match, para su comparación con las secuencias registradas en la base de datos GenBank de las cepas de tráquea de perro 1 y 2.

SEGUNDA: Al comparar las secuencias obtenidas de las dos cepas con las 10 primeras secuenciaciones del banco de genes se obtuvo que: La Cepa tráquea de perro 1 presentó alineamientos significativos con otras mostrando una similitud del 99.89% con la cepa TSGB1211 de *Enterococcus faecalis*. cepas como Efs-R12, IMAU98467 y Huang34, confirmando su pertenencia al género *Enterococcus* con la cepa 1. La Cepa tráquea de perro 2: la comparación filogenética y genética sugiere que esta cepa es una nueva subespecie de *Enterococcus faecalis*, la secuencia de nucleótidos mostró una similitud del 99.59% con la cepa O51 de *Enterococcus faecalis*.

TERCERA: Al Realizar análisis filogenéticos comparativo entre las cepas encontradas con las cepas registradas en GenBank tenemos que, los árboles filogenéticos construidos con las secuencias obtenidas, utilizando los métodos Neighbor-Joining y el modelo Kimura de dos parámetros, mostraron que ambas cepas son nuevas variantes dentro del género *Enterococcus*.



6. Recomendaciones

- 1) Se recomienda realizar otros estudios para identificar el porcentaje de presencia de *Enterococcus faecalis* en la traqueobronquitis infecciosa canina en la ciudad de Arequipa.
- 2) Se recomienda implementar un sistema de monitoreo molecular basado en la secuenciación del gen ARN ribosomal 16S, similar al proceso realizado en este estudio. Este sistema permitirá identificar y rastrear cepas bacterianas asociadas con la traqueobronquitis infecciosa canina, de forma que se pueda detectar de manera temprana nuevas variantes, como la cepa de tráquea de perro 2, que podría representar una nueva subespecie de *Enterococcus faecalis*. La implementación de esta estrategia facilitará la intervención oportuna y la prevención de brotes en poblaciones vulnerables.
- 3) A partir de los resultados obtenidos, donde las secuencias del ARN ribosomal 16S permitieron la correcta identificación de las cepas causantes de la traqueobronquitis infecciosa canina, se recomienda incorporar la secuenciación del gen ARN ribosomal 16S como una herramienta estándar en el diagnóstico de estas infecciones. Esta metodología mejorará la precisión en la identificación de los agentes causales, como se evidenció con la similitud del 99.89% con *Enterococcus faecalis* en la cepa tráquea de perro 1. Esto facilitaría la selección de tratamientos más específicos y efectivos.
- 4) Dado que el análisis filogenético sugiere que las cepas encontradas son nuevas variantes dentro del género *Enterococcus*, se recomienda realizar estudios moleculares adicionales en las cepas de tráquea de perro 1 y 2 para identificar genes relacionados con la virulencia y la resistencia antimicrobiana. Estos estudios podrían proporcionar información clave para desarrollar terapias dirigidas y estrategias de manejo que reduzcan el impacto de las infecciones en la salud animal.



7. Referencias

1. Kuehn N. MSD vet manual. [Online].; 2022 [cited 2023 Agosto 10. Available from: <https://www.msdvvetmanual.com/dog-owners/lung-and-airway-disorders-of-dogs/tracheobronchitis-bronchitis-in-dogs>.
2. Sherding R. Veterian Key. [Online].; 2016 [cited 2023 Agosto 10. Available from: <https://veteriankey.com/canine-infectious-tracheobronchitis-kennel-cough/>.
3. Stull J. Companion Animal Zoonoses in Immunocompromised and Other High-Risk Human Populations. In Sykes J, editor. Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat.: Elsevier Inc.; 2021. p. 218-237.
4. Berliner E. Canine Infectious Respiratory Disease (CIRD). In Berliner E. Infectious Disease Management in Animal Shelters,. Miller, Lila; Janeczko, Stephanie; Hurley, Kate: John Wiley & Sons; 2021. p. 221-255.
5. Maboni G, Seguel M, Lorton A. Canine infectious respiratory disease: new insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. Public Library of Science One (PloS one). 2019; 14(4).
6. NCBI. NCBI. [Online].; 2020 [cited 2024 Diciembre 6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.
7. NCBI. NCBI. [Online].; 2020 [cited 2024 Diciembre 6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=10512&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
8. NCBI. NCBI. [Online].; 2020 [cited 2024 Diciembre 6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.
9. NCBI. NCBI. [Online].; 2020 [cited 2024 Diciembre 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Canine+pneumovirus>.
10. NCBI. NCBI. [Online].; 2020 [cited 2024 Diciembre 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=canine+distemper+virus>.

11. Voorhees I, Glaser A, Toohey-Kurth K. Spread of canine influenza A(H3N2) virus, United States.. Emerging Infectious Diseases. 2017; 23(12).
12. Chambers J, Matsumoto I, Shibahara T, Haritani M, Nakayama H, Uchida K. An Outbreak of Fatal Bordetella bronchiseptica Bronchopneumonia in Puppies. J Comp Pathol. 2019; 167(41).
13. Johansson K. VetBact. [Online].; 2022 [cited 2023 Agosto 1. Available from: https://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=434&lang=en.
14. NCBI. NCBI. [Online].; 2020 [cited 2024 Diciembre 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=40041&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
15. Veterinary Bacteriology. Vet Bact. [Online]. [cited 2024 Diciembre 12. Available from: https://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=471&lang=en.
16. Global Core Biodata Resource. GBIF. [Online]. [cited 2024 Diciembre 12. Available from: <https://www.gbif.org/es/species/102685159>.
17. Veterinary Bacteriology. Vet Bact. [Online]. [cited 2024 Diciembre 12. Available from: <https://www.vetbact.org/index.php?artid=207&vbsearchstring=Streptococcus%20canis#>.
18. Veterinary Bacteriology. Vet Bact. [Online]. [cited 2024 Diciembre 12. Available from: https://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=391&lang=en.
19. Veterinary Bacteriology. Vet Bact. [Online]. [cited 2024 Diciembre 12. Available from: https://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=394&lang=en.

20. Rubin J. FLICKR. [Online].; 2022 [cited 2024 Diciembre 12. Available from: <https://www.flickr.com/photos/therubinlab/51853633649/in/photostream/>].
21. Pagnossin D, Smith A, Oravcova K, Weir W. Streptococcus canis, the underdog of the genus. *Veterinary Microbiology*. 2022 Octubre; 273(1).
22. Eibl C, Baumgartner M, Urbantke V, Sigmund M, Lichtmannsperger K, Wittek T, et al. An outbreak of subclinical mastitis in a dairy herd caused by a novel Streptococcus canis sequence type (st55). *Animals*. 2021; 11(2).
23. Król J, Twardoń J, Mrowiec J, Podkowik M, Dejneka G, Dębski B, et al. Streptococcus canis is able to establish a persistent udder infection in a dairy herd. *J. Dairy Sci*. 2015; 98(10).
24. Lacave G, Coutard A, Troché G, Augusto S, Pons S, Zuber B, et al. Endocarditis caused by Streptococcus canis: an emerging zoonosis? *Infection*. 2016; 44(1).
25. Taniyama D, Abe Y, Sakai T, Kikuchi T, Takahashi T. Human case of bacteremia caused by Streptococcus canis sequence type 9 harboring the scm gene. *ID Case*. 2017; 7(1).
26. Tarabichi M, Alvand A, Shohat N, Goswami K, Parvizi J. Diagnosis of Streptococcus canis periprosthetic joint infection: the utility of next-generation sequencing. *Arthroplast. Today*. 2018; 4(1).
27. Mališová B, Šantavý P, Lovečková Y, Hladký B, Kotásková I, Lonský J, et al. Human native endocarditis caused by Streptococcus canis—a case report. *Apmis*. 2019; 127(1).
28. McGuire A, Krysa N, Mann S. Hair of the dog? periprosthetic joint infection with Streptococcus canis. *Arthroplast. Today*. 2021; 8(1).
29. Tikofsky L, Zadoks R. Cross-infection between cats and cows: origin and control of Streptococcus canis mastitis in a dairy herd. *J. Dairy Sci*. 2005; 88(8).

30. Takeda N, Kikuchi K, Asano R, Harada T, Totsuka K, Sumiyoshi T, et al. Recurrent septicemia caused by *Streptococcus canis* after a dog bite. *Scand. J. Infect. Dis.* 2001; 33(12).
31. Reagan K, Sykes J. Canine Infectious Respiratory Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2020 Marzo; 50(2).
32. Nemzek J, Lester P. Biology and Diseases of Dogs. In Fox J, Otto G, Whary M, Anderson L, editors. *Laboratory Animal Medicine.*: Elsevier Inc; 2016. p. 511-554.
33. Gaskell R, Dawson S, Radford A. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Tercera ed. Elsevier , editor. St. Louis: Greene CE; 2017.
34. Moreno Y, Marin J. Factores de virulencia de *Bordetella bronchiseptica* y su acción en la fisiopatología de la traqueobronquitis infecciosa canina. Tesis. Ibagué: Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2021.
35. Liu Y, An H, Qian C, Huang X, Wang L, Zhang J. Bacterial capsules. In Tang Y, Hindiye M, Sails A, Liu D, Spearman P, editors. *Molecular Medical Microbiology.*: Elsevier Ltd.; 2024. p. 69-96.
36. Belcher T, Dubois V, Rivera A, Loch C, Dubuisson F. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence.* 2021 Setiembre; 12(1).
37. de Gopegui R. Traqueobronquitis Infecciosa Canina. In Gragera J, editor. *Enfermedades Infecciosas Caninas.* Zaragoza: Grupo Asís Biomedica; 2016. p. 36-45.
38. Langford vets. University of Bristol. [Online].; 2019 [cited 2023 Julio 27. Available from: <https://www.langfordvets.co.uk/media/2165/bordetella-bronchiseptica.pdf>.
39. Reagan K, Sykes J. Canine Infectious Respiratory Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2020 Marzo; 50(20).

40. Tabatabaei M, Reza H. Identification of Bordetella bronchiseptica in the throat and nose of dogs and cats by PCR. Mol Biol Res Commun. 2022; 11(3).
41. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). Centers for Disease Control and Prevention. [Online].; 2022 [cited 2023 Agosto 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html>.
42. Ramos S. Analitek. [Online].; 2018 [cited 2024 Enero 7]. Available from: <https://blog.analitek.com/secuenciacion-metodod-de-degradacion-quimica-0-0-1>.
43. Şükrü T, Yasemin B, Ayşe F, Serpil E, Yağmur E, Gizem Ç, et al. Techniques for Nucleic Acid Engineering: The Foundation of Gene Manipulation. In Barh D, Azevedo V, editors. Omics Technologies and Bio-Engineering.: Elsevier Inc. ; 2018. p. 247-315.
44. MERCK Investigation. Merck KGaA. [Online].; 2023 [cited 2023 Setiembre 5]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>.
45. Shrestha A. MicrobeOnline. [Online].; 2024 [cited 2024 Febrero 14]. Available from: <https://microbeonline.com/dna-sequencing-sanger-sequencing-method/>.
46. Gauthier M. Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach. Tesis doctoral. ; 2007.
47. Tamseel F, Andreas E. The DNA Universe. [Online].; 2020 [cited 2024 Febrero 19]. Available from: <https://the-dna-universe.com/2020/11/02/a-journey-through-the-history-of-dna-sequencing/>.
48. CD Genomics. CD Genomics. [Online].; 2024 [cited 2024 Abril 27]. Available from: <https://www.cd-genomics.com/blog/introduce-to-16s-rrna-and-16s-rrna-sequencing/>.
49. Byju's. Byjus. [Online].; 2024 [cited 2024 Abril 29]. Available from: <https://byjus.com/neet/16s-rrna/>.

50. College Biology. Khan Academy. [Online].; 2021 [cited 2024 Abril 29. Available from: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>.
51. Yang B, Wang Y, Qian P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC bioinformatics. 2016; 17(1).
52. Adams D. National Human Genome. [Online].; 2023 [cited 2023 Agosto 11. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Bioinformatics>.
53. National Human Genome Research Institute. Genome. [Online].; 2024 [cited 2024 Marzo 15. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>.
54. Solano D. Dispositivos Medicos. [Online].; 2022 [cited 2024 Febrero 28. Available from: <https://dispositivosmedicos.org.mx/bioinformatica/>.
55. Bayat A. Bioinformatics. BMJ. 2022 Abril; 1(324).
56. Hasija Y. All About Bioinformatics. Primera ed. Hasija Y, editor. Delhi: Elsevier Inc.; 2023.
57. Flores L. Detección molecular de Bordetella bronchiseptica en Canis familiaris, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022. Tesis. Tumbes: Universidad Nacional de Tumbes, Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2023.
58. Quispe M. Secuenciación molecular del gen 16 "s" para la identificación del agente causal de linfadenitis en cuyes (Cavia porcellus) Arequipa - 2017. Tesis. Arequipa: Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas; 2017.
59. Villacis J. Análisis bioinformático de cuatro secuencias de genoma completo de Salmonella entérica de origen avícola. Tesis. Cevallos - Ecuador: Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2019.

60. Molina M, Torres E, Monsalvo A, De la Torre R, Barcenas G, Montaraz J. The identification of *Bordetella bronchiseptica* from canine isolates of sequencing 16S ribosomal DNA.. *African Journal of Microbiology Research*. 2014 Mayo; 8(19).
61. Fastrès A, Canonne M, Taminiau B, Billen F, Garigliany M, Daube G, et al. Análisis de la microbiota pulmonar en perros con infección por *Bordetella bronchiseptica* y correlación con cultivo y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. *Veterinary Research*. 2020 Marzo; 51(46).
62. Jinnerot T, Malm K, Eriksson E, Johansson J. Development of a Taqman Real-Time PCR Assay for Detection of *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*. 2015 Diciembre; 1(1).
63. Bridel S, Bouchez V, Brancotte B, Hauck S, Armatys N, Landier A, et al. A comprehensive resource for *Bordetella* genomic epidemiology and biodiversity studies. *Nature Communications*. 2022 Julio; 13(3807).
64. Antipodas. Antipodas.net. [Online].; 2023 [cited 2023 Agosto 15. Available from: <https://www.antipodas.net/coordenadaspais/peru/arequipa.php>.
65. Ministerio de Agricultura y Riego. Cámara Nacional Forestal. [Online].; 2020 [cited 2023 Agosto 15. Available from: <http://www.cnf.org.pe/Cartilla/AREQUIPA/Arequipa.html>.
66. Santabárbara J, Rubio E, Feja C, Martínez T. Manual de Madrid: Editorial Andavira; 2015.
67. Kumar S, Peterson D, Stecher G, Filipski A. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Mol. Biol. Evol.*. 2013 Octubre; 30(12).
68. Chenna R, Hideaki S, Tadashi K, Lopez R, Gibson T. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*. 2003 Julio; 31(13).
69. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Julio; 4(4).

70. Janda J, Abbott S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45(9).
71. Chalker V, Owen W, Paterson C, Barker E, Brooks H, Rycroft A, et al. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology*. 2004; 149(11).
72. Morisse J, Cotte J, Boilletot E, Raymond-Letron I, Oswald E. Bacterial agents identified in infectious respiratory diseases of cattle.. *Veterinary Research Communications*. 2001; 25(5).
73. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009 Junio; 155(6).
74. Chen X, Song Y, Xu BMG, Zhang H, Sun Z. Genetic relationships among *Enterococcus faecalis* isolates from different sources as revealed by multilocus sequence typing. *J. Dairy Sci*. 2015 Abril; 27(16).
75. Weng P, Ramli R, Nor M, Cheah Y, Awang R. High Genetic Diversity of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing from a Hospital in Malaysia. *Biomed Res Int*. 2013 Mayo; 29(1).
76. Lebreton F, Willems R, Gilmore M. Enterococci: From commensals to leading causes of drug-resistant infection. In Lebreton F, Willems R, Gilmore M. *Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization.*; 2014.
77. Sava I, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Junio; 16(6).
78. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987; 4(4).
79. Torres C, Alonso C, Ruiz L, León R, Del Campo R, Coque T. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol Spectr*. 2018 Julio; 6(4).

80. Murray B. The life and times of the Enterococcus.. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15(4).
81. McBride S, Fischetti V, LeBlanc D, Moellering R, Gilmore M. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*.. *PLoS One*. 2007; 2(7).
82. Woo P, Lau S, Teng J, Tse H, Yuen K. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories.. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14(10).
83. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards.. *Microbiology Today*. 2006; 33(2).
84. PERUTOP. [Online]. [cited 2023 Agosto 29. Available from: https://www.perutoptours.com/index04ar_mapa_arequipa.html.



Anexo 01. Mapa político de la provincia de Arequipa (84).



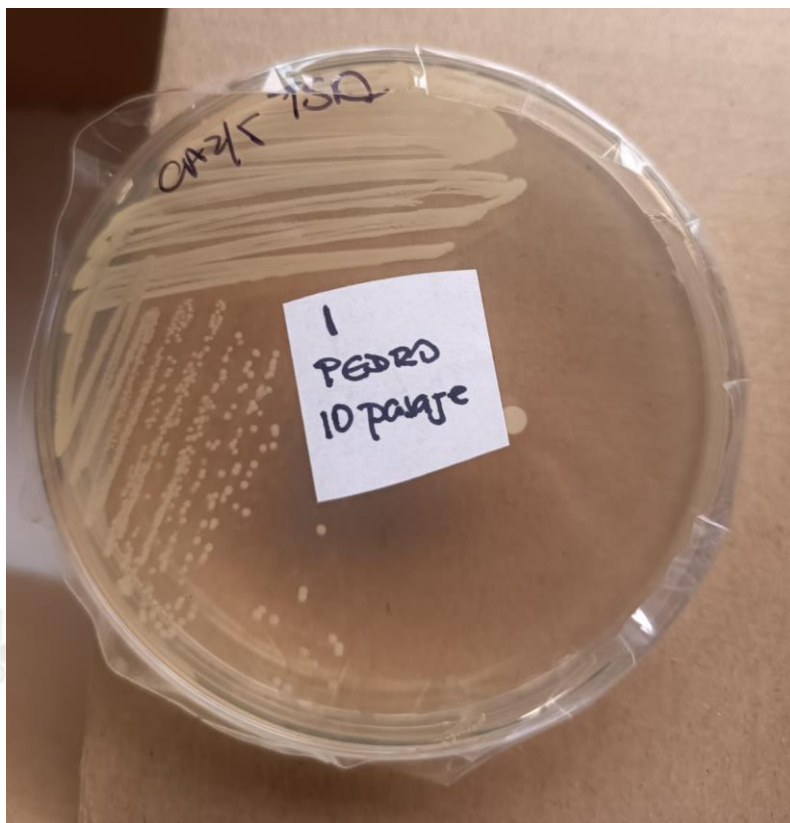


Figura 14. Placa Petri #1 (Pedro) debidamente identificada para envío a EE.UU

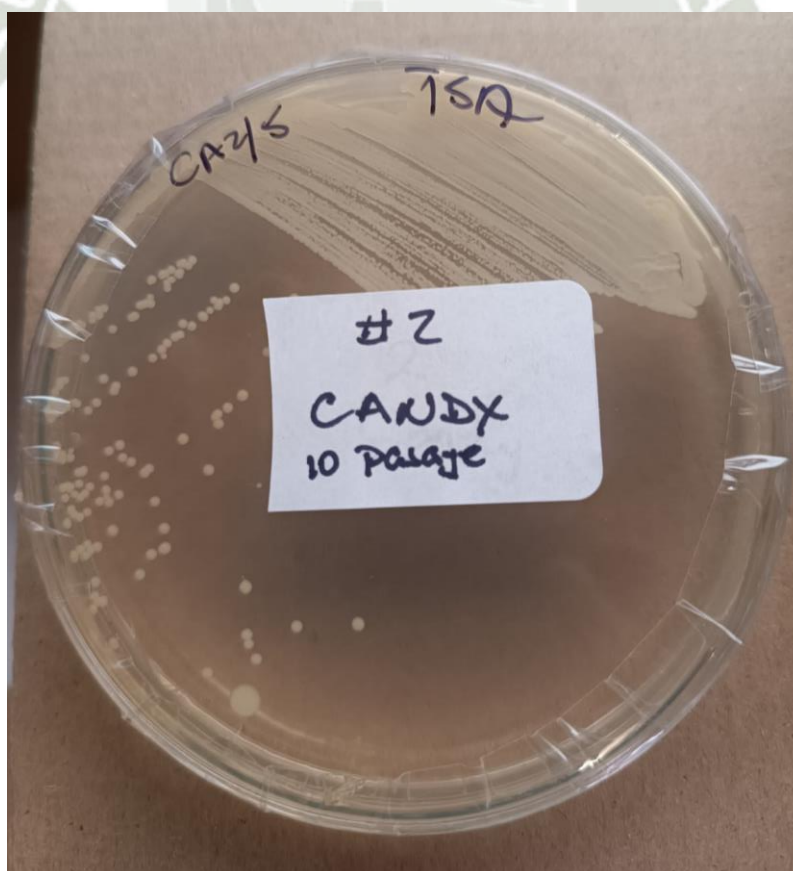


Figura 15. Placa Petri #2 (Candy) debidamente identificada para envío a EE.UU

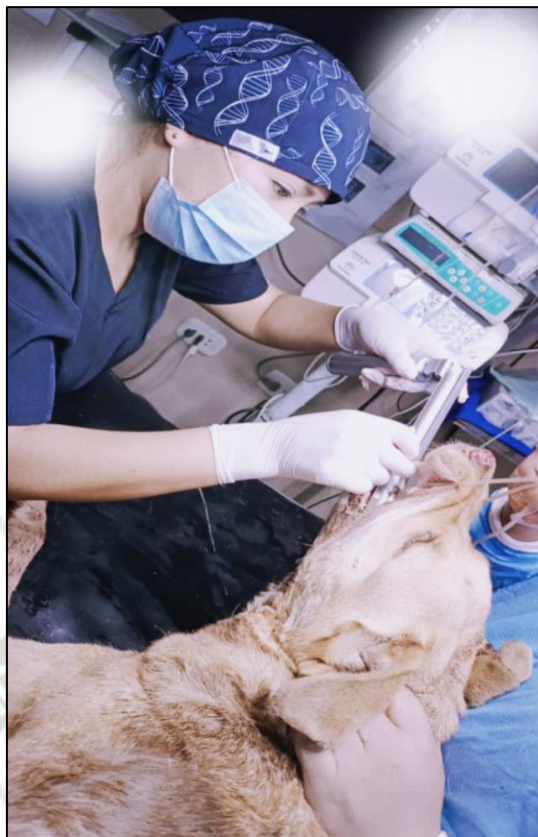


Figura 16. Obtención de Muestra Canino #1 (Pedro)

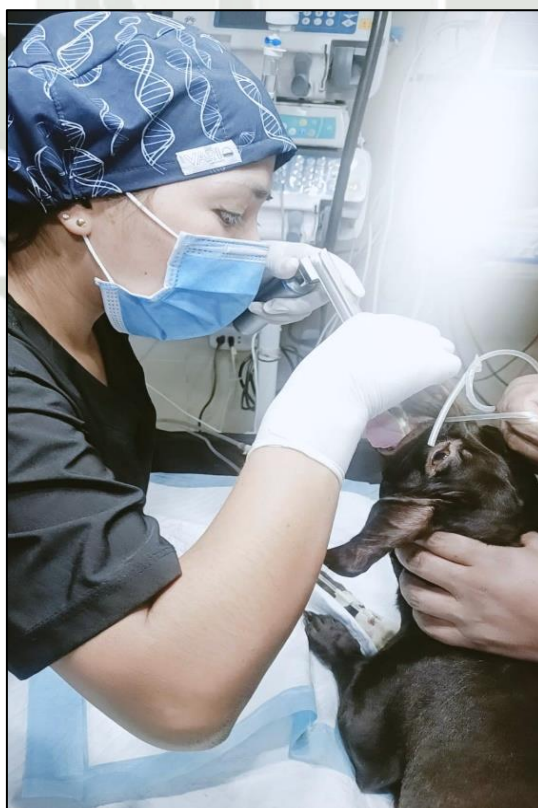



Figura 17. Obtención de Muestra Canino #2 (Candy)

Anexo 02. Resultados de Laboratorio



ENVIADO POR: Clínica Veterinaria & SPA Internacional Palomino SAC	FECHA DE INFORME: 12/06/2024
DIRECCIÓN:	Nro. DE DIAG: 362
	REFERENCIA: CA2/5
	FECHA DE ENVÍO: 14/05/2024
	FECHA DE RECIBIDO: 14/05/2024

REPORTE DE EXAMENES

PROPIETARIO: Clínica Veterinaria & SPA Internacional Palomino	IDENTIF.:
DIRECCIÓN: Calle Antonio Taboada 127	ESPECIE/LAB.: Canis Familiaris
LOCALIDAD: Miraflores	RAZA: No indica
PROVINCIA: Arequipa	SEXO: No indica
DPTO: Arequipa	EDAD: No indica

HISTORIA

PRUEBAS REALIZADAS:


Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
Bacteriología	Hisopado	2	ABA

RESULTADOS

MUESTRA	AISLAMIENTO
Propietario: Adrián Zapana Pedro 2 años	<i>Bordetella bronchispetica</i>
Propietario: Silvia Pari Candy, 7 meses	<i>Bordetella bronchiseptica</i>

METODO EMPLEADO:
Aislamiento de bacterias: cultivos en agar. Identificación: pruebas bioquímicas.

RESPONSABLE: QF. Claudia Choque Málaga.


 C.F. Claudia Choque Málaga
 C.F.O.A. 0214
 JEFE DE LABORATORIO

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A
 Teléfono: 054-213677
 Celular: 978404610
 e-mail: labvetsur@hotmail.com