

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**SECUENCIACIÓN MOLECULAR DEL GEN 16 “S” PARA LA
IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LINFADENITIS EN CUYES**
(Cavia porcellus) AREQUIPA – 2017

**MOLECULAR SEQUENCE OF GEN 16 “S” TO IDENTIFY THE
ETIOLOGICAL AGENT OF LYMPHADENITIS IN GUINEA PIGS**
(Cavia porcellus) AREQUIPA – 2017

Tesis presentada por la Bachiller:
Quispe Avendaño, María Elena Rina
para optar el Título Profesional de:
Médica Veterinaria y Zootecnista
Asesor:
Dr. Fernández Fernández, Fernando

AREQUIPA – PERÚ

2019



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

"IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA"
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN DE PLAN DE TESIS

Señor Magíster
CARLO SANZ LUDENA
Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el plan de Tesis Titulado:

Titulado:
"SECUENCIACIÓN MOLECULAR DEL GEN 16 "S" PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LINFADENITIS EN CUYES (*Cavia porcellus*) AREQUIPA 2017"
presentado por el (la) Sr.(s)(ita):

QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA

Asesor: **MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ**

El jurado dictaminador presidido por el **DR. ALEXANDER OBANDO SANCHEZ** e integrado por la **MGTER. VERONICA VALDEZ NÚÑEZ** y el **MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES**
DICTAMINA

Apto para ejecución.

OBSERVACIONES

Arequipa, 19 de Dic. del 2017

DR. ALEXANDER OBANDO SANCHEZ
Presidente

MGTER. VERONICA VALDEZ NÚÑEZ
Vocal

MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES
Secretario



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INSCRIPCIÓN PLAN DE TESIS 2017

Bachiller: QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA

El jurado dictaminador presidido por el DR. ALEXANDER OBANDO SANCHEZ e integrado por la MGTER. VERÓNICA VALDEZ NÚÑEZ y el MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES; de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos, Título III del Título Profesional de Primera Especialidad, Capítulo III, de la Elaboración, Presentación y Aprobación de un Trabajo de Tesis, Art. 20; el Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

DICTAMINA:

Autorizar la inscripción del Plan de Tesis titulado

“SECUENCIACIÓN MOLECULAR DEL GEN I6 “S” PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LINEFADENITIS EN CUYES (*Cavia porcellus*) AREQUIPA 2017”

presentado por el (la) Sr.(ita) Alumno(a) de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA

por un período de seis (06) meses a partir de la fecha; debiendo el (la) recurrente proceder al desarrollo del mismo, teniendo en cuenta las observaciones del jurado dictaminador del Plan de Tesis.

ASESOR: MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ

Arequipa, 27 de diciembre del 2017



.....
Mgter. FERNANDO SANJURJO LUJANA
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ
jl



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 362036 Fax: (51 54) 251213 ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Aperiado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AMPLIACION DE PLAZO PARA DESARROLLO DE
BORRADOR DE TESIS

Bachiller: QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA;

Viso el Expediente N° 2018-31808, presentado por el señor Bachiller de Medicina Veterinaria y Zootecnia **Bachiller:** QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA, quien está solicitando la ampliación del plazo para el desarrollo de su Borrador de Tesis, ya que por motivos de salud no ha podido cumplir con su trabajo;

De acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos, Título III del Título Profesional de Primera Especialidad, Capítulo III, de la Elaboración, Presentación y Aprobación de un Trabajo de Tesis, art. 20; y por razones de equidad, la Dirección de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

RESUELVE:

Autorizar la ampliación y validez de la inscripción del Tema de Tesis,

"SECUENCIACIÓN MOLECULAR DEL GEN 16 "S" PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LINFADENITIS EN CUYES (*Cavia porcellus*) AREQUIPA 2017"

por un período de (6) meses, a partir del 27 de julio del 2018 al 27 de enero del 2019 debiendo el (la) señor (ita) culminar el desarrollo del mismo, teniendo en cuenta las observaciones del jurado dictaminador del Borrador de Tesis.

Arequipa, 19 de Julio del 2018



MgTER. CARLO SANZ LUBENA
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ
JL



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 392038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERU

“IN SCIENTIA ET FIDE EST FORITITUDO NOSTRA”
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

Señor Magister
CARLO SANZ LUDEÑA
Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el Borrador de Tesis titulado:

“SECUENCIACIÓN MOLECULAR DEL GEN 16 “S” PARA LA IDENTIFICACIÓN
DEL AGENTE CAUSAL DE LINFADENITIS EN CUYES (*Cavia porcellus*) AREQUIPA
2017”

presentado por:

QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA

Asesorado (a) por el(la) DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ

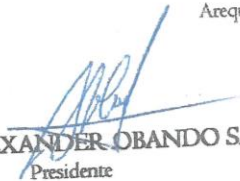
El jurado dictaminador presidido por el DR. ALEXANDER OBANDO SÁNCHEZ, e integrado por la vocal MGTER. VERONICA VALDEZ NÚÑEZ y secretario el MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES;

DICTAMINA:

Aprobado para sustentación

OBSERVACIONES

Arequipa, 26 de Marzo del 2019


DR. ALEXANDER OBANDO SANCHEZ
Presidente


MGTER. VERONICA VALDEZ NÚÑEZ
Vocal


MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES
Secretario



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERU

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN PASE A SUSTENTACIÓN

El jurado dictaminador presidido por el DR. ALEXANDER OBANDO SÁNCHEZ e integrado por la vocal MGTER. VERONICA VALDEZ NÚÑEZ y secretario el MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES;

DICTAMINA:

Que el Borrador de tesis titulado:

“SECUENCIACIÓN MOLECULAR DEL GEN 16 “S” PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LINFADENITIS EN CUYES (*Cavia porcellus*) AREQUIPA 2017”

presentado por (la) Sr.(s)(ita):

QUISPE AVENDAÑO, MARIA ELENA RINA

Puede ser sustentado públicamente después de tener en cuenta las observaciones del dictamen adjunto. Caso contrario, el (la) Bachiller asume la responsabilidad que pudiera derivarse.

Asesor(a): DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ

Arequipa, 27 de Marzo del 2019



MGTER CARLO SANZ LUDENA
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ
JL



A Natividad y Ubaldo, mis padres que me dieron todo el cariño y apoyo que una familia pueda dar.

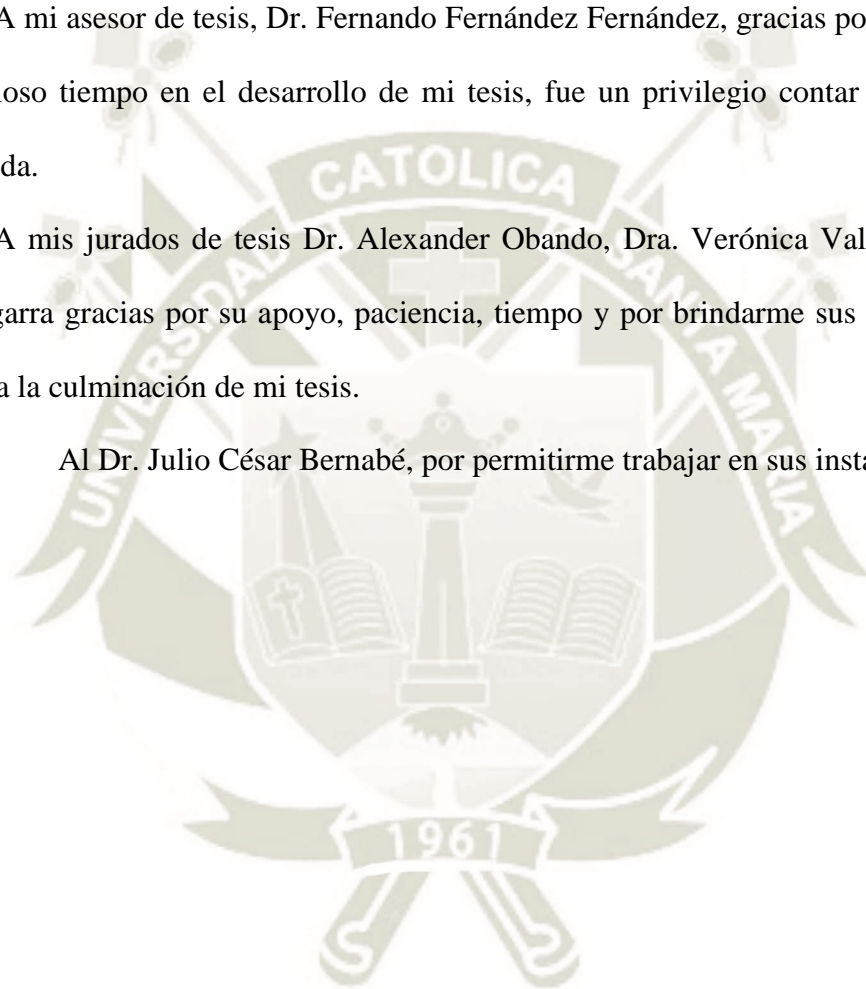
A Yuliana, Lita, Nilda, Ian, Yesita y Aimé, quienes me dieron el aliento para continuar y nunca renunciar a mis sueños. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, Dr. Fernando Fernández Fernández, gracias por brindarme su valioso tiempo en el desarrollo de mi tesis, fue un privilegio contar con su guía y ayuda.

A mis jurados de tesis Dr. Alexander Obando, Dra. Verónica Valdez, Dr. Jorge Zegarra gracias por su apoyo, paciencia, tiempo y por brindarme sus conocimientos para la culminación de mi tesis.

Al Dr. Julio César Bernabé, por permitirme trabajar en sus instalaciones.



INTRODUCCIÓN

El cuy constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos. En los países andinos existe una población estable de más o menos 35 millones de cuyes. En el Perú, país con la mayor población y consumo de cuyes, se registra una producción anual de 16 500 toneladas de carne proveniente del beneficio de más de 65 millones de cuyes, producidos por una población más o menos estable de 22 millones de animales criados básicamente con sistemas de producción familiar. Debido a su capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas, los cuyes pueden encontrarse desde la costa o el llano hasta alturas de 4 500 metros sobre el nivel del mar y en zonas tanto frías como cálidas. Las ventajas de la crianza de cuyes incluyen su calidad de especie herbívora, su ciclo reproductivo corto, la facilidad de adaptación a diferentes ecosistemas y su alimentación versátil que utiliza insumos no competitivos con la alimentación de otros monogástricos (Chauca, 1997).

El cuy como cualquier especie es susceptible a sufrir padecimientos infecciosos, pudiendo ser ellas de diversa naturaleza. El riesgo de enfermedad es alto, por lo que su producción se ve afectada, traduciéndose en pérdidas económicas para el productor de cuyes. Estas enfermedades pueden ser prevenidas con adecuada tecnología de explotación. Los datos de mortalidad producida por linfadenitis en cuyes son subestimados debido a la falta de fuentes reales sobre el tema. La linfadenitis se presenta en cuyes de todas las edades y al ser transmisible horizontalmente y bajo las condiciones epidemiológicas de un criadero rústico y sin control sanitario adecuado, la enfermedad se manifiesta de manera invasiva causando grandes pérdidas en el pequeño productor. Frente a esta problemática, debemos empezar por realizar nuevos estudios sobre las enfermedades infecciosas y sus agentes etiológicos, como diagnosticarlos y seleccionar un tratamiento adecuado. Toda esta nueva información nos permitirá organizar un control sanitario.

RESUMEN

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 (Morales y Barrios, 2017)

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 ningunas 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.

Palabras claves: *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*. amplificación de ADN, reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis, secuenciación molecular, linfadenitis, cuy.



ABSTRACT

The present study was carried out in 4 stages; The first consisted of obtaining samples of cervical abscesses from four guinea pigs with lymphadenitis during the development of the Veterinary Pathology course. Lymphadenitis is a disease that is characterized by the formation of chronic abscesses in lymph nodes, mainly cervical; the inguinal and retroperitoneal lymph nodes may be occasionally involved (Morales and Barrios, 2017)

The second stage consisted in that said samples went through a process of culturing bacteria within which 4 passages were made to purify the samples. This procedure was carried out in the facilities of Laboratorio Lavetsur in a period of 4 days

Immediately afterwards, the purified samples were taken to the facilities of the Biotechnology Institute of ADN Uchumayo E.I.R.L. Dr. Julio Cesar Bernabé and Dr. Jani Pacheco, where they proceeded to extract the DNA of each sample to the stage of obtaining the DNA strands of said bacteria through amplification and electrophoresis processes.

Finally, once the DNA chains were obtained, they were sent for molecular sequencing, this was carried out in the Molecular Biology laboratory of Harvard University in the United States of Northamerica.

Each sequence obtained was analyzed and compared with existing sequences through the use of bioinformatics programs with a database, GenBank, using the BLAST algorithm and Sequence Match.

The general objective of this work was to molecularly identify the etiological agent causing lymphadenitis in guinea pigs (*Cavia porcellus*) by molecular sequencing of the 16S gene from the isolation of four bacterial strains of the cervical abscesses of guinea pigs, of which four nucleotide sequences were obtained.

By associating the sequences of four bacterial strains isolated from cervical abscesses of guinea pigs, in the Gen Bank Software, it was observed that the four isolates are found with an identity less than 100%, so it can be concluded that the four sequences Bacterial from the isolated strains do NOT correspond to any of those registered in the Gen Bank.

The four sequences of the isolated bacterial strains present an identity with strains registered in the Gen Bank between 95% and 99% as maximum identity, of which three

strains are similar in large percentage to *Streptococcus equi*, and one strain has a high percentage of similarity with *Staphylococcus warneri*.

When constructing the phylogenic tree of the sequences it was observed that of the four sequences, one it appears in a form far from the center of the main branch, indicating that it is a strain of the bacterial family but much older and three strains are found within the branches of the phylogenetic tree.

Key words: *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, DNA amplification, polymerase chain reaction, electrophoresis, molecular sequencing, lymphadenitis, guinea pigs.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xii
ÍNDICE.....	xiv
CAPITULO I.....	1
1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO	1
1.1. Enunciado del problema.....	1
1.2. Descripción del problema.....	1
1.3. Justificación del trabajo	1
1.3.1. Aspecto general	1
1.3.2. Aspecto tecnológico	2
1.3.3. Aspecto social.....	2
1.3.4. Aspecto económico.....	2
1.3.5. Importancia del trabajo.....	2
1.4. Objetivos.....	3
1.4.1. Objetivo general	3
1.4.2. Objetivos específicos.....	3
1.5. Planteamiento de la hipótesis	3
CAPITULO II.....	4
2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL.....	4
2.1. Análisis bibliográfico	4
2.1.1. Aspectos Generales del Cuy	4
2.1.2. Enfermedades Infecciosas en cuyes	10
2.1.3. <i>Streptococcus</i>	13
2.1.4. Procedimientos de diagnóstico	23
2.1.5. Técnicas moleculares.....	28
2.2. Antecedentes de la investigación.....	49
2.2.1. Revisión de tesis universitarias.....	49
2.2.2. Otros trabajos de investigación	54

CAPITULO III.....	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1. Materiales	59
3.1.1. Localización del trabajo.....	59
3.1.2. Material biológico	59
3.1.3. Material de laboratorio	59
3.1.4. Equipo y maquinaria.....	60
3.1.5. Otros materiales	60
3.2. Métodos	60
3.2.1. Muestreo:	60
3.2.2. Métodos de la evaluación	61
3.2.3. Variables de respuesta	66
CAPITULO IV	67
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1. Secuencia de Cepa 15M1_27F	68
4.2. Electroferograma de la cepa 15M1_27F	69
4.3. Análisis Bioinformático de la cepa 15M1_27F.....	70
4.4. Árbol filogenético de la cepa 15M1_27F	71
4.5. Secuencia de Cepa 16M2_27F	72
4.6. Electroferograma de la cepa 16M2_27F	73
4.7. Análisis Bioinformático de la secuencia 16M2-27F.	74
4.8. Árbol filogenético de la cepa 16M2_27F	75
4.9. Secuencia de Cepa 17M3_27F	76
4.10. Electroferograma de la cepa 17M3_27F	77
4.11. Análisis Bioinformático de la secuencia 17M3_27F.....	78
4.12. Árbol filogenético de la cepa 17M3_27F	79
4.13. Secuencia de Cepa 18M4_27F	80
4.14. Electroferograma de la cepa 18M4_27F	81
4.15. Análisis Bioinformático de la secuencia 18M4_27F.....	82
4.16. Árbol filogenético de la cepa 18M4_27F	83
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES.....	85

BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS	90



CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1. Enunciado del problema

Secuenciación Molecular del Gen 16 “S” para la Identificación del agente causal de Linfadenitis en Cuyes (*Cavia porcellus*)

1.2. Descripción del problema

La identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y la aplicación de un tratamiento adecuado frente a las enfermedades infecciosas que puede afectar en la producción de cuyes. Se ha identificado especies de *Streptococcus* y *Staphylococcus* como agentes etiológicos que producen la linfadenitis en cuyes, siendo los más importantes por causar una alta tasa de morbilidad y mortalidad. En la actualidad, la mayor parte de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el aislamiento previo del agente patógeno y se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita de mucho tiempo, resulta difícil o incluso, imposible. En estas circunstancias, la identificación de la secuencia molecular basada en el análisis de los genes, puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

1.3. Justificación del trabajo

1.3.1. Aspecto general

La determinación de la secuencia molecular de nucleótidos es un proceso muy importante, que permite establecer el orden exacto de los nucleótidos que forman una secuencia concreta de ADN, esta valiosa información se puede aplicar en la genética clínica porque permite la caracterización molecular de un gran número de enfermedades y así mismo identificar el microorganismo en estudio.

1.3.2. Aspecto tecnológico

El desarrollo de nuevas técnicas moleculares han venido a substituir los métodos intensivos de trabajo empleados previamente. Esta nueva técnica molecular en la actualidad le han permitido a los científicos tener un gran avance en el área de la medicina como de la investigación, ya que gracias a su desarrollo es que se ha logrado llevar a cabo la producción de medicamentos y vacunas para combatir una serie de enfermedades, incluso incurables, que afectan desde hace tiempo al hombre como a los animales de manera individual como colectiva.

1.3.3. Aspecto social

En efecto la información que se obtenga a partir de la secuenciación molecular de los ácidos nucleicos nos permitirá conocer cómo se asocia la enfermedad con la variabilidad genética, lo que nos sirve como una valiosa fuente de información para los clínicos y especialistas en laboratorio. La posibilidad de tener un beneficio clínico a partir de la secuenciación de nucleótidos depende de la capacidad de los profesionales que trabajan en esta área para interpretar los resultados genéticos y decidir qué tipo de pruebas o protocolo seguir a continuación.

1.3.4. Aspecto económico

La secuenciación molecular es el medio más preciso y sensitivo, se espera que se convierta en un futuro próximo en un procedimiento de uso común en cualquier laboratorio. Sin embargo, el tiempo requerido y los costos del procedimiento actualmente limitan el uso de este método. Con el rápido progreso de la automatización, es probable que en los siguientes años la secuenciación pueda ser utilizada para la tipificación epidemiológica de virus, bacterias y otros.

1.3.5. Importancia del trabajo

El uso de esta novedosa técnica de genética molecular va facilitar el diagnóstico clínico rápido y certero del agente etiológico causante de la enfermedad. Esta técnica puede ser utilizada también en investigaciones epidemiológicas además de permitir determinar la virulencia de un aislamiento por la identificación de los genes asociados con las propiedades patógenas. Por lo que una adecuada y más amplia aplicación de estas técnicas puede dar luz a la epidemiología de

infecciones adquiridas por el hombre y/o animales, permitiéndole con ello tener un control más eficaz de estas, así como llevar a cabo mejores estrategias de prevención.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Identificar el agente etiológico causante de la linfadenitis en cuyes (*Cavia porcellus*) mediante secuenciación molecular del gen 16S.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar la estructura molecular del agente etiológico de la linfadenitis.
- Comparar las secuencias obtenidas.
- Establecer relaciones filogenéticas entre las cepas encontradas con las cepas registradas en el Genbank.
- Describir las fases para la obtención de la secuencia molecular del agente etiológico de la linfadenitis.

1.5. Planteamiento de la hipótesis

Dado que la secuenciación molecular brinda características específicas de un fragmento de ADN, es posible que la secuenciación del gen 16S de agentes aislados de linfadenitis en cuyes sirva para identificar el agente causal.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

2.1. Análisis bibliográfico

2.1.1. Aspectos Generales del Cuy

2.1.1.1. Clasificación taxonómica

Reino	: Animal
Phylum	: Vertebrata
Clase	: Mamalia
Orden	: Rodentia
Suborden	: Hystricomorpha
Familia	: Caviidae
Género	: Cavia
Especie	: <i>Cavia porcellus</i>

(Linnaeus, citado por Moreno 1989)

2.1.1.2. Distribución y dispersión actual

El hábitat del cuy es muy extenso. Se han detectado numerosos grupos en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, noroeste de Argentina y norte de Chile, distribuidos a lo largo del eje de la cordillera andina. Posiblemente el área que ocupan el Perú y Bolivia fue el hábitat nuclear del género *Cavia*. Este roedor vive por debajo de los 4 500 metros sobre el nivel del mar, y ocupa regiones de la costa y la selva alta. El hábitat del cuy silvestre, según la información zoológica, es todavía más extenso. Ha sido registrado desde América Central, el Caribe y las Antillas hasta el sur del Brasil, Uruguay y Paraguay en América del Sur. En Argentina se han reconocido tres especies que tienen como hábitat la región andina. La especie *Cavia aperea tschudii* se distribuye en los valles interandinos del Perú, Bolivia y noroeste de la Argentina; la *Cavia aperea aperea* tiene una distribución más amplia que va desde el sur del Brasil, Uruguay hasta el noroeste de la Argentina; y la *Cavia porcellus* o *Cavia cobaya*, que incluye

la especie domesticada, también se presenta en diversas variedades en Guayana, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Chauca, 1997).

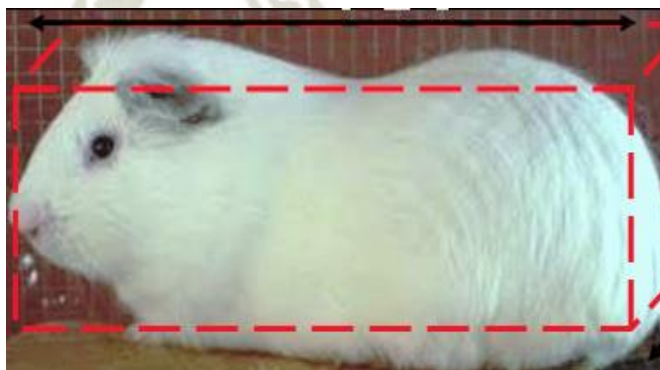
2.1.1.3. Características del comportamiento

Por su docilidad los cuyes se crían como mascotas en diferentes países. Como animal experimental en los bioterios se aprecia por su temperamento tranquilo, que se logra con el manejo intensivo al que son expuestos; algunas líneas albinas se seleccionan por su mansedumbre. El cuy como productor de carne ha sido seleccionado por su precocidad y su prolificidad, e indirectamente se ha tomado en cuenta su mansedumbre. Sin embargo, se tiene dificultad en el manejo de los machos en recua. Hacia la 10a semana inician las peleas que lesionan la piel, bajan sus índices de conversión alimenticia y las curvas de crecimiento muestran una flexión. Las hembras muestran mayor docilidad por lo que se las puede manejar en grupos de mayor tamaño (Chauca, 1997).

2.1.1.4. Clasificación según la conformación

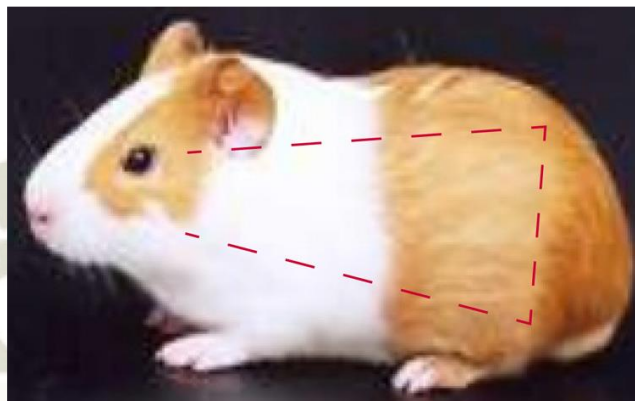
Tipo A.

Corresponde a cuyes «mejorados» que tienen una conformación enmarcada dentro de un paralelepípedo, clásico en las razas productoras de carne. La tendencia es producir animales que tengan una buena longitud, profundidad y ancho. Esto expresa el mayor grado de desarrollo muscular, fijado en una buena base ósea. Son de temperamento tranquilo, responden eficientemente a un buen manejo y tienen buena conversión alimenticia.



Tipo B.

Corresponde a los cuyes de forma angulosa, cuyo cuerpo tiene poca profundidad y desarrollo muscular escaso. La cabeza es triangular y alargada. Tienen mayor variabilidad en el tamaño de la oreja. Es muy nervioso, lo que hace dificultoso su manejo.



2.1.1.5. Razas de cuyes

Raza Perú

La raza Perú es una raza pesada, con desarrollo muscular marcado, es precoz y eficiente convertidor de alimento. El color de su capa es alazán con blanco; puede ser combinada o fajada, por su pelo liso corresponde al Tipo A. Puede o no tener remolino en la cabeza, orejas caídas, ojos negros, y, dentro de este tipo, puede haber también cuyes de ojos rojos, lo que no es recomendable.



Raza Andina

Se caracteriza por su alta prolificidad y alta incidencia de gestación post parto. La raza andina se adapta a los ecosistemas de costa, sierra y selva alta, desde el nivel del mar hasta los 3500 m.s.n.m. En los galpones donde la temperatura supera los 28°C se presentan problemas reproductivos.



Raza Inti

Se caracteriza por poseer un pelaje lacio y corto, además de presentar color bayo (amarillo) en todo el cuerpo o combinado con blanco. Posee una forma redondeada. Es la raza que mejor se adapta al nivel de los productores logrando los más altos índices de sobrevivencia. A las diez semanas alcanza los 800 gramos, con una prolificidad de 3.2 crías por parto. Es una raza intermedia entre la raza Perú y la Andina; es un animal prolífico y se adapta fácilmente a diferentes pisos altitudinales.



Raza Mantaro

Es una raza de reciente liberación por la estación experimental INIA Santa Ana de Huancayo.



2.1.1.6. Clasificación según el pelaje

Tipo 1

Es de pelo corto, lacio y pegado al cuerpo, es el más difundido y caracteriza al cuy peruano productor de carne. Puede o no tener remolino en la frente. Se encuentran de colores simples claros, oscuros o combinados. Es el que tiene el mejor comportamiento como productor de carne.



Tipo 2

Es de pelo corto, lacio pero forma rosetas o remolinos a lo largo del cuerpo, es menos precoz. Está presente en poblaciones de cuyes criollos, existen de diversos colores. No es una población dominante, por lo general en cruzamiento con otros tipos se pierde fácilmente. Tiene buen comportamiento como productor de carne.



Tipo 3

Es de pelo largo y lacio, presenta dos subtipos que corresponden al tipo 1 y 2 con pelo largo, así tenemos los cuyes del subtipo 3-1 presentan el pelo largo, lacio y pegado al cuerpo, pudiendo presentar un remolino en la frente. El subtipo 3-2 comprende a aquellos animales que presentan el pelo largo, lacio y en rosetas. Está poco difundido pero bastante solicitado por la belleza que muestra. No es buen productor de carne, si bien utilizado como mascota.



Tipo 4

Es de pelo ensortijado, característica que presenta sobre todo al nacimiento, ya que se va perdiendo a medida que el animal se desarrolla, tornándose en erizado. Este cambio es más prematuro cuando la humedad relativa es alta. Su forma de cabeza y cuerpo es redondeado, de tamaño medio. Tiene una buena implantación muscular y con grasa de infiltración, el sabor de su

carne destaca a este tipo. La variabilidad de sus parámetros productivos y reproductivos le da un potencial como productor de carne.



2.1.1.7. Sanidad en cuyes

La mortalidad existente en la crianza de cuyes, como consecuencia del desconocimiento de alternativas en el área de salud animal, es lo que limita el desarrollo de la crianza. En los países andinos la cría de cuyes se realiza de manera tradicional en el sistema familiar. Se viene haciendo esfuerzos a fin de mejorar este sistema difundiendo tecnología apropiada para mejorar su producción. A causa de problemas sanitarios se tiene la mayor merma de la producción, por lo que se vienen identificando las causas de mortalidad para tomar medidas de prevención y control.

Los cuyes pueden padecer enfermedades bacterianas, virales, parasitarias y orgánicas. Las causas que predisponen las enfermedades son los cambios bruscos en su medio ambiente, considerando variaciones de temperatura, alta humedad, exposición directa a corrientes de aire, sobre densidad, falta de limpieza en camas, deficiente alimentación, entre otras (Chauca, 1997).

2.1.2. Enfermedades Infecciosas en cuyes

El cuy como cualquier especie es susceptible a sufrir enfermedades infecciosas, pudiendo ser ellas de diversa naturaleza. El riesgo de enfermedad es alto, pero factible de ser prevenida con adecuada tecnología de explotación. La enfermedad, de cualquier etiología, deprime la producción del criadero, traduciéndose en pérdidas económicas para el productor de cuyes. Hoy en día que la crianza de cuyes se orienta a consolidarse como una explotación intensiva

basada en aspectos técnicos de manejo, alimentación y mejoramiento genético, urge la necesidad de poseer un adecuado programa sanitario, que asegure el mantenimiento de los logros obtenidos en las otras disciplinas (Chauca, 1997).

2.1.2.1. Linfadenitis

Es una enfermedad bacteriana que afecta a los cuyes, se caracteriza por la formación de abscesos crónicos en los linfonódulos, principalmente cervicales, aunque los linfáticos inguinales y retroperitoneales pueden ocasionalmente estar involucrados (Morales y Barrios, 2017).

Los estreptococos piógenos se encuentran asociados con la formación de abscesos, septicemias y otras condiciones supurativas. Los agentes responsables de la enfermedad son: *Streptococcus pyogenes* y el *Streptobacillus*. El contagio se da por contacto directo con secreciones orales. Puede producirse sinusitis, otitis y descender a las vías respiratorias ocasionando bronquitis y neumonía intersticial (Chauca, 1997).

La penicilina G y la ampicilina son eficaces frente a la mayoría de los estreptococos β -hemolítico. Las colonias de gatos y cobayas que se emplean en los laboratorios como animales de experimentación a veces padecen de linfadenitis cervical producida, respectivamente por *S. canis* y por *S. zooepidemicus*. Ténganse en cuenta que la denominación *S. zooepidemicus* es una de las varias denominaciones de los estreptococos que no tienen respaldo oficial en la taxonomía bacteriana (Véase la tabla 1). En su tratamiento se puede emplear las cefalosporinas, el cloranfenicol y las asociaciones trimetoprim-sulfas (Biberstein y Chung, 1990).

Todos los *S. pyogenes* son susceptibles a penicilina G y la mayoría a eritromicina. Algunos son resistentes a tetraciclinas (Brooks, Carroll, Butel y Morse, 2008). *S. pyogenes* es muy sensible a la penicilina, por lo que se puede emplear penicilina V oral o amoxicilina para tratar la faringitis estreptocócica. En pacientes con alergia a la penicilina puede utilizarse una cefalosporina oral o un macrólido. Se recomienda el empleo combinado de penicilina con un antibiótico inhibidor de la síntesis proteica (p.ej., clindamicina) en las infecciones sistémicas graves. Las resistencias o la mala respuesta clínica han limitado la utilidad de las tetraciclinas o las

sulfamidas y están aumentando las resistencias a la eritromicina y a macrólidos más recientes por ejemplo; azitromicina y claritromicina (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2014).

Tabla 1. Diferenciación de las especies de estreptococos propios de los animales

<i>Streptococcus</i>	Grupo de Lancefield	Hemolisis	Acido de Lactosa	Acido de Trealosa	Otras pruebas diagnosticas
<i>Pyogenes</i>	A	B	+	+	Inhibida por el disco de bacitracina de 0,04 µg
<i>Agalactiae</i>	B	β ^a	+	+	CAMP +
<i>Dysgalactiae</i>	C	A	+	+	
<i>Equi</i>	C	B	-	-	
<i>Equisimilis^b</i>	C	B	D	+	
<i>Zooepidermicus^c</i>	C	B	+	-	
<i>Faecalis^d</i>	D	(α) ^a	+	+	arabinosa -
<i>Faecium^d</i>	D	A	+	+	arabinosa +
<i>Suis</i>	R,S,T,-	A	+	+	Bilis-esculina +
<i>Grupo E^e</i>	E	B	D	+	Manitol +
<i>Canis</i>	G	B	+	-	
<i>Uberis</i>	-	(α) ^a	+	+	
<i>Pneumoniae</i>	-	A	+	+	Inhibida por la optoquina

Fuente: Biberstein y Chung, 1990

Nota: + = Más del 90% de las cepas positivas; - = menos del 10% de las cepas positivas; d = más del 10% y menos del 90% de las cepas positivas.

a Existen excepciones.

b Es una especie no admitida oficialmente; se describe como subgrupo de *S. dysgalactiae*.

c Es una especie que no está admitida oficialmente; se describe como subespecie de *S. equi*.

d Para estas especies ha sido propuesto el género *Enterococcus*.

e Subgrupo de *S. porcinus*, que incluye representantes de los grupos E, P, U y V de Lancefield.

2.1.3. *Streptococcus*

El género *Streptococcus* es un grupo formado por diversos cocos grampositivos que normalmente se disponen en parejas o en cadenas (a diferencia de los racimos formados por *Staphylococcus*). La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnófilico). Sus exigencias nutricionales son complejas, y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar carbohidratos, proceso que produce ácido láctico, y son catalasa-negativos, a diferencia de las especies del género *Staphylococcus*. (Murray et al., 2014).

El *Streptococcus pyogenes* es un estreptococo β -hemolítico y capsulado. Presenta el antígeno de pared celular específico del Grupo A de los estreptococos, formado por ramnosa y β -N-acetilglucosamina, así como antígenos específicos de tipo como son las proteínas M, T, R. La capsula está formada por ácido hialurónico compuesto por unidades de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. Su hábitat natural es la cavidad bucal y el tracto respiratorio superior del hombre y del animal (Vadillo, 2002).

El *Streptococcus agalactiae*, es la única especie que tiene el antígeno del grupo B (Murray et al., 2014). Es el principal agente productor de la mastitis bovina, junto con *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, también se asocia a procesos septicémicos, pielonefritis y neumonía en perros, así como peritonitis septicemia y placentitis en gatos, siendo reservorios del microorganismo el aparato urogenital de los animales sanos (Vadillo, 2002).

El *Streptococcus dysgalactiae*, está incluido dentro del grupo de estreptococos piógenos, pertenece al grupo C de Lancefield, y se diferencia por ser α -hemolítico en agar sangre de ovino. Participa en la producción de mastitis bovinas.

El *Streptococcus equi subsp. equi*, se encuentra dentro del grupo de estreptococos piógenos y es β -hemolítico. Responsable de la papera, gurma o

moquillo equino. La transmisión se produce por vía aérea principalmente a partir de animales enfermos o portadores sanos, aunque existe contagio a través de heridas, por vía genital, mamaria o incluso intrauterina. La enfermedad, tras un periodo de incubación de 1-8 días, se caracteriza por una inflamación de las mucosas del tracto respiratorio superior, con la aparición de una secreción nasal serosa o purulenta y la formación de abscesos en los ganglios linfáticos regionales (más frecuentemente en los submaxilares), que normalmente se abren al exterior mediante fístulas (Vadillo, 2002).

Streptococcus equi subsp. equisimilis/ Streptococcus equi subsp. zooepidemicus

Son estreptococos piógenos que pertenecen al grupo C, β -hemolíticos. Son responsables de infecciones neonatales, formación de abscesos, endometritis y mastitis en los equinos. En porcinos, se han presentado procesos septicémicos, artríticos de animales jóvenes, endocarditis, problemas de infertilidad y abortos en hembras gestantes. Y en perros presentan cuadros de neumonía purulenta y septicemias (Vadillo, 2002).

El *Streptococcus suis*, esta especie puede presentar el antígeno específico del grupo D, pero también puede reaccionar con los grupos R, S y T de Lancefield. Fue oficialmente descrito como una nueva especie en 1987 por Kilpper-Balz y Schleifer, quienes demostraron que era genéticamente homogénea y diferente de los otros miembros del grupo D de Lancefield (Vadillo, 2002).

2.1.3.1. Fisiología y estructura

Los cocos individuales son esféricos u ovoides y se disponen en cadenas (figura 1). Se dividen según un plano perpendicular al eje largo de la cadena. La longitud de las cadenas varía ampliamente y está condicionada a factores ambientales. Los estreptococos son grampositivos; sin embargo, mientras un cultivo envejece y las bacterias mueren, pierden su grampositividad y se tornan gramnegativos; esto puede ocurrir después de la incubación durante una noche. Producen cápsulas compuestas por ácido hialurónico, las cápsulas son notables en los cultivos jóvenes. Impiden la fagocitosis. La pared de la célula estreptocócica contiene proteínas (antígenos M, T, R), carbohidratos (específicos de grupo) y péptidoglucanos. Los pili semejantes a vellosidades se prolongan a través de

la cápsula de los estreptococos del grupo A. Los pili contienen en parte proteína M y están cubiertos de ácido lipoteicoico, este último es importante para la adhesión de los estreptococos a las células epiteliales (Brooks et al., 2008).

La composición de la pared celular de los estreptococos está compuesta fundamentalmente de peptidoglicano, en el cual se encuentran embebidos una variedad de hidratos de carbono, ácidos teicoicos, lipoproteínas y antígenos de proteínas de superficie. El trabajo pionero de Rebecca Lancefield estableció el sistema de agrupación de Lancefield para los estreptococos beta hemolíticos. Los antígenos detectados por el sistema de agrupación de Lancefield son polisacáridos de pared celular (Koneman et al., 1999). Se ha estudiado detalladamente la estructura antigénica de *S. pyogenes*. El marco estructural básico de la pared celular es la capa de peptidoglicano, la cual tiene una composición parecida a la de otras bacterias gram positivas. En el interior de la pared celular se encuentran los antígenos específicos de grupo y de tipo. El carbohidrato específico de grupo, el cual constituye aproximadamente el 10% del peso seco de la célula (antígeno del grupo A de Lancefield) es un dímero de N-acetilglucosamina y de ramnosa. Este antígeno se usa para clasificar a los estreptococos del grupo A y distinguirlos de otros grupos de estreptococos. La proteína M es la principal proteína específica de tipo que se asocia a los estreptococos virulentos. Se compone de dos cadenas polipeptídicas que forman una hélice alfa. La proteína se ancla a la membrana citoplasmática, se extiende a través de la pared celular y sobresale por encima de la superficie celular. El extremo carboxilo, que está anclado en la membrana citoplasmática, y la porción de la molécula incluida en la pared celular están muy conservadas (por secuencia de aminoácidos) en todos los estreptococos del grupo A. El extremo amino, que se extiende sobre la superficie celular, origina las diferencias antigénicas observadas entre los más de cien serotipos de proteínas M. Otros componentes importantes de la pared celular de *S. pyogenes* son las proteínas de tipo M, el ácido lipoteicoico y la proteína F. Las proteínas de tipo M están codificadas por un complejo de más de 20 genes que componen la superfamilia de genes emm. Estos genes

codifican la proteína M, las proteínas del tipo M y otras proteínas que se unen a las inmunoglobulinas (Ig). El ácido lipoteicoico y la proteína F facilitan la unión de las células del hospedador, al formar un complejo con la fibronectina que se encuentra presente en la superficie de las células del hospedador. Algunas cepas *S. pyogenes* tienen una cápsula externa de ácido hialurónico, que no se diferencia a nivel antigénico del ácido hialurónico presente en los tejidos conjuntivos de mamífero. Dado que la cápsula puede proteger a la bacteria de la fagocitosis, las cepas encapsuladas son las responsables más probables de las infecciones sistémicas graves (Murray et al., 2014).



Figura.1 Estreptococos que crecen en caldo; se observan cocos grampositivos en cadenas (Brooks et al., 2008).

2.1.3.2. Características de su crecimiento

Tienen necesidades de crecimiento bastante exigente que son adecuadamente satisfechas por los medios que contienen sangre o suero.

Tras su incubación a 37°C durante una noche, crecen formando colonias transparentes, que generalmente tienen un diámetro de menos de 1mm (Biberstein y Chung, 1990). La energía se obtiene principalmente por aprovechamiento de los azúcares. El crecimiento de los estreptococos tiende a ser escaso sobre medio sólido o en caldo, a menos que sea enriquecido con sangre o líquidos tisulares. Los requerimientos nutritivos varían ampliamente entre las diferentes especies. El crecimiento y hemólisis se favorecen por incubación en 10% de CO₂. La mayor parte de los

estreptococos hemolíticos patógenos crece mejor a 37°C. La mayor parte de los estreptococos son anaeróbicos facultativos y crecen tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Brooks et al., 2008).

2.1.3.3. Resistencia

Son capaces de sobrevivir durante semanas en el pus seco. A temperaturas comprendidas entre 55-60°C son destruidos en un plazo de 30 minutos, y son inhibidos por las concentraciones de cloruro sódico del 6,5 por cien y de bilis del 40 por cien, del 0,1 por cien de azul de metileno, así como por las temperaturas bajas 10°C y elevadas 45°C. Suelen ser sensibles a las penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, cloranfenicol y a las asociaciones trimetoprim-sulfonamidas; con frecuencia son resistentes a los aminoglucósidos y a la tetraciclina (Biberstein y Chung, 1990).

2.1.3.4. Variabilidad

En la mayoría de las especies de estreptococos excepto en *S. equi*, existen subdivisiones serológicas. *S. pyogenes* tiene unos 70 inmunitipos, basados en la proteína M y en otras proteínas. El cambio de la forma lisa a la rugosa (colonias mates) va acompañada de la pérdida de la proteína M y de la virulencia. También existen formas L (Biberstein y Chung, 1990). Variantes de la misma cepa de estreptococos pueden mostrar colinas de morfologías distintas. Esto es particularmente notorio en las cepas de *S. pyogenes*, cuyas colonias pueden aparecer mate o brillantes. Las colonias mate suelen corresponder a organismos que producen mucha proteína M y, generalmente, son virulentos. Los *S. pyogenes* de colonias brillantes producen poca cantidad de proteína M y no suelen ser virulentos (Brooks et al., 2008).

2.1.3.5. Factores de Virulencia

La virulencia de los estreptococos del grupo A está determinada por la capacidad de las bacterias de adherirse a la superficie de las células del hospedador, invadir las células epiteliales y producir una variedad de toxinas y de enzimas. *S. pyogenes* puede invadir las células epiteliales, en un proceso mediado por la proteína M y la proteína F, así como por otros antígenos bacterianos. Se considera que esta internalización es importante

tanto para el mantenimiento de las infecciones persistentes como para la invasión de los tejidos profundos (Murray et al., 2014). Los mecanismos de virulencia de los estreptococos betahemolíticos grupo A (*S. pyogenes*) son los más estudiados. El principal antígeno de pared celular del grupo A es un polisacárido complejo que consiste en L-ramnosa y N-acetil-D-glucosamina, en su relación de 2:1. El antígeno se encuentra unido en forma covalente al peptidoglicano. El papel del antígeno agrupante de pared como factor de virulencia no se conoce, aunque el material de peptidoglicano tiene actividad biológica por sí mismo, como, inducción de fiebre, necrosis dérmica y cardíaca en animales, lisis de eritrocitos y plaquetas, y aumento de la resistencia inespecífica. Algunas cepas del grupo A poseen una cápsula compuesta por ácido hialurónico (Koneman et al., 1999). La proteína M, es una sustancia como factor importante de virulencia para el *S.pyogenes* del grupo A. la proteína M tiene la apariencia de prolongaciones semejantes a pelos de la pared celular del estreptococo (figura 2). Cuando la proteína M está presente en los estreptococos son virulentos, y en ausencia de anticuerpos específicos tipo M, pueden resistir la fagocitosis efectuada por los leucocitos polimorfonucleares (Brooks et al., 2008).

2.1.3.6. Toxinas y enzimas

Las exotoxinas de *S. pyogenes* incluyen las hemolisinas (estreptolisinas O y S), la hialuronidasa, la DNAasa, la NADasa, la proteasa, la estreptoquinasa (una fibrinolisisina), y una toxina pirógena codificada en un fago, responsable del sarpullido de la escarlatina. Su significación patógena se ha delimitado escasamente. La umayoría de estas toxinas inducen respuestas inmunes a lo largo de la infección. En los estreptococos de origen animal existen toxinas equivalentes. (Biberstein y Chung ,1990).

Los estreptococos del grupo A producen dos hemolisinas: la estreptolisina O y la S. La estreptolisina O (SLO) es lábil al oxígeno, antigénica, inhibida por el colesterol y tóxica por una variedad de tipos celulares, entre los que se incluyen leucocitos, monocitos y células en cultivo. Debido a su labilidad frente al oxígeno, es el responsable fundamental de la betahemólisis que se observa alrededor de las colonias de estreptococos A que se ven por debajo de la superficie del agar de placas inoculadas. La estreptolisina S (SLS) es

estable frente al oxígeno, no es antigénica y también es tóxica para una variedad de tipos celulares. La estreptolisina S (SLS) se encuentra en su mayor parte unida a la célula y puede ser responsable del efecto leucotóxico de los estreptococos del grupo A, como se evidencia por la muerte de cierta proporción de leucocitos que fagocitan a esos estreptococos. La SLS es activa tanto en la hemólisis superficial como por debajo de la superficie cuando los microorganismos se cultivan en agar sangre de carnero. Tanto la SLO como la SLS pueden producir daño a tipos celulares no eritrocíticos, con la formación de fisuras y poros en la membrana celular y el consiguiente escape de componentes celulares (Koneman et al., 1999).

Las exotoxinas pirógenas estreptocócicas (Spe), conocidas originalmente como toxinas eritrogénicas, son fabricadas por las cepas lisogénicas de los estreptococos y son semejantes a la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae*. Se han descrito cuatro toxinas termolábiles inmunológicamente distintas (SpeA, SpeB, SpeC y SpeF) en *S. pyogenes* y en un reducido número de cepas estreptocócicas pertenecientes a los grupos C y G. Estas toxinas actúan como superantígenos e interaccionan tanto con los macrófagos como con los linfocitos T cooperadores con un aumento de la liberación de citosinas proinflamatorias. La estreptolisina S es una hemolisina estable en presencia de oxígeno, no inmunogénica y ligada a la célula que puede lisar eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La estreptolisina S puede estimular también la liberación de los contenidos lisosómicos después de ser englobada por este orgánulo y provoca la subsiguiente destrucción de la célula fagocítica. La estreptolisina S se produce en presencia de suero (la S indica estable en suero) y es la responsable de la β -hemólisis característica que se observa en el medio agar sangre. La estreptolisina O es una hemolisina lábil al oxígeno capaz de lisar eritrocitos, leucocitos, plaquetas y células en cultivo. Esta hemolisina guarda relación antigénica con las toxinas lábiles al oxígeno que producen *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*. Se forman anticuerpos con facilidad frente a estreptolisina O (anticuerpos anti-estreptolisina O [ASLO]). La estreptolisina O se inhibe de forma irreversible por el colesterol de los

lípidos cutáneos, de forma que los pacientes con infecciones cutáneas no desarrollan anticuerpos frente a ASLO. Al menos se han descrito dos formas de estreptocinasa (A y B). Estas enzimas intervienen en la degradación del plasminógeno, con la consiguiente liberación de la proteína plasmina, que a su vez se encarga de la degradación de la fibrina y el fibrinógeno. Por lo tanto, estas enzimas pueden lisar los coágulos de sangre y los depósitos de fibrina y facilitar la rápida diseminación de *S. pyogenes* por los tejidos infectados. Los anticuerpos frente a estas enzimas (anticuerpos frente a estreptocinasa) son un marcador útil de infección (Murray et al., 2014).

La hialuronidasa despolimeriza la sustancia fundamental del tejido conectivo, lo que facilita la diseminación del microorganismo por contigüidad. Las estreptoquinasas producidas por los estreptococos grupo A hidrolizan los coágulos de fibrina y pueden tener un papel en la virulencia al impedir la formación de barreras de fibrina en la periferia de las infecciones estreptocócicas diseminadas. La contribución de estas enzimas y toxinas a la infección es dudosa. Muchos de esos factores son producidos también por otros estreptococos β -hemolíticos (Koneman et al., 1999).

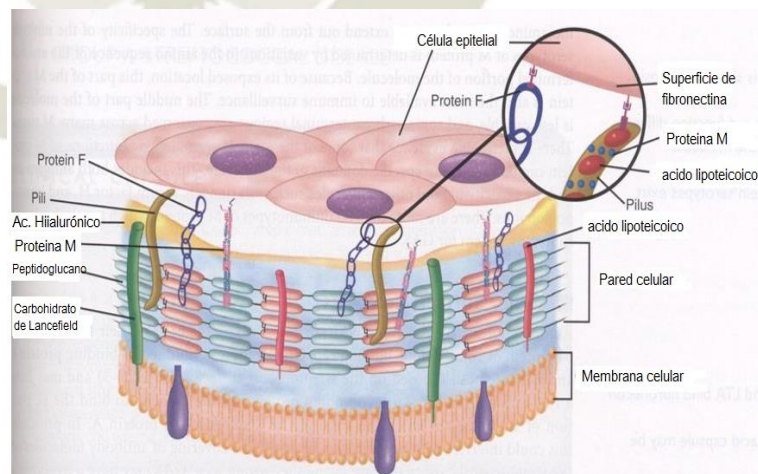


Figura 2. Estructura del *Streptococcus pyogenes*. Recuperado de <http://slideplayer.es/slide/7389520/24/images/9/Streptococcus+pyogenes:+Estructura.jpg>

2.1.3.7. Infecciones clínicas

Los estreptococos son frecuentemente, comensales en las membranas mucosas y, consecuentemente, muchas infecciones por estreptococos son oportunistas. Las infecciones se presentan primariamente con presencia de ahogos y secundariamente con una neumonía, después de una infección vírica. Las septicemias neonatales están frecuentemente asociadas a infecciones del tracto genital materno. *S. pyogenes* un patógeno humano, ocasionalmente es origen de mastitis bovina, tonsilitis en perros y linfangitis en potros. Los estreptococos de origen animal poseen una significación limitada en salud pública, con excepción de *S. suis*, que puede causar infecciones graves en personas que trabajen con cerdos. Los estreptococos del grupo β , que causan enfermedades en niños, aparecen como cepas diferentes en los animales. *S. canis*, un patógeno significativo de los perros, está asociado con septicemias neonatales, muchas condiciones supurativas y, recientemente, con el síndrome del shock tóxico. Las asfixias, la meningitis porcina y la mastitis bovinas son infecciones muy importantes específicas de estreptococos. Las vacunas para el control de las infecciones causadas por los estreptococos son generalmente ineficaces (Quinn et al., 2002).

Tabla 2 Estreptococos, hospedadores y consecuencias de la infección.

Especie	Hospedador	Consecuencias de la infección	Hábitat
<i>S. pyogenes</i>	Hombre	Fiebre escarlatina y reumática	Tracto respiratorio superior
<i>S. agalactiae</i>	Gato, cordero, vacuno	Mastitis crónica	Conductos lácteos Vagina
<i>S. dysgalactiae</i>	Vacunos Corderos	Mastitis aguda Poliartritis	boca vagina ambiente
<i>S. equisimilis</i> (<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>Equisimilis</i>)	Caballos Cerdo vaca perro	Abscesos, endometritis, mastitis	Piel y vagina
<i>S. equi</i> (<i>S. equi</i> subsp. <i>Equi</i>)	Caballos	Papera, purpura hemorrágica	Tracto respiratorio sup, bolsa gutural
<i>S. zooepidermicus</i> (<i>S. equi</i> subsp. <i>Equi</i>)	Caballos	Mastitis, infección umbilical	neumonía, Membranas mucosas

<i>Zooepidermicus</i>)	Vacunos, cerdos, pollos, corderos	Condiciones supurativas, septicemia	Piel, membranas mucosas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Muchas especies	Condiciones supurativas	Tracto intestinal
<i>S. suis</i>	Cerdos Vacuno cordero	Septicemia, meningitis, artritis, bronconeumonía Septicemia, meningitis	Tonsilas, cavidad nasal
<i>S. porcinus</i>	Cerdos	Linfadenitis submandibular	Membranas mucosas
<i>S. canis</i>	Carnívoros	Septicemia neonatal, síndrome shock toxico	Vagina mucosa anal
<i>S. uberis</i>	Vacuno	Mastitis	Piel vagina tonsilas
<i>S. pneumoniae</i>	Hombre Rata cobayo	Septicemia, Neumonía	Tracto respiratorio superior

Fuente: Quinn et al., 2002.

2.1.3.8. Epidemiología

El agrupamiento de animales en salas recintos ferias incrementa el riesgo de adquirir la infección. La transmisión tiene lugar a través de exudados purulentos a partir del tracto superior o a partir de abscesos supurativos. Puede desarrollarse un estado de convaleciente crónico con la bacteria en la cavidad gutural. Los estreptococos están distribuidos en todo el mundo; muchas especies viven como comensales en la mucosa del tracto respiratorio superior y en el tracto urogenital inferior. Estas bacterias son susceptibles a la desecación y sobreviven en periodos cortos de tiempo en el hospedador (Quinn et al., 2002) El hacinamiento incrementa la posibilidad de diseminación del microorganismo, en especial durante los meses de invierno. Las infecciones de tejidos blandos se ven precedidas generalmente de una colonización inicial de la piel después de la cual los microorganismos se introducen en los tejidos superficiales o profundos a través de una alteración de la barrera que constituye la piel (Murray et al., 2014).

2.1.3.9. Signos clínicos

El periodo de incubación es de tres a seis días y el curso clínico de la enfermedad va de cinco a diez. Se observa fiebre alta, depresión y anorexia seguido de una descarga oculonasal que se torna purulenta. Los ganglios linfáticos de la cabeza y cuello se encuentran inflamados y con dolor. Característicamente, están afectados los ganglios submandibulares y eventualmente se rompen liberando material purulento muy infeccioso. La morbilidad puede alcanzar valores de hasta el 100%.

La muerte puede ser resultado de complicaciones tales como neumonías, implicaciones neurológicas y asfixia, debido a la presión que ejercen los ganglios linfáticos hipertróficos sobre la faringe (Quinn et al., 2002).

2.1.4. Procedimientos de diagnóstico

El historial, los signos clínicos y la patología pueden ser indicativos de ciertas infecciones producidas por estreptococos. Los estreptococos crecen bien en agar Sangre o agar Chocolate, aunque el agar sangre es preferible, ya que permite determinar las características hemolíticas del microorganismo (Bernard, 2005).

Los estreptococos son muy susceptibles a la desecación, por lo que algunas especies deben ser cultivadas rápidamente. El pus o exudado recogidos, deben colocarse en un medio de transporte si la muestra no va ser procesada inmediatamente. Una técnica sensible, que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa, ha sido desarrollada recientemente para detectar *S. equi* de origen nasal, viable y no viable. En frotis realizados a partir de muestras clínicas pueden demostrarse cadenas de cocos positivos. Algunas especies pueden ser cultivadas en agar sangre, agar sangre selectivo y agar MacConkey. Las placas son incubadas aeróbicamente a 37°C de 24 a 48 horas. El cultivo en agar sangre de oveja o agar sangre de buey, lo clasifica como β -hemólisis y se caracteriza por zonas claras alrededor de las colonias (Quinn et al., 2002).

2.1.4.1. Frotis directos teñidos de Gram

Con frecuencia el frotis de pus muestra cocos únicos o pares de cocos y no cadenas definidas. A veces los cocos son gramnegativos debido a que los microorganismos ya no son variables y han perdido su capacidad de retener el colorante azul (cristal violeta) para continuar como grampositivos. Si en

el frotis de pus se observan estreptococos, pero no crecen en el cultivo, deben sospecharse de microorganismos anaeróbicos (Brooks et al., 2008).

2.1.4.2. Medios de cultivo.

Las muestras bajo sospecha de contener estreptococos se cultivan en placas de agar sangre, que posea una base peptonada lo suficientemente rica como para soportar el desarrollo de estos microorganismos exigentes. Aunque en general las colonias serán más grandes en medios que contengan glucosa después de 24 horas, el ácido producido por la utilización de la glucosa inactiva la estreptolisina S de los estreptococos grupo A y puede interferir con la determinación de las propiedades hemolíticas del microorganismo. Al medio basal se le agrega sangre de carnero al 5% como indicador de hemólisis. Las concentraciones de sangre menores producen reacciones hemolíticas difíciles de distinguir, en tanto que las mayores pueden ocultar totalmente la hemólisis. Después de 18 a 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias de estreptococos grupo A tienen aproximadamente 0,5 mm de diámetro, son translúcidas o transparentes, y tienen una superficie lisa o mate. El halo de β -hemólisis es habitualmente igual a 2 a 4 veces el diámetro de la colonia. Las colonias son convexas y con bordes enteros (Koneman et al., 1999).

2.1.4.3. Prueba de Lancefield

El agrupamiento de Lancefield es un método de clasificación serológico, basado en el agrupamiento específico a partir de la sustancia C (polisacárido) de la pared celular. El método incluye: (1). Prueba de precipitación en anillo. La sustancia C se extrae del microorganismo del género *Streptococcus* objeto de análisis. El antígeno extraído se enfrenta a antiseros de diferentes especificidades. La reacción positiva se indica mediante la formación de un anillo negro en la interfase entre los dos líquidos en los primeros 30 minutos de reacción (Figura 3). (2). Prueba de aglutinación con látex. Los antiseros específicos frente a la sustancia C, para los grupos A-G (con excepción del grupo E) se encuentran disponibles comercialmente. Las suspensiones de partículas de látex se recubren con cada uno de los anticuerpos específicos del grupo. El antígeno del grupo se

extrae enzimáticamente de cada uno de los estreptococos en estudio. En una placa se mezcla una gota del antígeno con una gota de cada una de las suspensiones anticuerpo-látex y se agita suavemente. Una reacción positiva se indica por una aglutinación, que normalmente tiene lugar en el primer minuto de la reacción (Quinn et al., 2002).

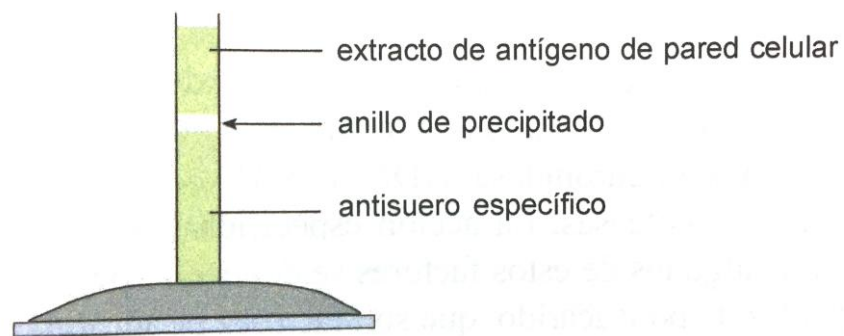


Figura 3 Prueba de precipitación en anillo para estreptococos (Quinn et al., 2002).

2.1.4.4. Sensibilidad a la Bacitracina

La prueba de sensibilidad a la bacitracina se utiliza para la identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos grupo A. Se realiza en una placa de agar sangre con un disco de bacitracina (p.ej., TAXO A Bacitracin Disk, 0,04 unidades, BD Microbiology Systems, Cockeysville MD). Un halo de inhibición de cualquier tamaño alrededor del disco se considera una prueba positiva. Aunque esta prueba es sencilla, barata y bastante precisa para la identificación, no es altamente específica. Algunos investigadores han recomendado el uso de discos de bacitracina directamente en el agar sangre no selectivo de aislamiento primario, para la detección rápida e identificación de estreptococos grupo A en cultivos fauces. Sin embargo, este método solo identifica el 50-60% de los aislamientos. La colocación de discos de bacitracina en placas de aislamiento primario con medios selectivos es considerablemente más sensible (Koneman et al., 1999). Las pruebas que deben utilizarse en el laboratorio de microbiología clínica para identificar presuntivamente las especies β -hemolíticas, más del 99% son sensibles a la Bacitracina. La identificación de un estreptococo del grupo A

se confirma mediante serotipado con un ensayo de aglutinación en látex o por hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas (Bernard, 2005).

2.1.4.5. Extracción de ADN para su análisis

Después de obtener una muestra responsable debe determinar su composición genética. En primer lugar, el técnico extrae el ADN de la muestra. El ADN puede ser purificado usando detergentes que eliminen al material celular no deseado o usando presión para forzar al ADN a salir de la célula. Una vez extraído el ADN, el técnico debe seguir varios pasos. (Thietman y Palladino, 2010)

2.1.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica el ADN por medio de ciclos repetidos de duplicación *in vitro*. La PCR utiliza la enzima ADN polimerasa que dirige la síntesis de ADN a partir de sustratos de desoxinucleótidos sobre una plantilla de ADN monocatenario. La ADN polimerasa añade nucleótidos al extremo 3' de un oligonucleótido diseñado a medida cuando está apareado con una plantilla de ADN más larga. (Watson et al., 2016)

La PCR es un método enzimático que permite sintetizar numerosas copias de un fragmento concreto de ADN. Utiliza como cebadores dos oligonucleótidos (Oligos, de 20 a 30 pb) complementarios a los que serán los extremos del producto y colocados con sus terminales 3'OH enfrentados. Lo que se amplifica es el ADN comprendido entre ambos oligos. La sucesión de una serie de ciclos que tiene lugar 3 fases:

1. Desnaturalización del molde
2. Hibridación con los cebadores
3. La extensión de la síntesis por acción de la ADN polimerasa

Origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos estarán definidos por los extremos 5' de los cebadores. 30 ciclos de PCR producen una amplificación de 1 millón de veces aproximadamente. La reacción se lleva a cabo en Termocicladores, controlan la precisión de las condiciones de cada etapa y las repite cíclicamente. (Tiempo, temperatura, número de ciclos, etc.) (Izquierdo, 2014)

Para amplificar una región específica de ADN, un investigador sintetiza químicamente dos cebadores de oligonucleótidos diferentes, complementarios a las secuencias, de aproximadamente 18 bases que flanquean la región de interés (designadas con rectángulos celestes y azules). La reacción completa está compuesta de una mezcla compleja de ADN de doble hebra (en general ADN genómico que contiene la secuencia diana de interés), un exceso estequiométrico de ambos cebadores, los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato y una ADN polimerasa estable al calor, conocida como Taq polimerasa. Durante cada enfriada para permitir a los cebadores unirse a las secuencias complementarias que flanquean la región a ser amplificada. La Taq polimerasa extiende cada cebador desde su extremo 3', lo que genera hebras recién sintetizadas que se extienden en dirección 3' al extremo 5' de la hebra molde. Durante el tercer ciclo, las moléculas de ADN de doble hebra son generadas en igual longitud a la secuencia de la región a ser amplificada. En cada ciclo sucesivo, el segmento diana, que se hibridará a los cebadores, se duplica y, eventualmente, supera ampliamente en número a todos los otros segmentos de ADN en la mezcla de reacción. Los sucesivos ciclos de PCR pueden automatizarse mediante una reacción de ciclación por intervalos de tiempo. A temperatura elevada, para desnaturalizar el ADN, y a una temperatura menor definida para la hibridación y elongación de las partes. Una reacción con 20 ciclos amplificará la secuencia específica diana un millón de veces (Lodish et al., 2016)

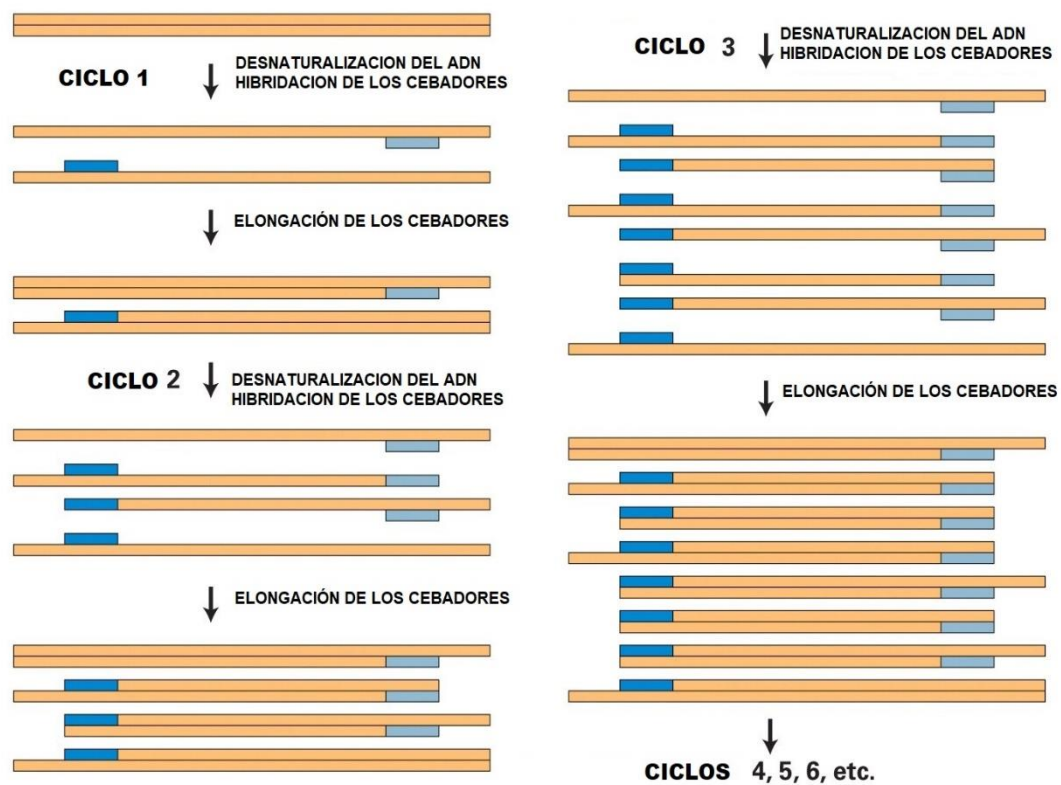


Figura 4. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es ampliamente utilizada para amplificar regiones de ADN de secuencia conocida. (Lodish et al., 2016)

2.1.5. Técnicas moleculares

El uso de métodos moleculares para la identificación y detección directa de los microorganismos en la microbiología clínica se está desarrollando gradualmente y ya hay varios productos disponibles comercialmente. Los usos prácticos incluyen el uso de pruebas de ácidos nucleicos para una detección directa de organismos en el material clínico o para la identificación de organismos previamente aislados. Además las técnicas basadas en la amplificación pueden utilizarse para la detección e identificación y para definir características selectas (p.ej., genes resistentes a los antibióticos) de organismos (Bernard, 2005).

2.1.5.1. Secuenciación de ADN

En algunos laboratorios de biología molecular, la determinación de la secuencia de nucleótidos que componen una molécula de ADN es un proceso muy importante. La secuenciación permite establecer el orden

exacto de los nucleótidos que forman una secuencia concreta de ADN, valiosa información que se puede utilizar con distintas finalidades:

- Conocer los sitios de corte para distintas enzimas de restricción que tiene la secuencia de un gen. Muy útil, por ejemplo como se ha visto anteriormente en la clonación del ADN, en la fase de construcción del ADN recombinante.
- Estudiar las distintas variantes polimórficas, así como mutacionales, que existen en un gen. La secuenciación permite determinar la existencia de distintas alteraciones en los nucleótidos: mutaciones por sustitución de bases (con o sin cambio en el aminoácido), mutaciones por pérdida (delección), por introducción (inserción) o por inversión del orden de disposición de los nucleótidos. Esta información tiene aplicación en la genética clínica porque permite la caracterización molecular de un gran número de enfermedades.
- Ayudar a la comprensión de los mecanismos que influyen en la expresión de un gen.
- Predecir la proteína codificada por el gen a través de la equivalencia proporcionada por el código genético entre tripletes de nucleótidos (codones) y aminoácidos. En la figura 5 se muestra un código genético donde aparece el aminoácido que genera cada uno de los tripletes de nucleótidos (Merida y Moreno, 2015).

		Nucleótido 2							
		U	C	A	G				
U	UUU	phe	UCU	ser	UAU	tyr	UGU	cys	U
	UUC	phe	UCC	ser	UAC	tyr	UGC	cys	C
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	stop	UGA	stop	A
	UUG	leu	UCG	ser	UAG	stop	UGG	trp	G
C	CUU	leu	CCU	pro	CAU	his	CGU	arg	U
	CUC	leu	CCC	pro	CAC	his	CGC	arg	C
	CUA	leu	CCA	pro	CAA	ghn	CGA	arg	A
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	ghn	CGG	arg	G
A	AUU	ile	ACU	thr	AAU	asn	AGU	ser	U
	AUC	ile	ACC	thr	AAC	asn	AGC	ser	C
	AUA	ile	ACA	thr	AAA	lys	AGA	arg	A
	AUG	met	ACG	thr	AAG	lys	AGG	arg	G
G	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gly	U
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	gly	C
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	gly	A
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	gly	G

Figura 5. Código genético: aminoácido generado por cada triplete de nucleótidos (Mériada y Moreno, 2015).

La información de la secuencia de ADN se guarda en grandes bases de datos de computadoras, muchas de las cuales son accesibles en Internet. Ejemplos son las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica y de la Organización del Genoma Humano (HUGO). Los genetistas utilizan esas bases de datos para comparar secuencias recién descubiertas con aquellas ya conocidas para identificar genes y acceder a muchos tipos de información. Al investigar secuencias de ADN o aminoácidos en una base de datos, los investigadores pueden ganar mucha visión en la función y estructura del producto génico, las relaciones evolutivas entre genes, y la variabilidad entre secuencias de genes dentro de una población. La secuenciación de ADN en las especies ha proporcionado una gran cantidad de información nueva que sustenta la evolución (Solomon et al., 2013).

Para explorar las complejidades de la regulación de la expresión génica y establecer las causas de las enfermedades genéticas se necesitan técnicas que permitiesen la determinación de la secuencia exacta de las bases en el ADN. A finales de los años 70 se desarrollaron dos técnicas de secuenciación diferentes, una por Maxam y Gilbert, el método de rotura química y otra por Sanger, el método enzimático. Ambos procedimientos utilizan el marcaje de un nucleótido terminal, seguido de separación y detección de los oligonucleótidos generados (Devlin, 2008).

En 1977 se publicaron dos métodos diferentes para la secuenciación de un fragmento de ADN, basados en procesos distintos: la rotura del ADN por zonas específicas a través de reactivos químicos, con el método de Maxam y Gilbert y la síntesis enzimática de una copia de ADN que termina progresivamente utilizando nucleótidos modificados que imposibilitan la elongación, con el método de Sanger y Coulson. Aunque ambas técnicas difieren en la metodología, su resultado es el mismo: una colección de oligonucleótidos con un extremo fijo y otro variable, que se diferencian entre ellos en que cada molécula tiene un nucleótido añadido más que la anterior. Ambos métodos disponen de una capacidad de resolución parecida en cuanto al tamaño del fragmento de ADN que son capaces de secuenciar de forma óptima, con un máximo próximo a los 1.000 pares de bases (pb).

Esta limitación explica la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación que permitan avanzar más rápidamente en el estudio de una larga lista de genes formados por múltiples exones de distintos tamaños (Mérida y Moreno, 2015).

2.1.5.2. Método de Maxam y Gilbert

Este procedimiento requiere: marcaje del nucleótido terminal, hidrólisis selectiva del enlace fosfodiéster para cada nucleótido separadamente para generar fragmentos con 1, 2,3 o más bases; separación cuantitativa de los fragmentos hidrolizados, y determinación cualitativa del marcaje. A continuación, se describe un protocolo del procedimiento de Maxam-Gilbert (Devlin, 2008).

El método de secuenciación propuesto por Maxam y Gilbert se basa en la rotura química del ADN. El proceso se inicia mediante el marcado radiactivo con ^{32}P de uno de los extremos del ADN que se quiere secuenciar. Este ADN marcado se divide en cuatro alícuotas y a cada una de ellas se les aplican varias sustancias químicas (ácido fórmico, hidracina, etc) que provocan la rotura del ADN en un residuo específico. El resultado final es un conjunto de moléculas de ADN de longitud variable, terminadas en un único nucleótido: adenina (A), timina (T), guanina (G), citosina (C). Las cuatro alícuotas se separan por electroforesis en un gel de acrilamida y se revelan por autorradiografía (la señal que emite el ^{32}P) y la lectura de las bandas de las distintas carreras del gel proporciona la secuencia que se busca. Actualmente se ha comprobado que la técnica de Maxam y Gilbert tiene ciertas limitaciones, pues permite la secuencia óptima de un máximo aproximado de 250 pb, pero las regiones mayores a este tamaño son difíciles de analizar. Este hecho, junto con el desarrollo de reactivos económicamente más asequibles para otras metodologías de secuenciación, ha condicionado que esta técnica se emplee cada vez menos, aunque sigue resultando útil en el análisis de regiones conflictivas por secuenciación de Sanger (Mérida y Moreno, 2015).

La siguiente figura muestra que mediante, el corte con una endonucleasa de restricción y posterior purificación se obtiene el fragmento de ADN de

cadena doble que se va a secuenciar. Se secuencian ambas cadenas marcando selectivamente los extremos de cada una de las cadenas de ADN. Una de las cadenas se marca terminalmente con $[^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ en el tubo de reacción 1, mientras que la otra se marca terminalmente con $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ en el tubo de reacción 2. El ADN marcado terminalmente se subdivide en cuatro fracciones, las diferentes bases se destruyen químicamente en posiciones al azar dentro de la molécula de ADN de cadena simple. La destrucción química menos selectiva de la adenina destruye simultáneamente la G, mientras que la destrucción de la timina destruye las bases C. El ADN de cadena simple se corta por los sitios de las bases destruidas. Esto genera fragmentos marcados terminalmente que presentan todas las longitudes posibles, correspondiente a la distancia que va desde el extremo hasta los sitios de destrucción de base. Los fragmentos de ADN marcados se separan según su tamaño por electroforesis. La secuencia de ADN puede determinarse a continuación a partir de los patrones electroforéticos por autorradiografía (Devlin, 2008).

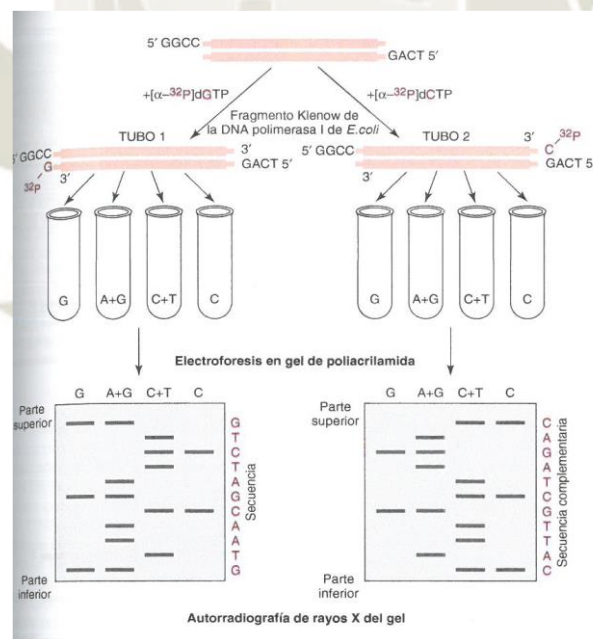


Figura 6. Método de secuenciación química de ADN de Maxam-Gilbert (Devlin, 2008).

2.1.5.3. Método de Sanger o método de los didesoxinucleótidos.

También conocido como el método de terminación de la cadena, para la secuenciación de ADN se basa en el hecho de que una cadena de ADN en

replicación que ha incorporado un nucleótido sintético modificado, conocido como didesoxinucleótido, no puede estirarse más allá de ese punto. A diferencia de un desoxinucleótido “normal”, que tiene un grupo hidroxilo en su carbono 3’, a un didesoxinucleótido le falta un grupo hidroxilo en su carbono 3’ (recordar que un grupo hidroxilo 3’ reacciona cada vez que se forma un enlace de fosfodiéster). Así, los didesoxinucleótidos terminan la elongación durante la replicación de ADN. El investigador prepara cuatro diferentes mezclas de reacción. Cada una contiene múltiples copias idénticas de una cadena de ADN que será secuenciado; ADN polimerasa; cebadores apropiados marcados radiactivamente; y todos los cuatro desoxinucleótidos necesarios para sintetizar ADN: dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Cada mezcla también incluye una pequeña cantidad de sólo uno de los cuatro didesoxinucleótidos ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP. El prefijo “dd” se refiere a didesoxinucleótidos, para distinguirlos de los desoxinucleótidos, los cuales son designados con “d”. Ahora se indica como procede la reacción en la mezcla que incluye ddATP. En cada sitio en donde la adenina está especificada, ocasionalmente una cadena creciente incorpora un ddATP, deteniendo la elongación para que en la mezcla de reacción se formen fragmentos de ADN de variadas longitudes. Cada fragmento que contiene un ddATP marca una ubicación específica en donde la adenina normalmente se encontraría en la cadena recién sintetizada. De manera similar, en la mezcla de reacción que incluye ddCTP, cada fragmento que contiene ddCTP marca la posición de una citosina en la cadena recién sintetizada, y así sucesivamente. Los fragmentos radioactivos de cada reacción se desnaturalizan y después se separan en un gel por electroforesis, con cada mezcla de reacción correspondiente a A, T, G, o C, ocupando su propio carril en el gel. Así las posiciones de los fragmentos recién sintetizados en el gel se pueden determinar mediante autorradiografía. La alta resolución del gel hace posible distinguir entre fragmentos que difieran en longitud por sólo un nucleótido, entonces el investigador puede leer la secuencia en el ADN recién sintetizado, una base a la vez (Solomon et al., 2013).

El método de Sanger se basa en la síntesis enzimática de una copia complementaria a la molécula cuya secuencia se quiere conocer. El proceso se inicia a partir de un conjunto de moléculas de ADN de cadena simple que se obtienen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación, la retrotranscripción de ARN, etc. El siguiente paso es la unión de un corto oligonucleótido al extremo 3' de cada molécula de ADN que actuará como cebador (primer) sintetizando una nueva cadena de ADN complementaria a la que ya existe, mediante una enzima ADN polimerasa. Para la síntesis de esta nueva cadena de ADN es necesaria la adición de nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), así como la de nucleótidos modificados didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), cuya característica principal es la carencia del grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar que condiciona que, una vez incorporados, bloqueen la elongación. Así, el resultado final es la obtención de cuatro grupos de polinucleótidos que abarcan todo el ADN molde que se va a secuenciar. En la actualidad, la secuenciación de Sanger está muy automatizada y constituye un equipamiento básico en muchos centros científicos donde las técnicas de biología molecular desempeñan un papel importante. En los secuenciadores automáticos actuales se ha sustituido el marcado radiactivo por el fluorescente. Este cambio, está unido a la óptima separación electroforética de los fragmentos de ADN en finísimos capilares y a la detección de la señal fluorescente por tecnología láser, ha permitido la obtención de secuencias hasta 1.000 pb con muy alta fidelidad respecto al molde. En la figura 7 se muestra el esquema de la secuenciación de Sanger: obtención y separación electroforética de los oligonucleótidos y generación posterior de electroferograma (Mérida y Moreno, 2015).

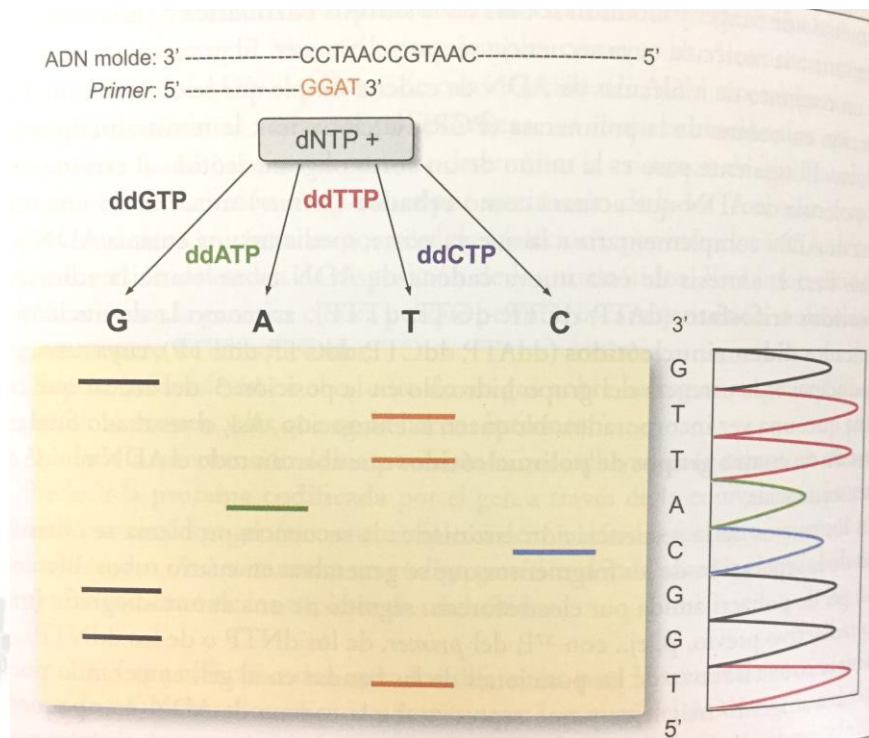


Figura 7. Esquema de la secuenciación de Sanger: obtención y separación electroforética de los oligonucleótidos y generación posterior del electroferograma (Mérida y Moreno, 2015).

El método de secuenciación basado en el uso de terminadores de cadena, se basa en la síntesis enzimática de una copia complementaria a la molécula cuya secuencia se quiere conocer, y no en su rotura. En este caso el resultado se lee directamente de la autorradiografía corresponde a la cadena complementaria a aquella cuya secuencia se busca. El procedimiento (figura 8) se basa en una actividad enzimática (ADN-polimerasa) capaz de elongar un cebador asociado a la molécula de ADN cuya secuencia se quiere conocer, que actuara como molde en la reacción, y en los nucleótidos análogos a los sustratos dNTPs normales cuya incorporación a la cadena en crecimiento impide la elongación, deteniendo el proceso y liberando un producto acabado prematuramente. Los análogos terminadores de cadena más utilizados son los cuatro didesoxinucleósido trifosfatos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), que carecen de grupo OH que los dNTPs presentan en la posición 3' de la desoxirribosa (figura 8). Son reconocidos por la polimerasa, que a través de su trifosfato 5' los incorpora a la hebra en crecimiento, pero la falta de OH en 3' impide la entrada del siguiente dNTP,

por lo que la extensión de la cadena se hace imposible y el proceso termina. La presencia de una pequeña cantidad de un ddNTP en la mezcla de los cuatro dNTPs normales provoca que, frente a las posiciones complementarias al análogo terminador, se establezca una competencia entre los dos posibles nucleótidos, el normal (dNTP) y su didesoxianálogo (ddNTP), de cuyo resultado deriva la continuación del crecimiento de la hebra o su detención, poco frecuente, pero específica. Los productos de la reacción son una mezcla de oligonucleótidos que comparten uno de sus extremos (el cebador) y que se diferencian en su longitud, terminando siempre en el ddNTP presente en el medio de la reacción. La estimación de su longitud define por tanto la posición ocupada por el ddNTP.

Utilizando los cuatro ddNTPs en cuatro incubaciones enzimáticas en paralelo, se consiguen cuatro poblaciones de fragmentos que comparten el punto de inicio y terminan, cada una, en una base específica (A, G, T o C). La presencia entre los 4 dNTPs de alguno marcado con un isótopo radiactivo (figura 8) dará lugar a productos radiactivos. Las cuatro mezclas serán analizadas por electroforesis en gel. La reacción de elongación suele hacerse en dos etapas; la primera se lleva a cabo con bajas concentraciones de los 4 dNTPs y a baja temperatura, con el fin de asegurar una eficaz incorporación del nucleótido marcado; el producto de esta fase supone la extensión de los cebadores unos 20 o 30 nucleótidos. A continuación, la reacción se divide en cuatro partes con cada una se desarrolla la segunda etapa, ya con mayores concentraciones de dNTPs y previa adición del ddNTP correspondiente (Perera et al., 2002).

El método didesoxinucleótidos es el más usado, que se basa en la síntesis de ADN llevada a cabo *in vitro* ante la presencia de didesoxirribonucleósidos trifosfatos que terminan la cadena. En esta técnica el ADN polimerasa se utiliza para producir copias parciales de fragmentos de ADN para ser secuenciados. Estas reacciones de replicación de ADN tienen lugar en condiciones que garantizan que las nuevas cadenas de ADN terminarán cuando se alcance un determinado nucleótido (A, G, C, o T). Este método produce un grupo de copias de ADN diferentes que terminan en cada una de las posiciones en la molécula original de ADN, y de esta forma difieren en

la longitud por un sólo nucleótido. Estas copias de ADN pueden separarse sobre la base de su longitud mediante electroforesis en gel y se puede determinar la secuencia de nucleótidos del ADN original a partir del orden de estos fragmentos de ADN en el gel (Alberts et al., 2007).

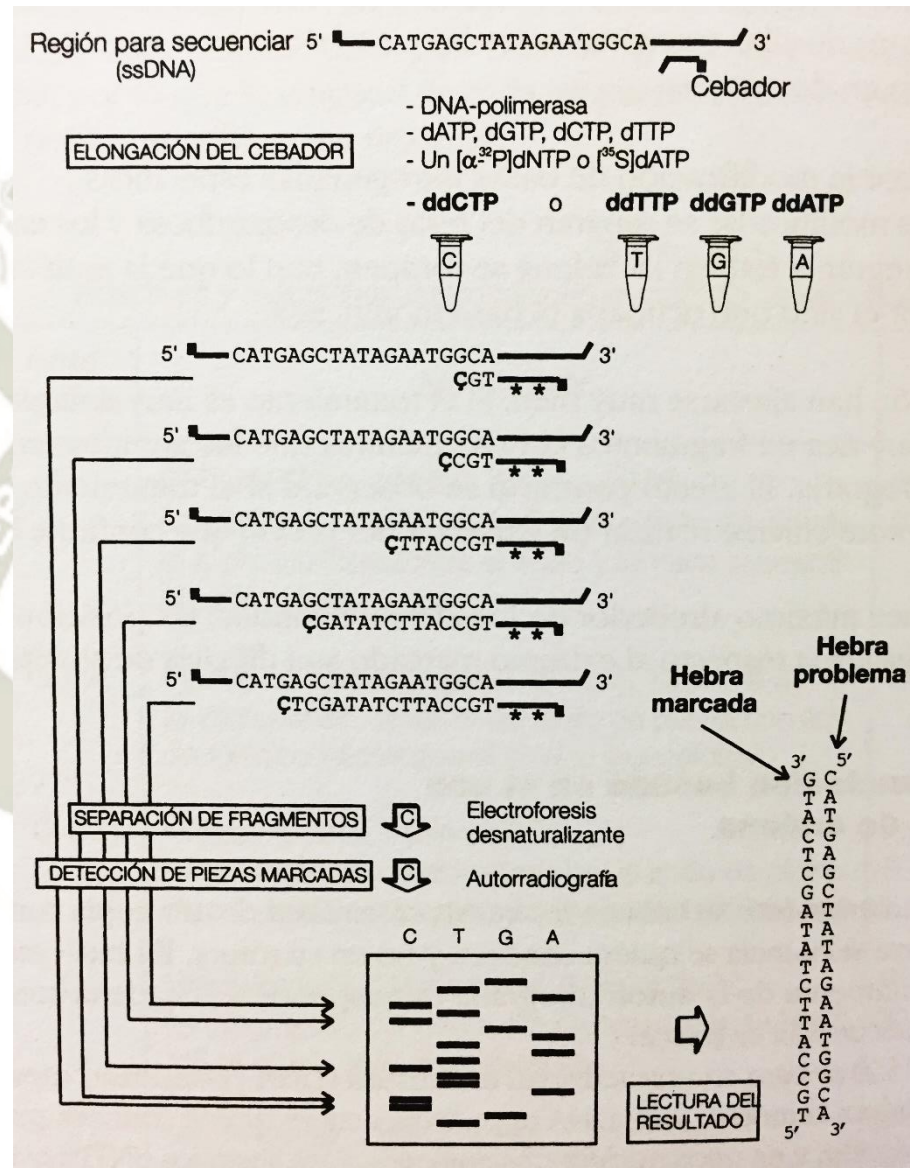


Figura 8. Esquema de secuencia del método de secuenciación basado en el uso de terminadores de cadena. (Perera et al., 2002)

El advenimiento de técnicas de secuenciación a gran escala alimentó la esperanza de poder secuenciar genomas completos. La dificultad para ensamblar los miles a millones (según el tamaño del genoma) de segmentos secuenciados en bloques contiguos y luego asignarle la posición correcta en los cromosomas. Para ello se requiere del desarrollo de protocolos de

secuenciación automática y de algoritmos computarizados complejos desde el punto de vista matemático. (Voet et al., 2016)

2.1.5.4. Secuenciación automática

Este proceso puede utilizar ddNTP, que se identifican con una sustancia fluorescente de otro color en lugar de marcándolos radioactivamente, o bien con un iniciador de secuenciación marcado en el extremo 5' con una sustancia colorante. En caso de que existan ddNTP marcados de diferente forma, se puede producir la reacción en un tubo de ensayo y la muestra se separará en un gel capilar (una fibra hueca ultrafina de la electroforesis capilar), y se escaneará con un rayo láser. El láser excita los colorantes fluorescentes que emiten diferentes variantes de color (color pattern) para cada nucleótido. Un detector de fluorescencia registra las señales emitidas por las bandas individuales y un ordenador convierte las cuatro señales de colores diferentes en la secuencia de ADN (Figura 9). Con la electroforesis capilar, en lugar de la electroforesis en gel para la separación, en sólo cuatro horas se pueden analizar unos 40000 nucleótidos con 96 capilares (Renneberg, 2008)

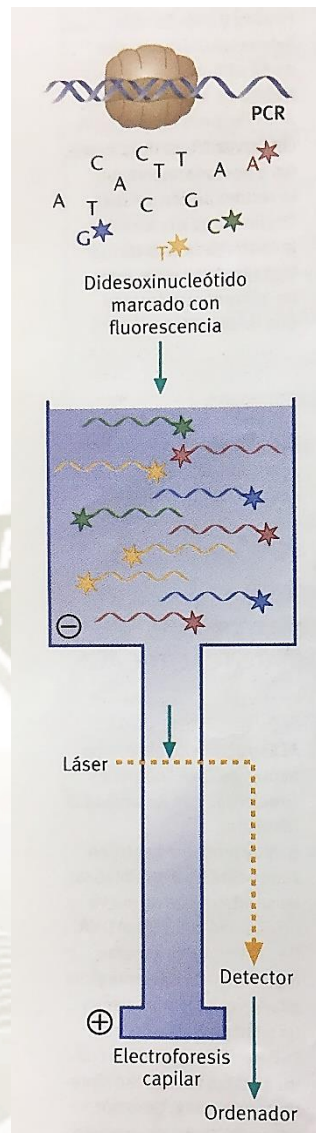


Figura 9. Secuenciación automática de ADN con elevado rendimiento (high throughput sequencing) (Renneberg, 2008).

El primer paso dado hacia ella consistió en la utilización de un sistema más adecuado para el revelado de las bandas elongadas enzimáticamente: la autorradiografía fue sustituida por la fluorescencia, producida por excitación con láser de un fluoróforo apropiado y medida por un sensor situado en la base del gel y capaz de detectar las bandas de ADN conforme pasan ante él. Una limitación a este procedimiento de marcaje es la baja relación señal/ruido que se obtiene cuando se trabaja con pequeñas cantidades de ADN. La solución al problema se alcanzó desarrollando una estrategia de amplificación de monohebra por PCR; utilizando una polimerasa termorresistente (como la ADN-polimerasa taq), un exceso de

cebador y siguiendo un ciclo de temperaturas adecuado, se consiguen grandes rendimientos en los productos de elongación.

En la primera generación de estos analizadores automáticos de secuencias o secuenciadores, el marcaje fluorescente va incorporado en el cebador; se utilizan cuatro compuestos fluorescentes con diferente espectro de emisión para marcar al mismo cebador de manera discriminable; cada reacción de elongación se realiza a partir del cebador marcado con uno de los cuatro compuestos para, a continuación, unir las cuatro reacciones y aplicarlas, juntas, en la misma calle de gel de secuencia. A medida que las bandas de ADN atraviesan ante el sensor, el tipo de fluorescencia es detectado y a partir de él se puede deducir la reacción de donde proviene y por tanto el terminador que incorpora. La secuencia del ADN se deduce simultáneamente al avance de la electroforesis. Puesto que cada experimento no utiliza más que una calle de gel, en la misma electroforesis se puede analizar varias muestras simultáneamente.

En una segunda generación de secuenciadores, el compuesto fluorescente va unido al análogo terminador de cadena: cada uno lleva un fluoróforo distinto y diferenciable, y es incorporado a la cadena en crecimiento por la polimerasa, cumpliendo a la vez dos objetivos: detener la elongación y unir el marcaje a la molécula. Este sistema tiene importantes ventajas: la primera es que no necesita cebadores específicos marcados de forma diferenciable, sino que puede utilizar cebadores convencionales, universales o particulares. La segunda es que la elongación del cebador puede hacerse en una única reacción en presencia de los cuatro terminadores marcados; puesto que la incorporación de un terminador concreto es detectable por su marcaje específico, no es necesario llevar a cabo cuatro reacciones separadas. El método de detección de los fluoróforos es el mismo que en la versión anterior. (Perera et al., 2002)

La posibilidad de usar un fluorocromo distinto en cada una de las 4 reacciones de síntesis permite automatizar el método, de forma que se lean simultáneamente las hebras marcadas componentes de las 4 mezclas. Además, esta lectura de la fluorescencia se puede hacer en continuo, con lo que la electroforesis sigue transcurriendo, las moléculas de menor tamaño,

ya detectadas, salen por el extremo inferior del gel, y se sigue consiguiendo la separación de moléculas mayores en el gel, de modo que se amplía el número de nucleótidos que es posible secuenciar en un solo experimento (Herraez, 2012).

La secuenciación del ADN está ahora completamente automatizada: mecanismos de robótica mezclan los reactivos y luego cargan, corren y leen el orden de las bases de los nucleótidos en el gel. Cada uno está marcado con un marcador fluorescente de color diferente; de este modo las cuatro reacciones de síntesis pueden ocurrir en el mismo tubo y los productos pueden separarse en una sola calle sobre un gel. Un detector posicionado cerca de la base del gel lee y registra el color de la marca fluorescente sobre cada banda a medida que ésta se mueve por delante de un ordenador almacena la secuencia para su análisis posterior (Alberts et al., 2007).

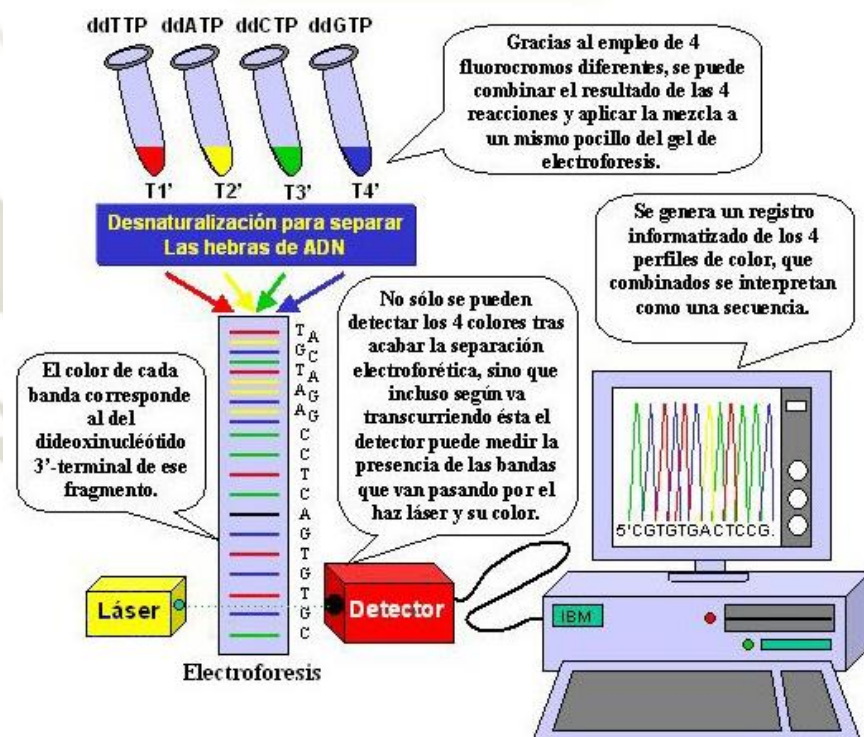


Figura 10. Secuenciación mediante el uso de fluorocromos (Herraez, 2012).

En la siguiente figura se muestra una mínima parte de los datos obtenidos de una secuenciación automática como aparece en la pantalla del ordenador.

Cada pico coloreado representa un nucleótido de la secuencia de ADN; puede leerse un fragmento de la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 173 y 194 en relación con el comienzo de la secuencia. Este ejemplo es tomado a partir del proyecto internacional que determinó la secuencia completa de nucleótidos del genoma de la planta *Arabidopsis* (Alberts et al., 2007).

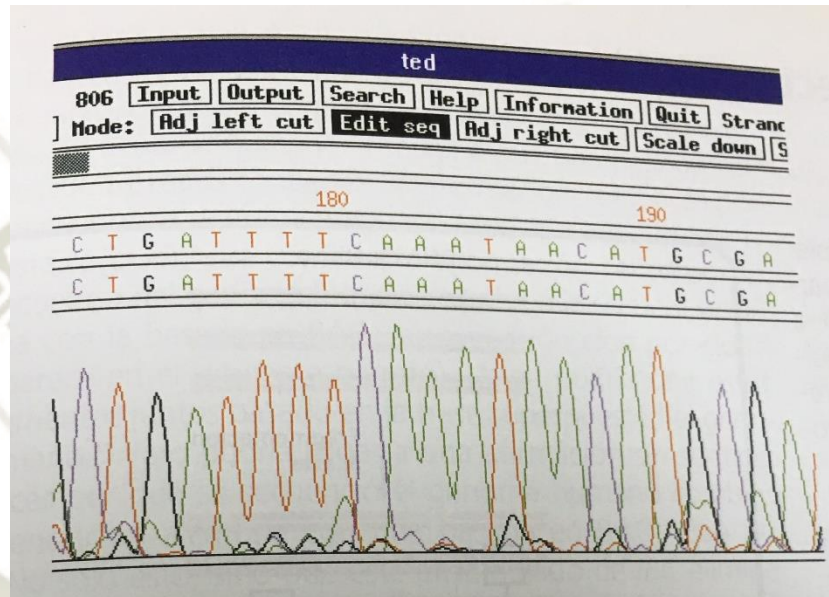


Figura 11. La secuencia del ADN automatizada.
(Alberts et al., 2007).

2.1.5.5. Electroforesis capilar

El término de electroforesis capilar EC define de forma amplia varias técnicas relacionadas que consiguen separaciones de gran eficacia de iones, incluyendo macroiones. Todas las técnicas utilizan capilares estrechos (con un diámetro de 20-200 μm) en los que se separan los iones de acuerdo con su desplazamiento desde una cámara con un amortiguador, su paso por el detector hasta la cámara de destino con un amortiguador (Figura 12). El equipamiento necesario para realizar una EC es más caro, y, por tanto, no tan accesible que el que se requiere para la electroforesis en gel. A pesar de esto, para el análisis de biomoléculas, la EC ofrece muchas ventajas sobre la electroforesis tradicional. La necesidad de emplear potenciales bajos como 25 V/cm para evitar el daño por el calor a la muestra es la principal

limitación para conseguir separaciones eficaces mediante los métodos de electroforesis en gel descritos anteriormente. Dado que, en la EC, los capilares tienen un gran cociente superficie/volumen, el calor se disipa de forma eficaz y pueden utilizarse potenciales mucho mayores como 500 V/cm. De esta forma aumenta espectacularmente la eficacia de las separaciones. Los tiempos de análisis (generalmente 5-30 minutos) son cortos; solo son necesarios 10-100nL de muestra y la detección es inmediata y fácilmente automatizable. Por estas razones, se ha empleado la EC como técnica analítica en los estudios genómicos para obtener análisis de secuencia rápidos de grandes moléculas de ADN. Los experimentos de EC más simples utilizan capilares de sílice fundida con un amortiguador adecuado y el cátodo como electrodo de destino (figura 12). Los capilares con distintos recubrimientos, así como los rellenos de gel, permiten experimentos más sofisticados, como el enfoque isoelectrico y la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Müller, 2008).

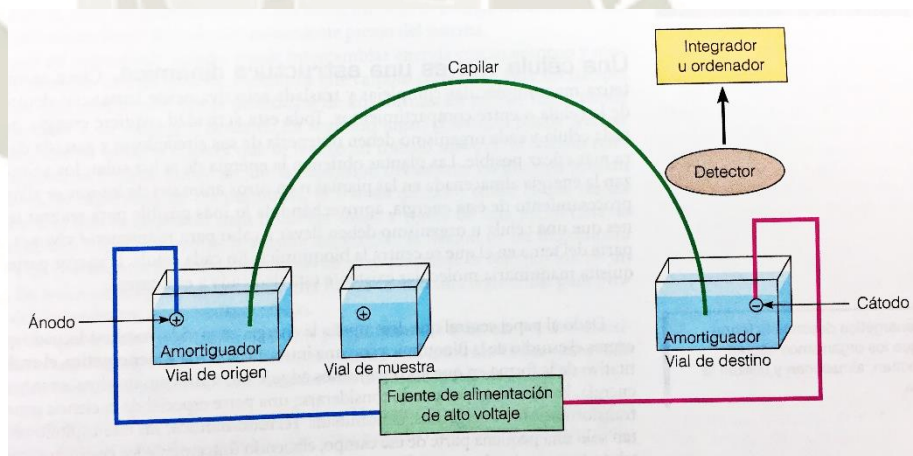


Figura 12. Experimento sencillo de electroforesis capilar. Se introduce la muestra en el capilar desde el vial de la muestra. El extremo del capilar con la muestra se coloca luego en el vial de la fuente y se aplica alto voltaje. Los componentes de la muestra se separarán según vayan desplazándose hacia el vial de destino. (Müller, 2008)

2.1.5.6. Secuenciación de última generación

En los últimos años los avances tecnológicos han conducido al desarrollo de una secuenciación de última generación (next generation sequencing, NGS) y han logrado que el número de pares de bases nitrogenadas que se pueden secuenciar haya crecido exponencialmente. De forma eficiente se ha podido obtener el genoma completo de un individuo. Además, esta tecnología de secuenciación permite el cribado exhaustivo de numerosas variaciones presentes en el genoma a partir de un único experimento, acelerando de forma impresionante la identificación de mutaciones en muchas enfermedades.

En estos momentos existen en el mercado distintas plataformas de NGS (Illumina Hi Seq System, Ion Torrent, SOLid 5500 System, GS Flex Titanium, etc) que difieren en distintos aspectos técnicos, como el tiempo de carrera (de horas a días) o el rendimiento de la secuenciación (megabases/carrera). Salvando estas diferencias técnicas, el fundamento de todas ellas es bastante similar. El ADN se fragmenta y mediante ligación se le añaden unas secuencias adaptadoras en sus extremos. Los distintos fragmentos de ADN que se obtienen se amplifican y se agrupan juntos como entidades para secuenciar. La secuenciación se efectúa alternando ciclos de terminación reversible cíclica con otros de toma de imágenes, que se consiguen gracias a los nucleótidos que se incorporan en la reacción, ya que se pueden visualizar porque se marcan previamente con un fluorocromo. Existen otras modalidades de NGS para la identificación de alteraciones entre otras:

- Secuenciación del genoma (whole genome sequencing, WGS), que analiza deleciones, inserciones, alteraciones en el número de copias, translocaciones y cambios de bases que se producen en todo el genoma. En ocasiones y partiendo de la premisa que solo el 1,5% del genoma humano es codificante, se realiza una captura solo de estas regiones (exoma) y se secuencian aproximadamente unos 21.000 genes (whole exome sequencing, WES).

- Secuenciación del transcriptoma (ARN-Seq), que permite conocer la expresión génica, el splicing o ensamblaje de exones alternativo y pequeñas moléculas de ARN que participan en la regulación génica (ARNmi).
- Secuenciación del ADN tras sus modificaciones con bisulfito (whole genome bisulfite sequencing, BS-Seq), que permite analizar las regiones silenciadas del genoma mediante metilación (Mérida y Moreno, 2015).

Actualmente las plataformas de secuenciación masiva se utilizan fundamentalmente en el campo de investigación, aunque al trepidante ritmo que evoluciona esta tecnología y con la fiabilidad creciente de los resultados obtenidos, se espera que la NGS adquiera en un futuro cercano un papel relevante en otros campos, como la farmacogenómica y el diagnóstico genético (Mérida y Moreno, 2015).

Avances recientes en la tecnología de secuenciación de ADN, las denominadas plataformas de secuenciación de próxima generación (NGS), han reducido de modo notorio el costo de secuenciación de ADN por cada base. La secuencia inicial del genoma humano costó alrededor de 350 000 000 dólares, se estima que el costo de secuenciar el mismo genoma humano diploide de 3×10^9 bp usando las nuevas plataformas de NGS es $<0.03\%$ del original. Esta notoria disminución del costo ha estimulado diversas iniciativas internacionales para secuenciar los genomas enteros de miles de individuos de diversos trasfondos raciales y étnicos con el objeto de determinar la magnitud verdadera de polimorfismos de ADN/genomas presentes dentro de la población. La abundante información genética resultante y el costo siempre decreciente de la secuenciación de ADN genómico está incrementando de manera notoria la capacidad para diagnosticar y finalmente tratar la enfermedad en seres humanos. Obviamente, cuando la secuenciación del genoma personal se haga común, habrá cambios notorios en la práctica de la medicina, porque finalmente se harán terapias a la medida para conformación génica exacta de cada individuo (Murray et al., 2013).

2.1.5.7. Análisis de bases de datos de ADN y proteínas.

La gestión y el análisis de la gran cantidad de datos que se han generado al aplicar las últimas tecnologías en el estudio del material genético (secuenciación, microarrays, etc) requieren la utilización de multitud de programas informáticos diseñados específicamente. Por este motivo apareció el concepto de bioinformática, por el que se entiende la aplicación de la tecnología informática al ordenamiento, estructuración, gestión y análisis de los datos biológicos. Muchos son los campos que requieren el uso de programas bioinformáticos. Algunos ejemplos se citan a continuación:

- Análisis de secuencias. El resultado de la secuenciación es la obtención de una parte de la información genética de un organismo en forma de secuencias de nucleótidos. Una vez obtenida esta cantidad de datos es posible realizar, con la ayuda de programas bioinformáticos, procesos como el alineamiento de las secuencias, la localización de las regiones codificantes (exones), la detección de variantes polimórficas y mutaciones y la obtención de la secuencia proteica que corresponde a ese orden de nucleótidos. Actualmente, el uso de la NGS ha creado la necesidad de desarrollar software cada vez más potentes que permitan el análisis de la gran cantidad de datos obtenidos en forma de miles de secuencias.
- Anotación de genomas. A través de distintos programas bioinformáticos se puede determinar el inicio y el fin de un gen, los elementos repetitivos que pueden existir, así como encontrar deleciones o duplicaciones y también localizar las zonas del genoma que pueden dar lugar a ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y ARN nucleolar (ARNn).
- Predicción de la estructura y función de las proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia nucleótida del ADN da lugar a la estructura primaria de la proteína. Esta estructura determinará en parte la función que adquiera dicha proteína. Las herramientas bioinformáticas actuales permiten determinar que partes de una

proteína son importantes en la formación de su estructura y en su función.

- Localización de sitios de restricción. Las enzimas de restricción tienen la capacidad de reconocer una secuencia nucleótida característica y cortar el ADN en ese punto concreto. El estudio detallado de la secuencia de nucleótidos mediante herramientas bioinformáticas permite establecer la localización precisa de las regiones del genoma susceptibles a la actualización de las enzimas de restricción. Esta información facilita un diseño experimental adecuado y la obtención posterior de mejores resultados.
- Predicción de las interacciones proteicas en los complejos sistemas biológicos. Para profundizar más en la función de las proteínas existen distintos programas que permiten, a través de la información almacenada en distintas bases de datos, establecer su ubicación en la célula, su relación con otras proteínas, regulación, etc. De esta forma se obtienen redes de interacción entre proteínas (pathways), que resultan muy útiles en los estudios de funcionalidad proteica (Mérida y Moreno, 2015).

2.1.5.8. Bases de datos

Las anteriores aplicaciones bioinformáticas se apoyan en la comparación de los nuevos datos que aporta la experimentación con los descritos con anterioridad. Estas son accesibles para la comunidad científica a través de internet mediante un sistema general de almacenamiento en los denominados bancos de datos. Algunas de las bases de datos de uso científico más importantes son:

- University of California, Santa Cruz (UCSC): la base de datos UCSC Genome Browser fue desarrollada y mantenida por el Grupo de Bioinformática del Genoma, un equipo interdepartamental de la Universidad de California. Este sitio contiene las secuencias de referencia y borradores de secuencias de una gran cantidad de genomas. La función del Genome Browser se desplaza para hacer zoom de cromosomas, mostrando las anotaciones de investigadores de todo el mundo. El Gene Sorter revela la expresión y homología sobre familias

de genes que pueden estar relacionados y BLAST mapea rápidamente la secuencia del genoma.

- On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM): es una base de datos que clasifica las enfermedades conocidas con un componente genético y cuando es posible, las asocia a los genes identificados que se consideran responsables en el genoma humano.
- Ensembl: base de datos con origen en Reino Unido que consta de un sistema de software que mantiene anotaciones genómicas de organismos eucariotas. Proporciona información de las variantes polimórficas y de las mutaciones a nivel de nucleótidos descritas hasta la fecha en multitud de genes. Otras funciones importantes son la obtención del transcrito (ARNm) y también de la proteína a que da lugar una determinada secuencia de ADN.
- GeneCards: base de datos integrada que proporciona información precisa de todos los genes humanos conocidos.
- Base de datos de variantes genómicas (Database of Genomic Variants): proporciona un resumen completo de la variación estructural en el genoma humano (Mérida y Moreno, 2015).

2.1.5.9. Aplicaciones de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico:

Existen muchas enfermedades que tienen en una o en diversas alteraciones genéticas su causa más probable. Tras los avances que se han logrado en las técnicas de biología molecular y la calidad de la tecnología alcanzada en ellas han demostrado que su uso resulta apropiado en parcelas como el diagnóstico clínico, por la valiosa información que pueden aportar en la valoración, tratamiento y evolución de los pacientes en una gran variedad de síndromes clínicos. El diagnóstico molecular, como cualquier proceso de diagnóstico médico, pretende determinar la causa de una enfermedad, pero en la biología molecular lo hace mediante el análisis de las posibles alteraciones que se encuentran en la información genética de los pacientes a quienes se estudia (Merida y Moreno, 2015).

2.2. Antecedentes de la investigación

2.2.1. Revisión de tesis universitarias

A. HERNANDEZ JESUS (2005) “Caracterización Molecular de especies del género *Malassezia*”. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María. Arequipa

Como resumen de los resultados obtenidos y a modo de conclusiones se puede indicar que:

Todas las cepas estudiadas de *M. pachydermatis* presentaron el mismo patrón de bandas mediante la técnica de RAPD con el cebador M13.

Mediante la técnica de RAPD y utilizando el cebador OPT-20, las cepas de *M. pachydermatis* se pudieron agrupar en cuatro genotipos.

El genotipo I fue el predominante y se detectó en cepas aisladas de diferentes especies animales. Fue el único genotipo detectado en gatos, caballos, cabra y cerdo.

Los genotipos II, III, IV solo se observaron en cepas aisladas del conducto auditivo externo de perros. Los genotipos II y IV se observaron solo en cepas aisladas de otitis, mientras que las del genotipo III fueron aislados de un perro sano.

En los árboles construidos basados en el análisis comparativo de las secuencias de los fragmentos génicos D1/D2 26S e ITS-5.8S del DNA ribosomal, las 20 cepas lipodependientes se agruparon en cuatro grupos filogenéticos, que incluían las mismas cepas.

Tres de las cepas procedentes de diferentes especies animales se agruparon con la especie tipo de *M. sympodialis*.

Un segundo conjunto de cepas (grupo II), procedentes mayoritariamente de caballos, se agrupó con la secuencia D1/D2 conocida como “*M.equi*”, que carece de una descripción válida.

El grupo III estaba formado por aislamientos procedentes de cabras. Todas las cepas presentaron las secuencias de las regiones D1/D2 e ITS-5.8S completamente idénticas y claramente diferentes a la especie tipo de *M. sympodialis*.

Las cepas pertenecientes al grupo IV, aisladas principalmente de gatos, presentaron secuencias D1/D2 26S e ITS-5.8S prácticamente idénticas,

mostrando secuencias ITS1 idénticas a la especie tipo *M. nana* y secuencias D1/D2 muy parecidas.

Algunas de las cepas estudiadas presentaron suficiente variación para poderlas definir como nuevas especies siguiendo el concepto de especie filogenética. No obstante, consideramos que debemos seguir analizando otros grupos de genes con el fin de poder determinar que la divergencia entre nuestras cepas y *M. sympodialis* es suficiente para describir nuevas especies.

Utilizando el análisis de las secuencias de los D1/D2 y los ITS, las cepas lipodependientes asociadas con procesos patológicos de la piel no se diferencian genéticamente de las cepas procedentes de piel sana.

Algunas de las cepas estudiadas presentaron suficiente variación para poderlas definir como nuevas especies siguiendo el concepto de especie filogenética. No obstante, consideramos que debemos seguir analizando otros grupos de genes con el fin de poder determinar que la divergencia entre nuestras cepas y *M. sympodialis* es suficiente para describir nuevas especies.

- B. QUISPE DORA (2012) “Identificación y caracterización molecular de secuencias homologas al T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium spp.* Insertados en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam camote y especies silvestres relacionadas”. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María. Arequipa

La transferencia horizontal de genes (HGT) ha sido uno de los temas más debatidos en biología evolutiva durante las últimas dos décadas debido a que esto ha desafiado considerablemente nuestra visión acerca de la historia evolutiva de los genomas. En el caso de organismos procariotas como las bacterias, la adquisición de genes de otros individuos alejados filogenéticamente les ha permitido producir genomas extraordinariamente heterogéneos y dinámicos cambiando por tanto, la ecología y la patogenicidad de las especies bacterianas (Maiden 1998; Gogarten et al., 2002; Ochman et al., 2000). En eucariotas también se ha registrado la ocurrencia de eventos de HGT, los cuales incluyen a un gran número de genes provenientes de varios donadores en los rotíferos de la clase *Bdelloidea* (Gladyshev et al., 2008) o la transferencia de genes de la

bacteria intracelular *Wolbachia* dentro del genoma de sus hospederos artrópodos (Hotopp et al., 2007). En plantas, el modelo mejor conocido sigue siendo el del género *Agrobacterium* cuyo mecanismo de infección involucra la transferencia e integración de una región del plásmido Ti al genoma de la célula vegetal. El impacto de este hallazgo ha tenido grandes aplicaciones en diversos campos de la biología vegetal, agricultura y biotecnología. Sin embargo, el descubrimiento de secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ri de *Agrobacterium rizhognenes* en el genoma de especies del género *Nicotiana* (White et al., 1983; Furner et al., 1986), *Daucus carota* “zanahoria” (Spano et al., 1982) y *Convolvus arvensis* (Tepfer, 1982) han evidenciado que la ocurrencia de este tipo de eventos actúa como una fuerza significativa en la evolución de genomas eucariotas (Richardson y Palmer, 2007; Bock, 2010; Talianova y Janousek, 2011). La importancia de estos hallazgos incrementa la necesidad de realizar más investigaciones para entender el mecanismo de flujo horizontal de genes a través de bacterias en la evolución de plantas superiores, por lo que el presente trabajo de tesis pretende identificar y caracterizar la presencia de secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium spp.* en el genoma de *Ipomoea batatas* (L.) Lam “camote” y especies silvestres relacionadas, con el fin de evidenciar la ocurrencia de eventos de HGT en este género y el posible impacto de este hallazgo en su evolución.

- C. THOMPSON CAROLINA (2013) “Estudio de la diversidad genética en poblaciones de *Babesia bigemina* de diferentes regiones geográficas”. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María. Arequipa.

La babesiosis bovina es una enfermedad enzoótica causada por protozoarios Apicomplexa del género *Babesia* transmitidos por diferentes especies de garrapatas. En Argentina, esta enfermedad es provocada por *B. bovis* y *B. bigemina*, ambas transmitidas por la garrapata de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. La babesiosis genera importantes pérdidas económicas a la producción bovina por provocar pérdidas de peso, abortos, costos de tratamiento y frecuentemente la muerte.

La caracterización molecular de aislamientos de *B. bigemina* es fundamental para realizar estudios epidemiológicos, desarrollar pruebas

para diagnóstico y sintetizar nuevas vacunas. En este trabajo se seleccionaron clones biológicos a partir de una cepa patógena y una cepa atenuada de *B. bigemina*, ambas adaptadas a la multiplicación continua in vitro, utilizando diluciones límite. Estos clones fueron útiles para establecer la constitución genética de aislamientos y cepas de referencia, comparar clones con diferente fenotipo de virulencia, evaluar distintos marcadores moleculares, y caracterizar aislamientos silvestres. Se trabajó con 7 clones biológicos terciarios derivados de la cepa patógena BbiS2P-i y 5 de la cepa atenuada BbiS1A-i. El estatus de virulencia de los clones se evaluó in vitro e in vivo. Se compararon mediante HRM y/o secuenciación los genes 18S rARN, rap-1c y gp45 y las regiones intergénicas ITS y diferentes secuencias repetitivas en clones y cepas silvestres. Los clones no mostraron diferencias genéticas con sus parentales, pero sí una reducción de haplotipos con respecto a las cepas originales mantenidas in vivo. Las regiones polimórficas de los marcadores moleculares permitieron diferenciar las cepas de diferentes regiones geográficas. Las mutaciones observadas en el gen 18S rARN se ubicaron en su mayoría en la región hipervariable de la hélice E23-1, mientras que la zona polimórfica del gen rap-1c se ubicó en el extremo 3'. El gen gp45 no pudo utilizarse debido a la falta de detección en una cepa y las regiones ITS mostraron elevado polimorfismo. Sólo 3 ms y 1 MS permitieron diferenciar clones con diferentes genotipos y fenotipos. Estos marcadores también permitieron agrupar clones y cepas por su fenotipo de virulencia. El análisis simultáneo de las secuencias de los genes 18S rARN y rap-1c de los clones biológicos, confirmó que solo ciertas subpoblaciones de Babesia prevalecen durante la adaptación in vitro, lo que generó una reducción del número de haplotipos. En conclusión, los clones y los marcadores moleculares seleccionados permitieron establecer la diversidad existente entre cepas obtenidas de diferentes regiones de Argentina y las diferencias relevantes con las cepas de Australia e Israel. Este trabajo establece la base para definir la importancia de la patogenicidad de *B. bigemina* en infecciones naturales. Deberán evaluarse nuevos marcadores moleculares para el estudio de los aislamientos de casos naturales que ocurren en diferentes regiones enzoóticas.

D. CONCHA DANIELLA. (2014) “Identificación de la etiología de abscesos subcutáneos (Linfadenitis) en cuyes (*Cavia porcellus*) en etapa de crecimiento mediante aislamiento microbiológico en la sección D2 de la Irrigación de Majes – 2013”. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María. Arequipa.

Con el fin de determinar el agente etiológico de Linfadenitis de abscesos subcutáneos en cuyes en el distrito de Majes, provincia de Caylloma, departamento de Arequipa, se tomaron muestras aleatorias de 50 animales en crecimiento.

Tomando en cuenta que la producción de cuyes es una de las principales actividades en la zona de estudio, esta representa una fuente de ingresos para los pobladores en general de esta zona, es probable que determinando el agente etiológico de la Linfadenitis con presencia de abscesos subcutáneos en cuyes, brindaríamos una herramienta útil a los productores, ya que de esta manera podrían tomar las medidas necesarias de prevención y control de la enfermedad, así se podrán evitar daños económicos y sanitarios que provoca esta enfermedad.

Se determinó que los agentes etiológicos de la Linfadenitis de abscesos subcutáneos en cuyes es el *Streptococcus zooepidemicus* con 90.5%, *Salmonella thyphimurium* con 2%, *Salmonella enteritidis* con 2%, *Staphylococcus aureus* con 2%, *Micrococcus* con 2% en la Asociación COPRA – Majes 2013.

Las muestras se analizaron en el Bio laboratorio VetGen mediante aislamiento microbiológico en agar sangre y MacConkey.

El presente estudio buscó determinar el agente etiológico de la Linfadenitis de abscesos subcutáneos en cuyes en el distrito de Majes, provincia de Caylloma, departamento de Arequipa, mediante aislamiento microbiológico, con el fin de aportar información para futuros estudios epidemiológicos relacionados a esta enfermedad.

2.2.2. Otros trabajos de investigación

A. NECOCHEA, R. Y CANUL, J. (2004) “Secuenciación de ácidos nucleicos”. (Proyecto de Investigación). Universidad Nacional Autónoma de México. México

El lento y tortuoso progreso que acompañó los inicios de la investigación de los ácidos nucleicos es representativo de lo limitado de las técnicas y la falta de facilidades en los períodos tempranos de la bioquímica. Las dificultades encontradas por los investigadores fueron muchas. Era difícil asegurar la homogeneidad del material de trabajo. No existían métodos establecidos para el estudio de macromoléculas, y tampoco pautas para el aislamiento de unidades estructurales. Afortunadamente, algunas sustancias cercanamente relacionadas fueron sintetizadas por químicos orgánicos en experimentos que usualmente no estaban relacionados con los ácidos nucleicos. Si la investigación de los ácidos nucleicos debe mucho a la química orgánica en su período inicial, el trabajo conjunto de la biología y la química han hecho de la investigación contemporánea de los ácidos nucleicos una rica fuente de descubrimiento e invención que ha transformado y mejorado la condición humana. En general, los ácidos nucleicos son polímeros lineales de nucleótidos. Pueden tener desde 80 nucleótidos, como en el tARN, hasta más de 108 pares de nucleótidos en un cromosoma eucariótico. El cromosoma de *Escherichia coli* tiene 4×10^6 pares de bases, 4Mpb. El ADN genómico de una sola célula humana tiene 3,900 Mpb. A un laboratorio de la mitad de la década de los setentas le habría tomado dos meses secuenciar 150 nucleótidos.

Actualmente, un laboratorio especializado es capaz de secuenciar varios millones de nucleótidos al día. Desde esta perspectiva, resulta notoria la capacidad de secuenciación de ácidos nucleicos de las tecnologías disponibles actualmente. Y es principalmente, el desarrollo y la automatización de los métodos fisicoquímicos de macromoléculas biológicas, en general, lo que ha permitido lograr estos avances en el conocimiento del material genético.

A finales del siglo pasado, se secuenciaron los primeros genomas, correspondientes a las bacterias *Haemophilus Influenzae* y *Mycobacterium*

genitalium. Esfuerzos más recientes han permitido la determinación de secuencias genómicas más complejas. El primer eucarionte secuenciado fue *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente se reportaron las secuencias de los genomas de *Caenorhabditis elegans*, de *Drosophila melanogaster* y de *Arabidopsis thaliana*. A principios del año 2001, dos grupos, de manera simultánea e independiente, reportaron la secuencia del genoma humano, y a fines del año 2002 se reportó el genoma del ratón y del arroz. Con la determinación de la secuencia nucleotídica del genoma humano y la de otros organismos nos hemos enfocado en el conocimiento de la célula. Conociendo la secuencia de todos los genes de un organismo, es posible deducir su proteoma. Asimismo, con la información que se tiene, es posible empezar el estudio integral y global de las redes metabólicas y conocer la manera en que una célula regula la expresión genética en diferentes condiciones metabólicas. Sin embargo, este nuevo conocimiento es preliminar. Si bien podemos enlistar todos los genes de una célula, la determinación de las posibles interacciones entre sus productos es una meta a largo plazo todavía.

Hay, pues, mucho más que conocer para entender el proceso mismo de la vida. En este trabajo se expone una breve perspectiva histórica de algunos de los hechos que han repercutido sensiblemente en el avance de las tecnologías para la secuenciación de los ácidos nucleicos. Desde el tortuoso camino que llevo a la elucidación de la estructura de la doble hélice, pasando por los esfuerzos iniciales para desentrañar el lenguaje del ADN (y de la vida) y los esfuerzos más recientes que inauguraron la era de la genómica. Una mirada hacia atrás siempre es importante, no sólo porque ayuda a consolidar los conceptos de una materia en particular, sino también porque se puede aprender de las experiencias de otros. Además, se presentan los fundamentos teóricos y físicos relacionados con la química de los ácidos nucleicos y su secuenciación. Finalmente, se citan algunas de las aplicaciones que han permitido profundizar en el conocimiento del material genético de las células.

B. MORALES S. Y BARRIOS-ARPI L. (2017). “Composición y características de la orina en cuyes (*Cavia porcellus*) con linfadenitis cervical”. REVET Revista electrónica de Veterinaria. Volumen 18. N°9

El examen de orina es una prueba de laboratorio simple, no invasiva y económica que proporciona información valiosa para la evaluación de animales sanos y enfermos, pudiendo reflejar una variedad de procesos que afectan a diversos órganos, incluyendo, pero no estando limitado, al sistema urinario (Gregory, 2005; Archer, 2012). En caso del presente estudio, se pretendió evaluar los cambios o alteraciones que podrían aparecer en el análisis de orina a consecuencia de la linfadenitis cervical en cobayos, debido a que el agente causal no sólo puede producir agrandamiento de los linfonódulos (principalmente cervicales) sino también, algunas infecciones pueden progresar a tortícolis, neumonía y septicemia, así como alteraciones del tracto urinario y reproductor (Acha y Szyfres, 2003). La orina normal de los mamíferos es de color amarillo a ámbar y la profundidad del color está en relación al volumen y la concentración de orina (Gregory, 2005). Casi la totalidad de las muestras mostraron un color amarillo coincidiendo con el color que aparece en condiciones de normalidad (Kraft y Dürr, 2005), variando un poco la coloración en 3 casos (amarillo blanquecino, nacarado y verdoso) y sólo en uno de los casos presentaba un color marrón. El color de la orina anormal puede variar desde cambios en la tonalidad de amarillo hasta colores característicos debido a la administración de fármacos u oxiglobina (Gregory, 2003). La apariencia normal de la orina del cobayo es clara a turbia, y coinciden los hallazgos de apariencia encontrados con este dato; sin embargo, una de las muestras mostraba una apariencia floculenta, similar a lo encontrado en algunas aves como ratites, patos u ocas (Gregory, 2003), pudiendo estar influenciado por la cristaluria mixta y los marcados niveles de proteínas encontrados en la orina.

La densidad de la orina es un indicador útil de capacidad de concentración del riñón (Archer, 2012). La densidad urinaria se encontró en el rango de 1.003 –1.068, con una media de 1.038, coincidiendo con la densidad urinaria normal de 1.000 a 1.040 para cobayos (Kraft y Dürr, 2005). Sin embargo, se observaron densidades superiores a 1.040 (52% de los casos), lo cual podría ser debido a la presencia de proteínas de pesos moleculares

bajos encontrados en la orina. En relación a los valores de pH, estos coincidieron con los valores referenciales para la especie, el cual es muy alcalino debido al tipo de alimentación recibida para este tipo de especies, similar a los rumiantes y equinos (Benjamín, 1991). Las muestras urinarias aleatorias contienen cantidades reducidas de proteínas (hasta 50 mg/dl) y, asimismo, en la evaluación de la proteinuria es fundamental localizar su origen, si es pre-renal, renal y/o postrenal (DiBartola, 2005). Se sabe que en casos de linfadenitis cervical es probable, aunque poco frecuente, la afectación de múltiples órganos como pulmones, aparato urinario y tracto reproductor caracterizado por la formación de abscesos en estas localizaciones (Pinochet, 1992) caracterizado por la presencia de infiltrado celular inflamatorio comprendido por células mononucleares predominantemente (Jubb y Kennedy, 1992) y esto podría contribuir notablemente a la producción de citoquinas y otras proteínas inflamatorias y al incremento en los niveles de proteínas plasmáticas. Al realizar el análisis de los resultados se puede determinar que el origen de la proteinuria sea pre-renal, debido a las características del sedimento urinario ya que no se observaron células tubulares ni cilindros hialinos y/o granulares para sospechar en un daño renal ni presencia de leucocitos y células transicionales con hallazgos de cristaluria para sospechar en un daño del tracto urinario bajo. Uno de los elementos más importantes y donde se observaron resultados variables tanto cualitativos y cuantitativos, fue en relación a la presencia de cristaluria. Si bien es cierto, no existen estudios referentes a uroanálisis en cobayos, podemos deducir que la presencia de cristales (abundantes en el 36% de los casos) podría deberse al pH muy alcalino de la orina que contribuiría con la formación de cristales de diversos tipos, siendo los cristales de fosfato triple los más frecuentemente encontrados (64% de los casos), tal como se ha reportado en otras especies (Gregory, 2005). Finalmente, la presencia de bacteriuria es un parámetro dentro del análisis de orina muy importante para definir la presencia de infección urinaria en el animal. La orina vesical normal es estéril, por lo que, la presencia de grandes cantidades de bacterias en la orina recolectada por cateterización o cistocentesis sugiere infección urinaria (por lo usual acompañado de piuria) (DiBartola, 2005). En el presente estudio se reveló

un 64% de casos de bacteriuria caracterizada por regular a abundante cantidad de bacterias sin presencia de piuria; sin embargo, no se realizó un cultivo bacteriano para reconocer la especie de microorganismo infectante y confirmar la infección urinaria en los casos presentados.



CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Localización del trabajo

3.1.1.1. Localización espacial

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la ciudad de Arequipa, a excepción de la secuenciación molecular que se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Harvard en USA.

Límites:

Por el norte, con la provincia de Caylloma;

Por el este, con el Departamento de Puno;

Por el sur, con la provincia de Islay;

Por el oeste, con la provincia de Camaná.

Altitud: 2,335 m

Clima: Seco

Temperatura: entre los 10°C y 35°C grados.

3.1.1.2. Localización temporal

El presente trabajo de investigación se realizó entre diciembre 2017 y diciembre del 2018

3.1.2. Material biológico

4 cuyes

3.1.3. Material de laboratorio

Placas Petri

Agar sangre

Hisopos estériles

Mechero

3.1.4. Equipo y maquinaria

Refrigeradora

Centrifuga

Cámara de flujo laminar

Vortex

Tempblock Module Heater

Máquina de electroforesis

PCR

Horno Microondas

Cámara

3.1.5. Otros materiales

Cuaderno de apuntes

Cámara fotográfica

Mandil

Barbijo

Guantes estériles

3.2. Métodos

3.2.1. Muestreo:

- Universo

Abscesos de cuyes que llegaron para necropsia del curso de Patología Veterinaria.

- Tamaño de la muestra

4 cuyes (muestreo por conveniencia)

Los elementos se eligen según conveniencia del investigador, de un experto y/o siguiendo un protocolo previamente establecido. Este método resulta útil para obtener información inicial, generar hipótesis, líneas de investigación o en estudios que no precisen exactitud (Santabárbara et al., 2015).

- Procedimiento de muestreo
 - 1) Inmediatamente a su llegada al laboratorio, se procedió a iniciar un examen clínico general en cada cuy con el fin de identificar aquellos con las características típicas de la linfadenitis: abscesos en la región del cuello con aumento del tamaño de los ganglios principalmente. Además de Sinusitis, otitis, bronquitis y descargas nasales (Chauca, 1997).
 - 2) Se realizó la eutanasia mediante la aplicación intracardiaca de T-61.
 - 3) Se extrajeron los linfonódulos de cada espécimen en un frasco esteril, para procesarlos en el laboratorio de microbiología.

3.2.2. Métodos de la evaluación

3.2.2.1. Metodología de la experimentación

Aislamiento e identificación del agente etiológico de la muestra clínica

- Se realizó una incisión en cada absceso para retirar todo el contenido de pus, seguido de un hisopado de las paredes internas del absceso.
- Se procedió a sembrar en placas con Agar sangre por 24 horas a 37°C.
- Se identificó colonias de estreptococos como laminas pequeñas y transparentes beta-hemolíticas.
- Se realizó 4 pasajes como mínimo, en agar sangre; para purificar la muestra. Es decir se transfirió la colonia de una placa hacia otra pura por 24 horas a 37°C y así sucesivamente.
- Agar sangre es un medio general rico en nutrientes, por lo que permitirá el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. Además, es un medio diferencial, ya que permite comprobar si la bacteria es capaz de hemolizar los eritrocitos del medio de cultivo. Si la hemolisis que se produce es total, se denomina beta-hemolisis. (Díaz et al., 2003)

Extracción de ADN de la muestra

El fundamento de la extracción es eliminar las proteínas, ya que el ADN está protegido por proteínas que interfieren en el proceso de amplificación del ADN que tiene lugar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para mantener la integridad de la estructura de ADN se emplean reactivos

que no provoquen roturas y mantengan lo más entero posible el ADN, ya que esas roturas generarían pequeños fragmentos que pueden producir dificultades en la amplificación.

Técnica del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico:

Consiste en que los ácidos nucleicos al contrario que las restantes sustancias (proteínas, hidratos de carbono, lípidos) no se disuelven en fenol. El cloroformo y el fenol atrapan los lípidos y las proteínas y dejan el ADN disuelto en agua. La proteína K más SDS elimina proteínas; el fenol cloroformo procura la separación de las fases acuosa y orgánica y el isoamilacohol o alcohol isoamílico impide la formación de espuma. Los pasos que se siguen son:

- Añadir un volumen igual al de la muestra de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y agitar con vórtex.
- Centrifugar a temperatura ambiente y transferir la parte acuosa (fase acuosa, fase superior) que contiene el ácido nucleico a otro tubo.
- Añadir acetato sódico para facilitar la precipitación con etanol y después añadir etanol al 100% frío.
- Dejar precipitar a -20°C durante 30 minutos.
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- Lavar con etanol al 70% para reprecipitar.
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante de nuevo.
- Resuspender el tampón TE (tris-EDTA) (Mérida y Moreno, 2015)

Electroforesis en gel de agarosa al 1%

La agarosa es un polisacárido natural obtenido de algas marinas es capaz de formar geles con rigidez suficiente para ser manipuladas a partir del 0.2%. Para formar los geles, la agarosa sólida es disuelta en tampón TB0,5X por calentamiento el punto de fusión de la agarosa ordinaria esta alrededor de los 80°C . (Pacheco y Bernabé, 2012)

Es la técnica más utilizada para la separación y caracterización de moléculas de ácidos nucleicos. Las moléculas de ADN portan una carga negativa por lo tanto se mueven hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Debido a que la matriz del gel restringe la difusión aleatoria de las moléculas las que son del mismo tamaño migran juntas como una banda, cuyo ancho es igual a la del carril donde se colocó originalmente la muestra. Las moléculas pequeñas se mueven a través de la matriz más rápidamente que las más grandes, de manera que las moléculas de diferentes longitudes migran como bandas distintas. Para moléculas más grandes alrededor de 200 nucleótidos a 20kb se recomiendan usar geles de agarosa. Para moléculas entre 10 a 2 mil nucleótidos se puede optar por la electroforesis en gel de poliacrilamida. Un método común para visualizar bandas de ADN separadas en un gel consiste en incubar el gel en solución que contiene el colorante fluorescente Bromuro de Etidio (Lodish et al., 2016)

Amplificación del ADN

La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres fases:

Desnaturalización del ADN molde mediante la elevación de la temperatura, con el fin de permitir la subsiguiente unión de los fragmentos cebadores.

Hibridación de cebadores, reduciendo la temperatura se induce la unión de cebadores a las zonas complementarias del ADN desnaturalizado. Cada cebador es un oligonucleótido monocatenario de secuencia idéntica a una corta región de cada una de las dos hebras, localizadas en las posiciones extremas de la región que se requiere amplificar. Tras la unión de cada

cebador a su secuencia complementaria, se forma una estructura monocatenaria cebada, sustrato de las polimerasas.

Elongación, llevando la disolución a una temperatura adecuada y en presencia de un gran exceso molar de los cuatro dNTPs, la polimerasa elonga el sustrato cebado. En los primeros ciclos se sintetizan moléculas largas, pero en repeticiones posteriores, la elongación empezará a encontrarse limitada por la longitud del molde que, a su vez, aparecerá fijada por el segundo cebador. A medida que se repite el ciclo, la mezcla de productos se enriquece progresivamente en la especie molecular que incorpora en sus extremos a ambos fragmentos cebadores. (Perera et al., 2002)

Secuenciación de las cepas bacterianas aisladas

Se obtuvo 4 secuencias del gen 16 ribosomal de las 04 cepas bacterianas aisladas a partir de abscesos cervicales de cuyes mediante el Secuenciador automático ABI 3730XL.

Se empleó la secuenciación cíclica, en una reacción similar a la de amplificación que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. Sin embargo, la secuencia obtenida podrá contener errores y/o presentar posiciones ambiguas (indicadas por N). Por ello, la obtención de la secuencia definitiva requiere la evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles

discrepancias. Ya se ha indicado que la identificación de una bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación del ADNr 16S completo. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado clínico, necesiéndose únicamente 2 iniciadores. (Rodicio y Mendoza, 2004)

Análisis de las secuencias

Las secuencias de cada cepa fueron analizadas y comparadas con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) y Sequence Match.

Para descubrir secuencias homologas se pueden utilizar los bancos de datos, cuando se determina por primera vez la secuencia de una proteína, al compararla con todas las secuencias previamente caracterizadas puede aportar muchísima información sobre sus parentescos evolutivos y por consiguiente, sobre su estructura y función. Los buscadores de secuencias homologas en bancos de datos muy frecuentemente operan utilizando los recursos disponibles en la página de Internet del Centro Nacional de Información en Biotecnología (www.ncbi.nih.gov). Al procedimiento utilizado se le conoce como buscador BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Instrumento de búsqueda de Alineamientos locales básicos). La secuencia a investigar se escribe o se pega dentro del sitio web de confrontación y se ejecuta la búsqueda. Un buscador BLAST aporta una lista de alineamientos de secuencias cada una acompañada de una

estimación de la probabilidad de que el alineamiento presentado sea debido al azar. (Stryer, 2015)

La filogenia se realizó mediante el método neighbor joining por Saito y Nei y el modelo Kimura-2.

3.2.2.2. Recopilación de la información

- En el laboratorio
- En la biblioteca
- En otros ambientes generadores de la información científica

3.2.3. Variables de respuesta

3.2.3.1. Variables independientes

Agente etiológico causante de linfadenitis en cuyes

3.2.3.2. Variables dependientes

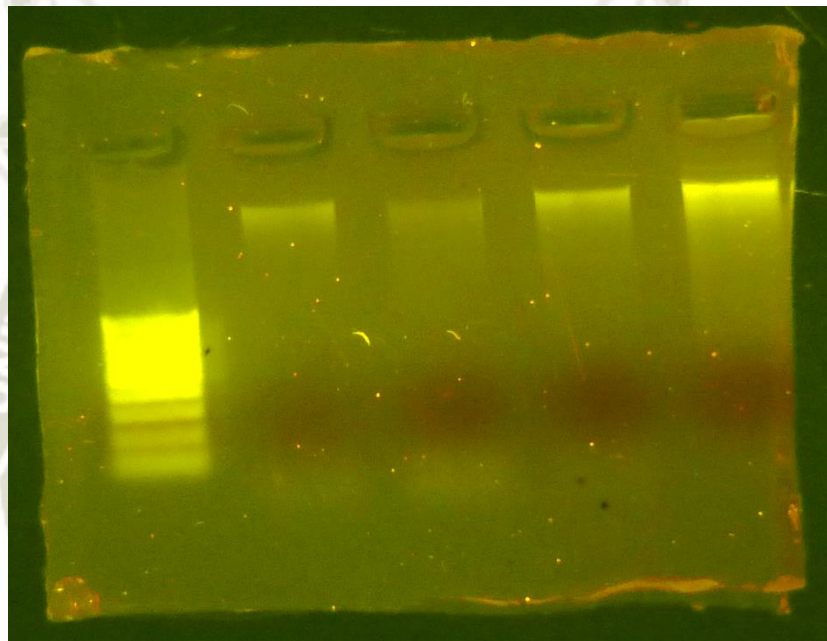
Secuencia de nucleótidos que caracteriza al agente etiológico causante de linfadenitis.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización Microbiológica. Electroforesis del ADN genómico en gel agarosa al 1% con el método fenol – Cloroformo

Imagen Nro. 1: Electroforesis mostrando barras resaltadas con el ADN bacteriano, del gen RNAr 16S como resultado de las amplificaciones de las diferentes muestras en estudio utilizando un control positivo y marcadores. Las bandas en estudio corresponden a las cepas de la 1 a la 4.



Primers bacterianos usados para el PCR:

8F- 5'-AGGAGTTGATCCTGGCTCAAG-3'

149r – 5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'

Secuenciación Molecular de la bacterias aisladas a partir de abscesos cervicales en cuyes (*Cavia porcellus*)

Secuencias del Gen 16S Ribosomal de las 04 cepas bacterianas, obtenidas del secuenciador automático ABI 3730XL, secuencias del gen 16s ribosomal de las bacterias de la 1 a la 4 aisladas a partir de abscesos cervicales de cuyes.

4.1. Secuencia de Cepa 15M1_27F

NNNNNNNNNNNNNNNCNANACNTGCAGTGGAACGCACAGATGATACGT
ANCTTGCTACAATTATCTGTGAGTCGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGG
TAACCTAGCTTATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACC
GCATAAAAGTGGTTGACCCNTGTAAACCATTAAAAGGAGCAACAGCT
CCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTANGGTAAAGG
CCTACCANGGCGACGATACATAGCCNACCTGAGAGGGTGAACGGCCAC
NCTGGGACTGAGACACGGNCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCNGCAATGGGGGGAACCCTGACCGAGCAACGCCNCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAGTGAT
GGGAGTGGAAAGTCCATCATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGG
CTAACTACNTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAANTCTGAA
GTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTATGCTTTGGAAACTGTAAACTT
GANTGCANAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCNT
ANATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGANNTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTANATACNC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGAGTGCTNNTGTTAGGCCCTTTCNG
GGCTTANTGCCGTANCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA
NCGCANGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAACGGT
GNAGCATGTGNNTTAATTCNAAGCAACNNNNANANNCTTACCNNGNCT
TGACNTCCCNATGCNNTTCTTAGANANNNNNNNTTACTTNNGGTACNNTN
NAGANNNGNNGNNCANNNGNNNNCNCNCCNCCNCGNCNNNAGANGNTN
GGGNTTNANNCCNCANNANCGCANCNNTNANTNNNANNNNNNTCNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGN
NNANNNGNANNANNANNNNNCNNNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

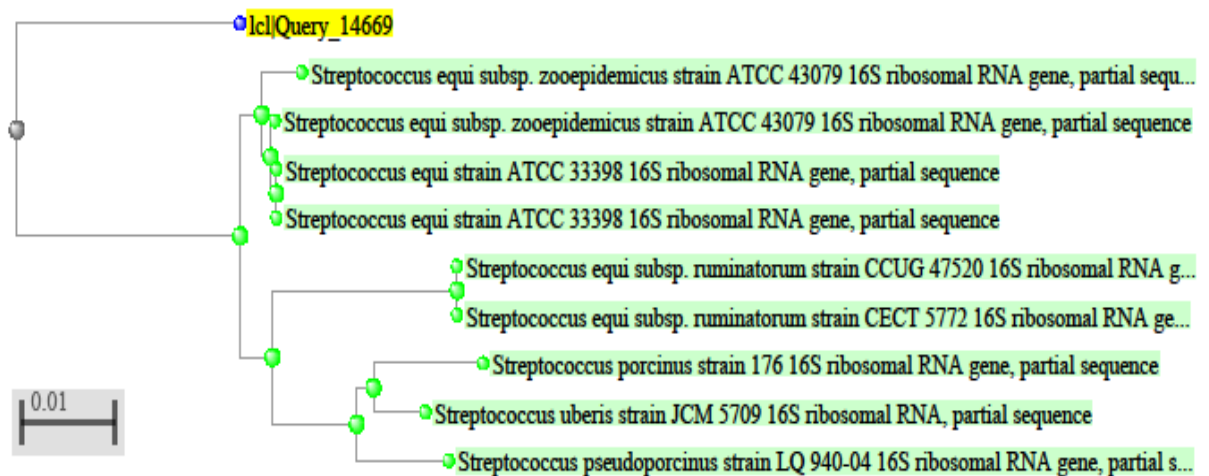
4.3. Análisis Bioinformático de la cepa 15M1_27F

La secuencia del gen 16S ribosomal fue analizada y comparada con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) y Sequence Match. La secuencia se alineó a scores de especies significativas más altas (10 más altas), mostrando los resultados siguientes:

Description	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Ident
<i>Streptococcus equi</i> strain ATCC 33398 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	78%	0	95%
<i>Streptococcus equi</i> strain ATCC 33398 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1609	1609	78%	0	95%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> strain ATCC 43079 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	78%	0	95%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> strain ATCC 43079 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1544	1544	76%	0	94%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> strain CCUG 47520 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1428	1428	74%	0	93%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> strain CECT 5772 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1428	1428	74%	0	93%
<i>Streptococcus porcinus</i> strain 176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1345	1345	70%	0	93%
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i> strain LQ 940-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1332	1332	70%	0	93%
<i>Streptococcus canis</i> strain ATCC 43496 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1332	1332	70%	0	93%

4.4. Árbol filogenético de la cepa 15M1_27F

Filogenia con las secuencias parciales del gen RNAs 16S. Se analizó el agrupamiento de las secuencias parciales del gen 16S de la Cepa en estudio 15M1-27F con las cepas que presentaron similitud según el alineamiento global mediante BLAST según Kumar y col, 2004, Chenna y col 2003; Thompson y col, 1997. La filogenia se realizó mediante el método neighbor joining por Saito y Nei y el modelo Kimura-2.

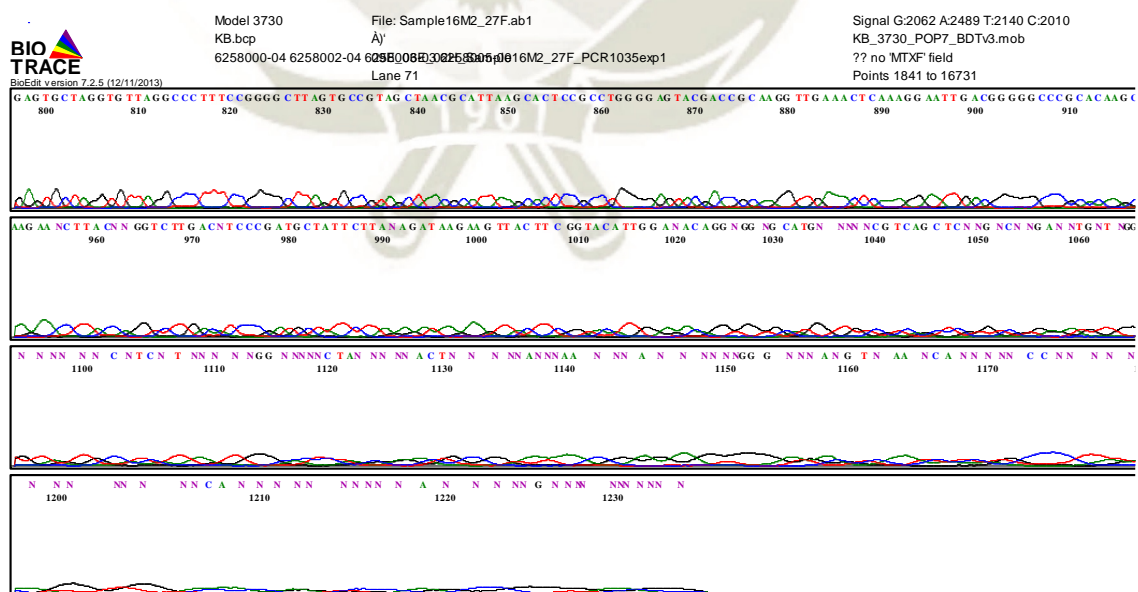
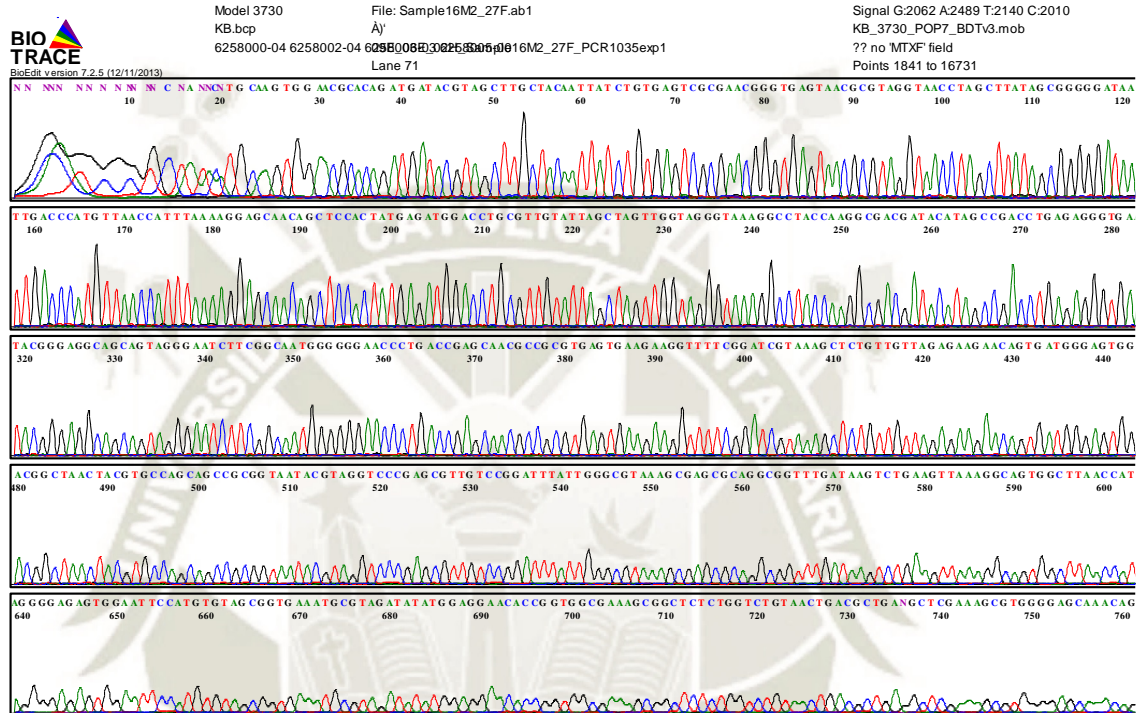


4.5. Secuencia de Cepa 16M2_27F

NNNNNNNNNNNNNNNCNANNCNTGCAAGTGGAACGCACAGATGATACGT
AGCTTGCTACAATTATCTGTGAGTCGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGG
TAACCTAGCTTATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACC
GCATAAAAGTGGTTGACCCATGTTAACCATTTAAAAGGAGCAACAGCT
CCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGG
CCTACCAAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCGGCAATGGGGGGAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAGTGAT
GGGAGTGGAAAGTCCATCATGTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA
GTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTATGCTTTGGAAACTGTAAACTT
GAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGANGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCG
GGGCTTAGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAANCTTACNNGGTC
TTGACNTCCCGATGCTATTCTTANAGATAAGAAGTTACTTCGGTACATT
GGANACAGGNGGNGCATGNNNNNCGTCAGCTCNNGNCNNGANNTGNT
NGGNNNNGTCCCGCANNANCNCNNNCNNNANNNNNNNNNCNCNTNNTN
NNGGNNNNNCTANNNNNACTNNNNNANNNAAANNANNNNNNNGGGNN
NANGTNAANCANNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNCANNNNNNNNNNNANNNNNGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

4.6. Electroferograma de la cepa 16M2_27F

La muestra Nro. 2 identificada como 16M2-27F fue analizada por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer que traduce las señales fluorescentes en la secuencia de bases correspondiente



4.7. Análisis Bioinformático de la secuencia 16M2-27F.

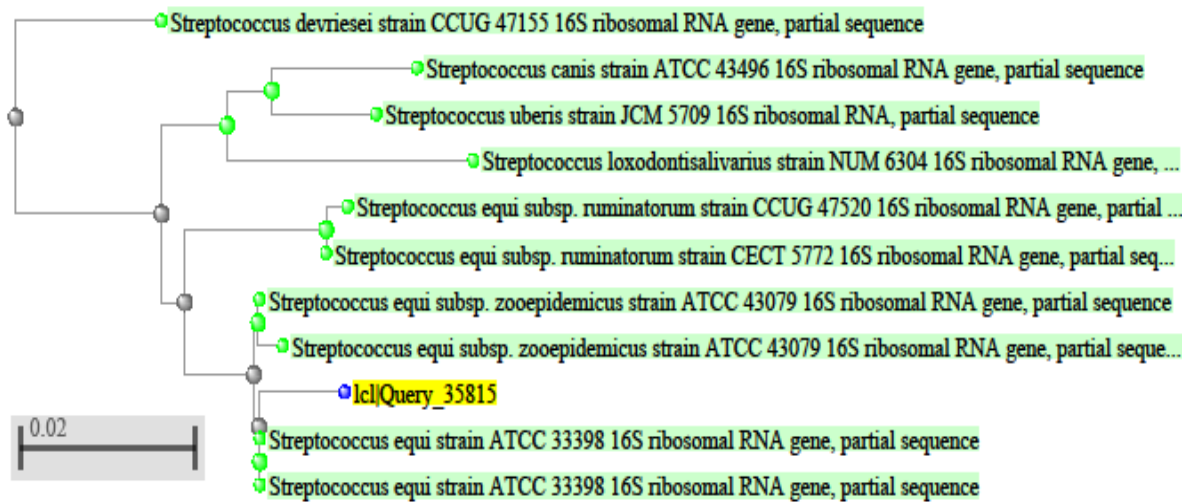
La secuencia del gen 16S ribosomal fue analizada y comparada con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) y Sequence Match. La secuencia se alineó a scores de especies significativas más altas (10 más altas), mostrando los resultados siguientes:

Description	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Ident
<i>Streptococcus equi</i> strain ATCC 33398 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1834	1834	82%	0	99%
<i>Streptococcus equi</i> strain ATCC 33398 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1834	1834	82%	0	99%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> strain ATCC 43079 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1829	1829	82%	0	99%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> strain ATCC 43079 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1748	1748	80%	0	98%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> strain CCUG 47520 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1646	1646	82%	0	96%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> strain CECT 5772 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1644	1644	78%	0	97%
<i>Streptococcus canis</i> strain ATCC 43496 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1515	1515	78%	0	95%
<i>Streptococcus uberis</i> strain JCM 5709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1509	1509	78%	0	95%
<i>Streptococcus devriesei</i> strain CCUG 47155 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1504	1504	82%	0	93%
<i>Streptococcus loxodontisalivarius</i> strain NUM 6304 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1493	1493	78%	0	94%

4.8. Árbol filogenético de la cepa 16M2_27F

Filogenia con las secuencias parciales del gen RNAs 16S. Se analizó el agrupamiento de las secuencias parciales del gen 16S de la Cepa en estudio 16M2-27F con las cepas que presentaron similitud según el alineamiento global mediante BLAST según Kumar y col, 2004, Chenna y col 2003; Thompson y col, 1997.

La filogenia se realizó mediante el método neighbor joining por Saito y Nei y el modelo Kimura-2.



4.9. Secuencia de Cepa 17M3_27F

NNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNACNTGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAG
CTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAAC
CTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAACATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTTTGCTGTCA
CTTATAGATGGATCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTNACGGCTT
ACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATCAGGGAAGAACAATGTGTA
AGTAACTGTGCACATCTTGACGGTACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA
GATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTG
ACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCC
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC
GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGANCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGA
CATCCTTNGACCGCTCTAGANATAGAGTCNTCCCNTTCGGGGGACAAAG
TGACNNNGGNGCATGNNNNTCGNCAGCTCNNNNCNTGNGATGNTNGGN
NAAGTNCNNANNAGCGCNCNNNNNTNNNNNCNNCNCNNNNNGGNNNN
CTANNNACTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGANGTNNANCATCNNNN
NNNNNNANNNGGNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNN
NNNNNNNNNGNNNNNNNNNAANNNNNNNAANNNNNNNN

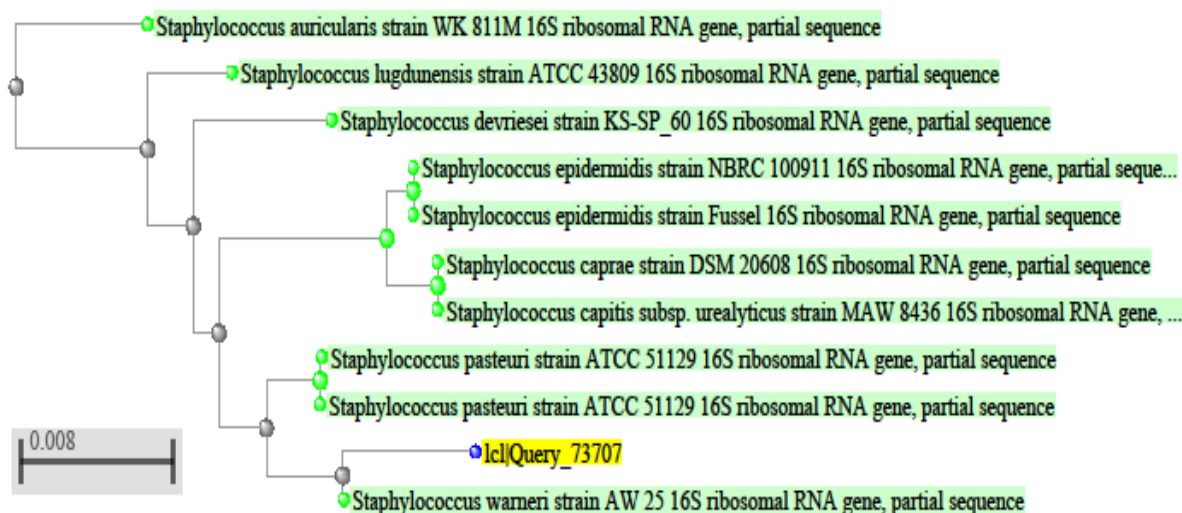
4.11. Análisis Bioinformático de la secuencia 17M3_27F

La secuencia del gen 16S ribosomal fue analizada y comparada con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) y Sequence Match. La secuencia se alineó a scores de especies significativas más altas (10 más altas), mostrando los resultados siguientes:

Description	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Ident
<i>Staphylococcus warneri</i> strain AW 25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1820	1820	80%	0	99%
<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1781	1781	80%	0	99%
<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain ATCC 51129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	1779	80%	0	99%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC 100911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1731	1731	80%	0	98%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> strain ATCC 43809 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1731	1731	80%	0	98%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1731	1731	80%	0	98%
<i>Staphylococcus devriesei</i> strain KS-SP_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1725	1725	80%	0	98%
<i>Staphylococcus caprae</i> strain DSM 20608 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1720	1720	80%	0	97%
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> strain MAW 8436 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1720	1720	80%	0	97%
<i>Staphylococcus auricularis</i> strain WK 811M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1720	1720	80%	0	97%

4.12. Árbol filogenético de la cepa 17M3_27F

Filogenia con las secuencias parciales del gen RNAs 16S. Se analizó el agrupamiento de las secuencias parciales del gen 16S de la Cepa en estudio 17M3-27F con las cepas que presentaron similitud según el alineamiento global mediante BLAST según Kumar y col, 2004, Chenna y col 2003; Thompson y col, 1997. La filogenia se realizó mediante el método neighbor joining por Saito y Nei y el modelo Kimura-2.

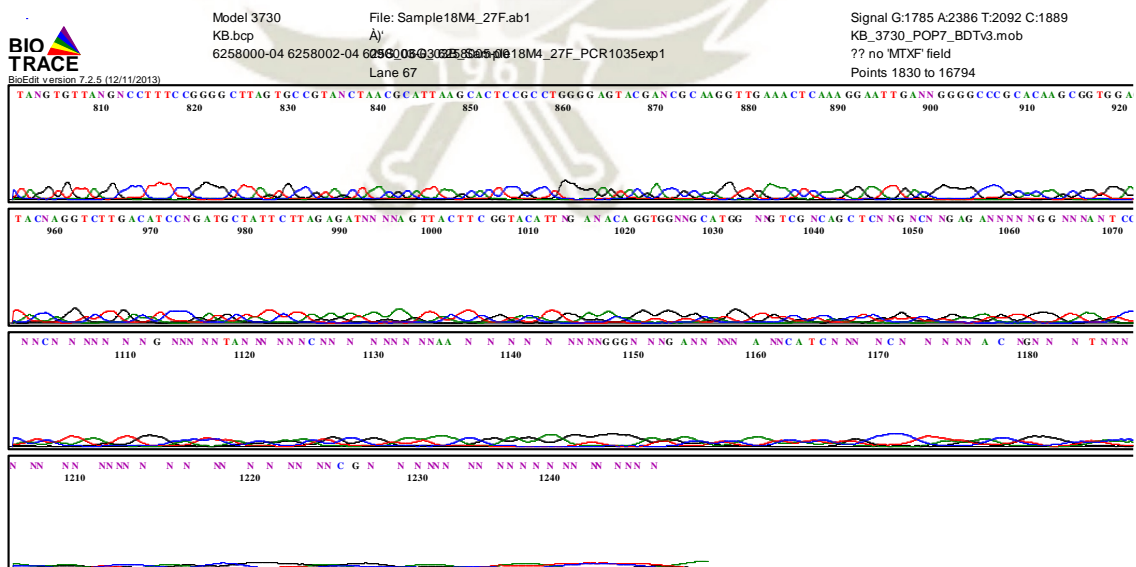
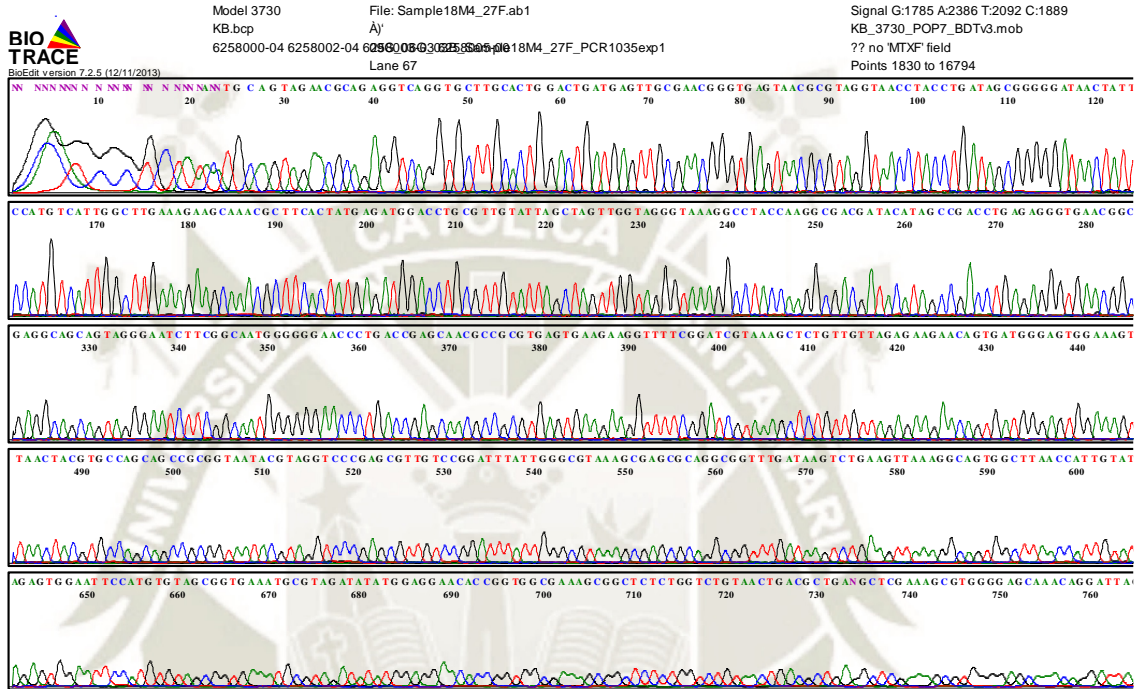


4.13. Secuencia de Cepa 18M4_27F

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNTGCAGTAGAACGCAGAGGTCAGG
TGCTTGCACCTGGACTGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGT
AACCTACCTGATAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACC
GCATAAAAGCCAATGACCCATGTCATTGGCTTGAAAGAAGCAAACGCT
TCACTATGAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGG
CCTACCAAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCGGCAATGGGGGGAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAGTGAT
GGGAGTGGAAAGTCCATCATTGACGGTAACTAACCAGAAAGGGACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAAGTCTGAA
GTAAAGGCAGTGGCTTAACCATTGTATGCTTTGGAAACTGTAAACTT
GAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAA
CTGACGCTGANGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGCTGAGTGCTANGTGTTANGNCCTTTCCG
GGGCTTAGTGCCGTANCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ANCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGANNGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCNNNAANCTTACNAGGTCTT
GACATCCNGATGCTATTCTTAGAGATNNNNAGTTACTTCGGTACATTNG
ANACAGGTGGNNGCATGGNNGTCGNCAGCTCNGNCCNNGAGANNNNN
GGNNNANTCCNNNNNNNNNGCNNNNNNNNNNNGNTANNNNNNNCNNNNN
NNGNNNNNTANNNNNNNCNNNNNNNNNNAANNNNNNNNNNGGGNNNGAN
NNNNANNCATCNNNNCNNNNNACNGNNNTNNNNNNNNNNNNANNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

4.14. Electroferograma de la cepa 18M4_27F

La muestra Nro. 4 identificada como 18M4-27F fue analizada por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer que traduce las señales fluorescentes en la secuencia de bases correspondiente.



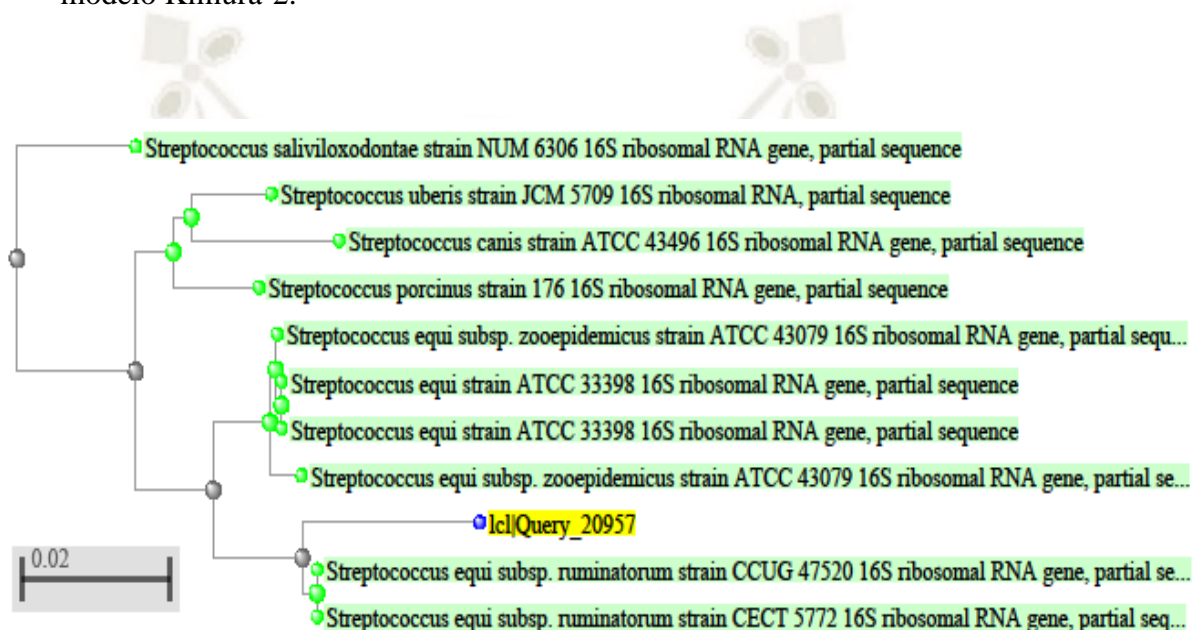
4.15. Análisis Bioinformático de la secuencia 18M4_27F

La secuencia del gen 16S ribosomal fue analizada y comparada con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank, utilizando el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) y Sequence Match. La secuencia se alineó a scores de especies significativas más altas (10 más altas), mostrando los resultados siguientes:

Description	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Ident
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> strain CCUG 47520 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1772	1772	81%	0	97%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> strain CECT 5772 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1736	1736	80%	0	97%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> strain ATCC 43079 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	79%	0	95%
<i>Streptococcus equi</i> strain ATCC 33398 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	79%	0	95%
<i>Streptococcus equi</i> strain ATCC 33398 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	79%	0	95%
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> strain ATCC 43079 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1592	1592	79%	0	95%
<i>Streptococcus uberis</i> strain JCM 5709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1495	1495	81%	0	92%
<i>Streptococcus salivoxodontae</i> strain NUM 6306 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1489	1489	81%	0	92%
<i>Streptococcus canis</i> strain ATCC 43496 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	81%	0	92%
<i>Streptococcus porcinus</i> strain 176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1474	1474	76%	0	94%

4.16. Árbol filogenético de la cepa 18M4_27F

Filogenia con las secuencias parciales del gen RNAs 16S. Se analizó el agrupamiento de las secuencias parciales del gen 16S de la Cepa en estudio 18M4-27F con las cepas que presentaron similitud según el alineamiento global mediante BLAST según Kumar y col, 2004, Chenna y col 2003; Thompson y col, 1997. La filogenia se realizó mediante el método neighbor joining por Saito y Nei y el modelo Kimura-2.



CONCLUSIONES

1. Se aislaron 04 cepas bacterianas provenientes de abscesos cervicales de cuyes de crianza familiar.
2. Se obtuvieron 04 secuencias de nucleótidos correspondientes a las 04 cepas bacterianas aisladas
3. 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 ningunas de las registradas en el Gen Bank.
4. 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*.
5. 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.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar alineaciones de cada una de las secuencias de las bacterias aisladas con la cepa de mayor identidad para determinar la similitud de posición de nucleótidos entre ellas.
2. Se recomienda realizar nuevos estudios de aislamiento de bacterias de abscesos cervicales provenientes de cuyes de diferentes zonas geográficas en Arequipa para identificar y comparar la similitud, árbol filogénico y análisis bioinformático de las cepas nuevas con las secuenciadas en el presente trabajo



BIBLIOGRAFÍA

1. **Alberts, B. Bray, D. Hopkin, K. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. y Walter, P.** (2007). *Introducción a la Biología Celular*. Buenos Aires. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
2. **Ataucusi, S.** (2015). *Manual Técnico de la Crianza de Cuyes en la Sierra del Perú*. Programa PRA Buenaventura. Perú, 1(1), 9-15. Recuperado de www.caritas.org.pe
3. **Barr, S. y Bowman, D.** (2007). *Enfermedades Infecciosas y parasitología en caninos y felinos*. Argentina: Editorial Inter-medica.
4. **Beas, C. Ortuño, D. y Armendariz, J.** (2009). *Biología Molecular Fundamentos y Aplicaciones*. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
5. **Bernard, J.** (2005). *El laboratorio en el diagnóstico clínico*. España: Editorial Marbán Libros S. L.
6. **Bilberstein, E. y Chung, Y.** (1990). *Tratado de microbiología veterinaria*. España: Editorial Acribia S.A.
7. **Brooks, G. Carroll, K. Butel, J. y Morse, S.** (2008). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México: Editorial El Manual Moderno.
8. **Chauca L.** (1997). *Producción de cuyes*. INIA. Perú.
9. **Concha D.** (2014). *Identificación de la etiología de abscesos subcutáneos (Linfadenitis) en cuyes (Cavia porcellus) en etapa de crecimiento mediante aislamiento microbiológico en la sección D2 de la Irrigación de Majes – 2013*. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
10. **Curtis, H. Barnes, N. Schnek, A. y Massarini, A.** (2008). *Biología*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
11. **Diaz, R. Gamazo, C. y Lopez, I.** (2003). *Manual Práctico de Microbiología*. Barcelona. España: Editorial Masson S.A.
12. **Devlin, T.** (2008). *Bioquímica libro de texto con aplicaciones químicas*. España: Editorial Reverté S.A. Barcelona. España: Editorial Reverté, S.A.
13. **Freifelder, D.** (2015). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*.
14. **Griffiths, A. Gelbart, W. Miller, J. y Lewontin, R.** (2000). *Genética Moderna*. España: Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.U.
15. **Herraez, A.** (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. España: Editorial Elsevier.

16. **Izquierdo, R.** (2014). *Curso de Genética Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid. España: Editorial Pirámide (Grupo Anaya S.A.)
17. **Karp, G.** (2014). *Biología Celular y Molecular Conceptos y experimentos*. D.F. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A.
18. **Koneman, E. Allen, S. Janda, W. Schreckenberger, P. y Winn, W.** (1999), *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
19. **Lodish, H. Berk, A. Kaiser, C. Krieger, M. Bretscher, A. Ploegh, H. Amon, A. y Scott, M.** (2016). *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
20. **Madigan, M. Martinko, J. y Parker, J.** (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*. España. Editorial Pearson Educación S.A.
21. **Mathews, C. Holde, K, Appling, D. y Cahill, S.** (2013). *Bioquímica*. Madrid. España: Editorial Pearson Educación S.A.
22. **Merida De La Torre, F. y Moreno, E.** (2015). *Manual para Técnico Superior de Laboratorio Clínico y Biomédico*. España: Editorial Médica Panamericana S.A.
23. **Montoya, D. Perdomo, L. Arevalo, C. Aristizabal, F. y Schwartz, W.** (1999). *Caracterización de cepas nativas de Clostridium spp por secuenciación parcial del gen ribosomal 16s rARN*. Revista Colombiana de Biotecnología. Colombia.
24. **Morales, S. y Barrios, L.** (2017). *Composición y características de la orina en cuyes (Cavia porcellus) con linfadenitis cervical*. REDVET - Revista electrónica de Veterinaria. Lima, Perú.
25. **Müller, W.** (2008). *Bioquímica Fundamentos para Medicina y Ciencias de la vida*. Barcelona. España: Editorial Reverté S. A.
26. **Murray, R. Bender, D. Botham, K. Kennelly, P. Rodwell, V. y Weil, A.** (2013). *Harper Bioquímica ilustrada*. D.F. México: Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana Editores S.A.
27. **Murray, P. Rosenthal, K. y Pfaller, M.** (2014). *Microbiología Médica*. España: Editorial Elsevier.
28. **Necochea, R. y Canul J.** (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos*. (Proyecto de Investigación). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México
29. **Nelson, D. Cox, M.** (2015). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Barcelona, España: Ediciones Omega, S. L.

30. **Pacheco, J. y Bernabé, J.** (2012). *Manual de Prácticas en Biología Celular*. Arequipa. Perú: Ediciones Universidad Católica de Santa María.
31. **Perera, J. Tormo, A. y García, J.** (2002). *Ingeniería Genética*. Madrid. España: Editorial Síntesis S.A.
32. **Pevsner, J.** (2009). *Bioinformatics and Functional Genomics*. Estados Unidos: Editorial Wiley-Blackwell.
33. **Quinn, P. Markey, B. Carter, M. Donnelly, W. y Leonard F.** (2002). *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*. España: Editorial Acribia S.A.
34. **Quispe, D.** (2012). *Identificación y caracterización molecular de secuencias homologas al T-DNA del plásmido Ti de Agrobacterium spp. Insertados en el genoma de Ipomoea batatas (L.) Lam camote y especies silvestres relacionadas*. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
35. **Renneberg, R.** (2008). *Biología para principiantes*. España: Editorial Reverté S.A.
36. **Rodwell, V. Bender, D. Botham, K. Kennelly, P. y Weil, A.** (2016). *Harper Bioquímica Ilustrada*. D.F. México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
37. **Rodicio, M.R. y Mendoza, M.C.** (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Universidad de Oviedo. España. Recuperado de www.elsevier.es
38. **Salas, R. y Scotto, C.** (2006). *Manual Universitario de Prácticas de Genética General*. Lima. Perú: Editorial Asamblea Nacional de Rectores.
39. **Salinas M.** (2002). *Crianza y comercialización de cuyes*. Perú. Editorial Colección granja y negocios. Pg. 135,106
40. **Santabárbara, J. Rubio, E. Feja, C. y Martínez, T.** (2015). *Manual de bioestadística aplicada con IBM SPSS*. Madrid. España: Editorial Andavira.
41. **Singleton, P.** (1999). *Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina*. España: Editorial Acribia S.A.
42. **Solomon, E. Berg, L. y Martin, D.** (2013). *Biología*. México: Editorial Cengage Learning Editores S.A.
43. **Solorzano, J. y Sarria, J. y Bardales, J.** (2014). *Crianza, Producción y Comercialización de Cuyes*. Lima. Perú: Editorial Macro.

44. **Stryer, L. Berg, J. y Tymoczko, J.** (2015). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Barcelona. España: Editorial Reverté S.A.
45. **Swanson, T. Kim, S. y Glucksman, M.** (2008). *Bioquímica y Biología Molecular*. España. Editorial Wolters Kluwer Health España S.A.
46. **Thompson, C. S.** (2103) *Estudio de la diversidad genética en poblaciones de Babesia bigemina de diferentes regiones geográficas* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
47. **Thieman, W. y Palladino, M.** (2010). *Introducción a la biotecnología*. España: Editorial Pearson Educación S.A.
48. **Vadillo, S. Piriz, S. y Mateos, E.** (2002). *Manual de Microbiología Veterinaria*. España. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U.
49. **Voet, D. Voet, J. y Pratt, C.** (2016). *Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular*. CDMX. México: Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.
50. **Villiers, E. y Blackwood, L.** (2009). *Manuel de diagnóstico de laboratorio en pequeños animales*. España. Editorial Ediciones S.
51. **Watson, J. Baker, T. Bell, S. Gann, A. Levine, M. y Losick, R.** (2016). *Biología Molecular del Gen*. D.F. México: Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V.

ANEXOS

Imagen 2: Especímenes para la necropsia



Especimen 1



Especimen 2



Especimen 3



Especimen 4

Imagen 3: Recolección de la muestra



Imagen 4: Aislamiento del agente etiológico causante de linfadenitis cervical de los
cuyes

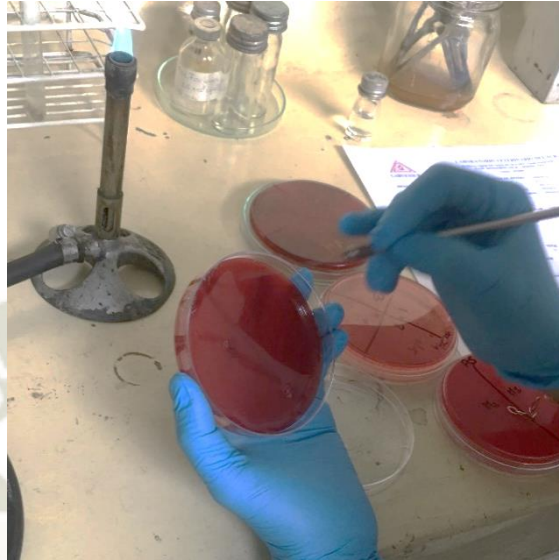


Imagen 5: Cámara de flujo laminar para el procedimiento de extracción del ADN



Imagen 6: Inoculación de la colonia de bacterias



Imagen 7: Vortex, homogenizador de muestra.



Imagen 8: Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico,



Imagen 9: Isopropanol



Imagen 10: Temp-blok module heater



Imagen 11: Equipo de Electroforesis



Imagen 12: Centrifuga



Imagen 13: Primers o cebadores

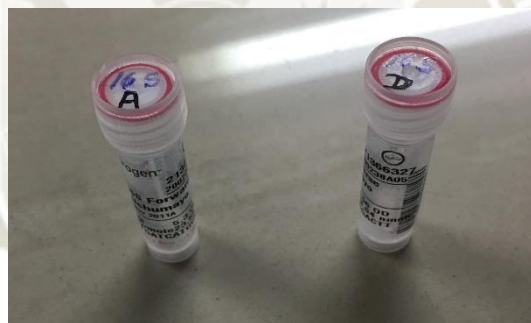


Imagen 14: Supermix



Imagen 15: Termociclador para la amplificación de ADN (PCR)

