

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**“Estandarización de una prueba basada en PCR-RFLP del
gen *HMTp210* para la tipificación molecular de
Avibacterium paragallinarum”**

**Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en
Biotecnología**

Autor:

Bach. Velásquez Colque, Bryan Oliver

Asesor:

M. Ss. Sandoval Peña, Gustavo Adolfo

**Nuevo Chimbote - Perú
2023**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Estandarización de una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210*
para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum***

**TESIS PARA OPTENER EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Asesor

M.Sc. Gustavo Sandoval Peña

DNI: 41020762

ID ORCID: 0000-0002-8392-9880

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

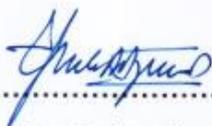


Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador



Dr. Willian Capa Robles
PRESIDENTE

DNI: 32969285
ID ORCID: 0000-0003-3402-613X



Dr. Carlos Azañero Díaz
SECRETARIO

DNI: 18093785
ID ORCID: 0000-0002.56124104



M. Sc. Gustavo Sandoval Peña
INTEGRANTE

DNI: 41020762
ID ORCID: 0000-0002-8392-9880

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el
Aula de posgrado de la UNI....., siendo las 11..... horas del
día 03/03/2023....., dando cumplimiento a la Resolución N°
071-2023-UNS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. William
Copa Robles....., teniendo como miembros a Dr. Carlos Arañero
Díaz..... (secretario) (a), y Mg. Gustavo Sandoval Peña (integrante),
para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Licenciado en Biotecnología
realizado por el, (la), (los) tesista (as).....
Bryan Oliver Velásquez Colque....., quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

Estandarización de una prueba basada en PCR-RFLP
del gen HmTP210 para la tipificación molecular
de la bacteria Avibacterium paragallinarum

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas
por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y
sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como
Excelente..... asignándole un calificativo de 19..... puntos, según
artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-
R-UNS)

Siendo las 12:30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando
los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: Dr. William Copa Robles
Presidente


Nombre: Dr. Carlos Arañero Díaz
Secretario


Nombre: Mg. GUSTAVO ADOQUE
SANDOVAL PEÑA
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).



DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza para seguir día a día y poner en mi camino a personas que han sido soporte y compañía.

A mis padres y hermanos, por apoyarme en todo momento y ser mi mayor fuente inspiración y superación.

A mi esposa Jhazmin, por su amor incondicional y compartir numerosas alegrías conmigo.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor y mentor, M. Sc. Gustavo Sandoval, quien siempre estuvo aconsejándome, apoyándome y animándome durante la realización de esta investigación.

A mi coasesora, Milagros Zavaleta, por compartir su enorme experiencia y guía para la realización de este trabajo.

A Luis Saravia y Aldo Flores por su confianza, apoyo y la oportunidad de formar parte del gran equipo de trabajo de BTS Consultores.

A mis profesores de la carrera profesional por su incalculable aporte en mi formación.

A todos mis compañeros investigadores de BTS Consultores y del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM, por su amistad, ayuda desinteresada y los gratos momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio.

A mi familia por todo su cariño, comprensión e impulsarme a seguir adelante.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema.....	3
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Justificación.....	4
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Tipificación molecular de patógenos.....	5
2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	5
2.1.1.1 Estandarización de la PCR.....	7
2.1.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	8
2.1.2.1. Enzimas de restricción.....	9
2.1.2.2. Perfil de restricción.....	10
2.1.3. Electroforesis en gel agarosa.....	10
2.2. La industria avícola en el Perú.....	11
2.3. Coriza infecciosa.....	11
2.3.1. <i>Avibacterium paragallinarum</i>	12
2.3.1.1. Clasificación taxonómica.....	13
2.3.1.2. Caracterización de <i>A. paragallinarum</i>	13
2.3.1.3. Gen HMTp210.....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Materiales.....	15
3.1.1. Cepas de <i>A. paragallinarum</i>	15
3.1.2. Controles positivos.....	16

3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Reactivación de las cepas de <i>A. paragallinarum</i>	18
3.2.2. Análisis bioinformático.....	19
3.2.2.1. Selección de secuencias nucleotídicas	19
3.2.2.2. Diseño de cebadores.....	19
3.2.2.3. Perfiles de restricción.....	19
3.2.3. Extracción de ADN genómico de las cepas de <i>A. paragallinarum</i>	20
3.2.4. Detección molecular de <i>A. paragallinarum</i>	21
3.2.5. Estandarización de prueba de PCR.....	22
3.2.6. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	23
3.2.7. Análisis de los perfiles de restricción y tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. Análisis bioinformático.....	25
4.1.1. Selección y diseño de cebadores.....	25
4.1.2. Perfil de restricción.....	27
4.2. Extracción de ADN genómico de <i>A. paragallinarum</i>	30
4.3. Detección molecular de <i>A. paragallinarum</i>	31
4.4. Estandarización de PCR de tipificación.....	32
4.5. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	37
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES	42
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
VIII. ANEXOS	48

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema de presentación de la PCR.....	6
FIGURA 2. Nomenclatura de una enzima de restricción.....	9
FIGURA 3. Descripción de enzimas de restricción más comunes.....	9
FIGURA 4. Perfiles de restricción para 4 cepas distintas de <i>E. coli</i>	10
FIGURA 5. Regiones del gen <i>HMTp210</i>	13
FIGURA 6. Controles positivos basados en el vector de clonación puC57, con secuencias parciales de las cepas de referencia de <i>A. paragallinarum</i>	17
FIGURA 7. Preparación de medio infusión de cerebro-corazón (caldo BHI)	18
FIGURA 8. Células de <i>A. paragallinarum</i> previo a la extracción del ADN genómico.....	19
FIGURA 9. Regiones consenso en el alineamiento múltiple de la región 2 del gen <i>HMTp210</i>	25
FIGURA 10. Perfiles de restricción para la tipificación molecular de <i>A. paragallinarum</i> según el esquema de Kume, en el programa SnapGene 5.0.4...	29
FIGURA 11. Amplificación del gen <i>HPG-2</i> para la detección molecular de <i>A. paragallinarum</i>	32
FIGURA 12. Límite de detección para la amplificación de la región 2 de gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i>	33
FIGURA 13. Gradiente (rango amplio) de temperatura de alineamiento para la amplificación de la región 2 de gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i>	34
FIGURA 14. Gradiente (rango corto) de temperatura de alineamiento para la amplificación de la región 2 de gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i>	35
FIGURA 15. Gradiente de concentraciones de cebadores para la amplificación de la región 2 de gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i>	36
FIGURA 16. Productos de amplificación (controles) de la región 2 de gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i> de PCR estandarizada.....	36
FIGURA 17. Productos de amplificación (muestras) de la región 2 de gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i>	37
FIGURA 18. Prueba RFLP de los controles sintéticos (CS1 al CS5) para la tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	37
FIGURA 19. Prueba RFLP de los controles sintéticos (CS6 al CS9) para la tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	38

FIGURA 20. Prueba RFLP de las cepas de referencia (1 al 5) para la tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	38
FIGURA 21. Prueba RFLP de las cepas de referencia (6 al 10) para la tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	39
FIGURA 22. Prueba RFLP de las cepas de referencia (10 al 13) para la tipificación de <i>A. paragallinarum</i>	39

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cepas de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	15
TABLA 2. Controles sintéticos utilizados, según el esquema de Kume.....	16
TABLA 3. Secuencia de los cebadores para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>HPG-2</i>	22
TABLA 4. Preparación del mix de digestión enzimática.....	24
TABLA 5. Condiciones para la prueba RFLP.....	24
TABLA 6. Propiedades termodinámicas de cebadores Fb y Rb, específicos para la región 2 del gen <i>HMTp210</i> de <i>A. paragallinarum</i>	26
TABLA 7. Tamaños de secuencias obtenidos mediante PCR a la región 2 del gen <i>HMTp210</i> de nueve cepas de referencia de <i>A. paragallinarum</i>	27
TABLA 8. Requisitos para la selección de enzimas de restricción <i>BtgI</i> , <i>BtgZI</i> y <i>KasI</i>	28
TABLA 9. Características de los perfiles de restricción para <i>A. paragallinarum</i> , clasificados según el esquema de Kume.....	30
TABLA 10. Concentración de ADN genómico de cepas de <i>A. paragallinarum</i>	31
TABLA 11. Concentración (número de copias de ADN por microlitro) de controles positivos.....	32
TABLA 12. Tipificación molecular de cepas de <i>A. paragallinarum</i> , según el esquema de Kume.....	40

RESUMEN

Avibacterium paragallinarum es el agente etiológico de la coriza infecciosa en pollos y gallinas (*Gallus gallus*) y está clasificado serológicamente en 3 serogrupos y 9 serotipos, mediante la prueba de inhibición de la aglutinación. Debido a que la coriza infecciosa genera pérdidas económicas por retraso del crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad respiratoria crónica complicada, es de importancia desarrollar una prueba molecular que permita tipificar con precisión y rapidez a *A. paragallinarum*, teniendo como objetivo de esta investigación estandarizar una prueba basada en PCR-RFLP para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum*. Por medio del análisis bioinformático, se diseñaron un conjunto de cebadores que amplificaron un producto de 1,5 kb de la región 2 del gen *HMTp210*, específicos a las cepas de referencia de *A. paragallinarum*; posteriormente, se seleccionaron las enzimas de restricción *BtgI*, *BtgZI* y *KasI* para la prueba RFLP y finalmente se seleccionaron los perfiles de restricción. Mediante la estandarización de la PCR se determinó que el límite de detección fue de 10^3 copias/ μ l, la temperatura de alineamiento óptima fue de 58 °C y la concentración de cebadores ideal se estimó en 0.1 μ M. Se evaluaron nueve controles sintéticos y trece cepas bacterianas de *A. paragallinarum* donde se obtuvo perfiles de restricción únicos para cada variedad de *A. paragallinarum* y donde de las trece cepas se identificaron tres del tipo B-1, dos del tipo A-1, dos del tipo C-1 y uno de los seis tipos restantes. En conclusión, la PCR-RFLP utilizando la región 2 del gen *HTMp210* es un método alternativo que permite identificar los tipos de *A. paragallinarum* y presenta múltiples ventajas respecto a las pruebas convencionales.

Palabras clave: estandarización, tipificación molecular, *Avibacterium paragallinarum*, coriza infecciosa, HTMp210, PCR, RFLP.

ABSTRACT

Avibacterium paragallinarum is the etiologic agent of infectious coryza in chickens (*Gallus gallus*) and it is classified in 3 serogroups and 9 serotypes through the agglutination inhibition test. Because infectious coryza generates economic losses due to growth retardation, weight loss, increased number of birds culled, and predisposition to complicated chronic respiratory disease, it is important to develop a molecular test that allows for accurate and rapid typing of *A. paragallinarum*. The objective of this research was to standardize a test based on PCR-RFLP for the molecular typing of *Avibacterium paragallinarum*. Through the bioinformatic analysis, a set of primers were designed to amplify a 1500 bp product from region 2 of the *HMTp210* gene and were specific to the reference strains of *A. paragallinarum*; additionally, the enzymes *BtgI*, *BtgZI* and *KasI* were also chosen for the RFLP test and subsequent definition of restriction profiles. Through PCR standardization, a concentration of 10^3 copies / μl was defined as the detection limit, the optimum alignment temperature was 58 °C and it was estimated at 0.1 μM at the ideal concentration of primers. The RFLP test was performed to nine synthetic controls and thirteen strains of *A. paragallinarum* where nine unique restriction profiles were obtained for each type of *A. paragallinarum* and where of the thirteen strains were identified, three of B-1, two of type A-1, two of type C-1 and one of the six remaining types. In conclusion, the PCR-RFLP using region 2 of the *HTMp210* gene is an alternative method that allows identifying the types of *A. paragallinarum* and presents multiple advantages over conventional tests.

Keywords: standardization, molecular typing, *Avibacterium paragallinarum*, infectious coryza, *HTMp210*, PCR, RFLP.

I. INTRODUCCION

Avibacterium paragallinarum, miembro de la familia *Pasteurellaceae*, es el agente etiológico de la coriza infecciosa en pollos y gallinas (*Gallus gallus*). Esta enfermedad causa signos clínicos como secreción nasal y ocular, barbillas hinchadas, hinchazón facial, retraso del crecimiento y lesiones histológicas. Esto genera grandes pérdidas económicas que van desde el retraso del crecimiento en las aves de carne junto a la caída en la producción de huevos (hasta 40%) (Blackall & Soriano-Vargas, 2017). Calderón *et al.* (2010) reportaron un brote de coriza infecciosa en reproductores pesados de Panamá con hasta 45% de disminución en la producción de huevo.

A. paragallinarum es clasificado tradicionalmente mediante 2 esquemas: el esquema de Page, que divide a las cepas de *A. paragallinarum* en 3 serogrupos (A, B y C) (Page, 1962) y el esquema propuesto por Kume *et al.* (1983) y Blackall *et al.* (1990b) que reconoce 9 serotipos (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4). Para la identificación o tipificación de *A. paragallinarum* bajo cualquiera de los 2 esquemas se debe realizar una prueba de inhibición de la hemaglutinación, y para ello se requiere la producción de anticuerpos específicos para cada uno de los serotipos de *A. paragallinarum*, así como un panel de eritrocitos fijados, lo que complica el procedimiento (Sakamoto *et al.*, 2012) y limita la capacidad de tipificación a unos pocos laboratorios en todo el mundo (Blackall & Soriano-Vargas, 2017).

Se han desarrollado exitosamente pruebas de tipificación basadas en PCR para otros patógenos bacterianos miembros de la familia *Pasteurellae*, como *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Turni *et al.*, 2014), *Haemophilus influenzae* (Wroblewski *et al.*, 2013), *Pasteurella multocida* (Harper *et al.*, 2015); sin embargo, aún no se ha reportado una prueba de tipificación exitosa basada en PCR para *A. paragallinarum*. Los métodos moleculares más utilizados para el diagnóstico son los basados en PCR, secuenciación del genoma completo o parcial, microarrays, RFLP, entre otros (Krishna & Cunnion, 2012); garantizando resultados rápidos y eficaces. Chen *et al.* (1998) reportaron una prueba de PCR para la detección de un fragmento de 0.5 kb del gen *HPG2* de *A. paragallinarum* mientras que Soriano *et al.* (2004) desarrollaron una prueba

de PCR basado en el análisis de regiones consenso intergénicas (ERIC-PCR) para la tipificación, sin embargo, esta prueba demostró una alta variabilidad entre patrones incluso dentro de un mismo grupo.

Whang *et al.* (2016) indicaron que el gen *HMTp210*, que codifica una proteína importante en la patogenicidad del agente bacteriano, puede ser útil como marcador molecular para la tipificación molecular de *A. paragallinarum*, aunque sugieren que deben realizarse más ensayos. En concordancia con lo anterior, Sakamoto *et al.* (2012) indica que el gen *HMTp210* está dividido en 3 regiones, donde la región 2 es hipervariable y parece ser específica entre variedades del mismo grupo.

Sakamoto *et al.* (2012) desarrollaron dos pruebas de PCR, una basada en PCR-múltiple y otra basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210*, para la tipificación de aislamientos de *A. paragallinarum*; en ambas pruebas se utilizaron cepas de referencia para el grupo A (221, 083, W, Georgia); para el grupo B (Spross y 0222) y para el grupo C (53-47, Modesto y HK-1). Además, para la prueba PCR-RFLP se utilizó la enzima de restricción *BglII* para la digestión enzimática. Estudios posteriores realizados por Morales Erasto *et al.* (2014) y Whang *et al.* (2016) demostraron inconsistencias en los resultados de ambas pruebas, ya que al aumentar el número de aislamientos bacterianos se observó que los resultados no se asemejaban a los obtenidos mediante el esquema de Page por la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

En el Perú y en el mundo, la tipificación molecular de cepas de *A. paragallinarum* está limitada a pocos laboratorios y la metodología estándar es la prueba de inhibición de la hemaglutinación (Blackall & Soriano-Vargas, 2017).

En base a lo anteriormente mencionado, en este trabajo de investigación se desarrolló y estandarizó una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210* para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum*.

1.1. PROBLEMA

¿Es posible que mediante la estandarización de una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210* se pueda tipificar molecularmente *Avibacterium paragallinarum*?

1.2. HIPOTESIS

Mediante la estandarización de una prueba basada PCR-RFLP del gen *HMTp210* se podrá tipificar a nivel molecular a *Avibacterium paragallinarum*

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- Estandarizar una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210* para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum*

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer el límite de detección de una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210* para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum*.
- Determinar la temperatura de alineamiento óptima de una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210* para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum*.
- Encontrar la concentración ideal de cebadores de una prueba basada en PCR-RFLP del gen *HMTp210* para la tipificación molecular de *Avibacterium paragallinarum*.
- Diseñar cebadores específicos para la región 2 del gen *HMTp210*.
- Generar los perfiles de restricción para tipificar *Avibacterium paragallinarum* según el esquema de Kume.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Se han reportado estudios donde se han desarrollado con éxito pruebas basadas en PCR para el diagnóstico de *A. paragallinarum* (Chen *et al.*;1998), sin embargo Soriano *et al.* (2004) sugieren que también es muy importante la validación de pruebas que permitan la tipificación molecular de *A. paragallinarum*, ya que la principal estrategia preventiva para evitar brotes de coriza infecciosa es el uso de vacunas comerciales, para lo cual es necesario conocer el serogrupo o serotipo del aislado, con el fin de lograr una protección adecuada (Morales-Erasto *et al.*, 2014). Hasta la fecha, la mayoría de pruebas moleculares tales como el análisis de endonucleasas de restricción del ADN (Blackall *et al.*,1990a), la ribotipificación (Miflin *et al.*,1997), ERIC-PCR (Soriano *et al.*; 2004), secuenciación del gen 16S (rRNA) (Christensen *et al.*;2009, Anjaneya *et al.*;2014), no han tenido éxito en la búsqueda de obtener una prueba que permita la tipificación molecular de *A. paragallinarum* manera precisa y eficaz. Los estudios más recientes sugieren el uso de la secuencia del gen *HMTp210* como marcador molecular para la tipificación molecular de *A. paragallinarum* bajo los esquemas de Kume y Page. Se han diseñado pruebas PCR- RFLP (Sakamoto *et al.*, 2012) y PCR-multiplex (Sakamoto *et al.*, 2012), sin embargo, se han presentado inconsistencias cuando se han trabajado con una mayor cantidad de aislados bacterianos y se han reportado una baja especificidad y sensibilidad de dichas pruebas (Morales-Erasto *et al.*, 2014).

En resumen, hasta la fecha no se ha reportado una prueba basada en PCR capaz de identificar independientemente cada uno de los tipos de *Avibacterium paragallinarum*.

II. MARCO TEORICO

2.1. Tipificación molecular de patógenos

La tipificación de patógenos se clasifica tradicionalmente en fenotípica (se basa en características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos), serológica (respuesta antígeno - anticuerpo) y molecular (basadas en el estudio del ADN). Según Fernández *et. al.* (2013), las técnicas moleculares de tipificación se diferencian de las otras técnicas porque pueden aplicarse a un mayor número de especies microbianas, tienen mayor poder de tipificación, son más reproducibles y tienen mayor poder de discriminación.

Los métodos de tipificación molecular se pueden clasificar en 3 grandes grupos: a) basadas en amplificación de secuencias de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), b) basadas en el estudio de perfiles de restricción de ADN y c) basadas en la secuenciación parcial de genes (Fernández *et. al.*, 2013).

2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que logra la amplificación de una región específica de ADN, generando millones de copias de esa secuencia (amplicón) en pocas horas (Mullis *et al.* 1986).

Cada ensayo de PCR consta de 3 etapas (Fig. 1) a un tiempo y temperatura diferente: desnaturalización, alineamiento y extensión, los cuales se repiten consecutivamente alrededor de 30 veces hasta obtener el producto deseado. La PCR requiere la presencia de ADN molde, cebadores, nucleótidos y una enzima ADN-polimerasa. La ADN-polimerasa es la enzima clave que une nucleótidos individuales para formar el producto de PCR. Los nucleótidos incluyen las cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C, G) que se encuentran en el ADN. Estos actúan como los bloques de construcción que utiliza la ADN polimerasa para crear el producto de PCR resultante. Los cebadores en la reacción especifican el producto de ADN exacto a amplificar. Los cebadores son fragmentos cortos de ADN con una secuencia complementaria definida para el ADN objetivo que se va a detectar y

amplificar. Estos sirven como un punto de extensión para que se desarrolle la ADN polimerasa (Garibyan y Avashia, 2013).

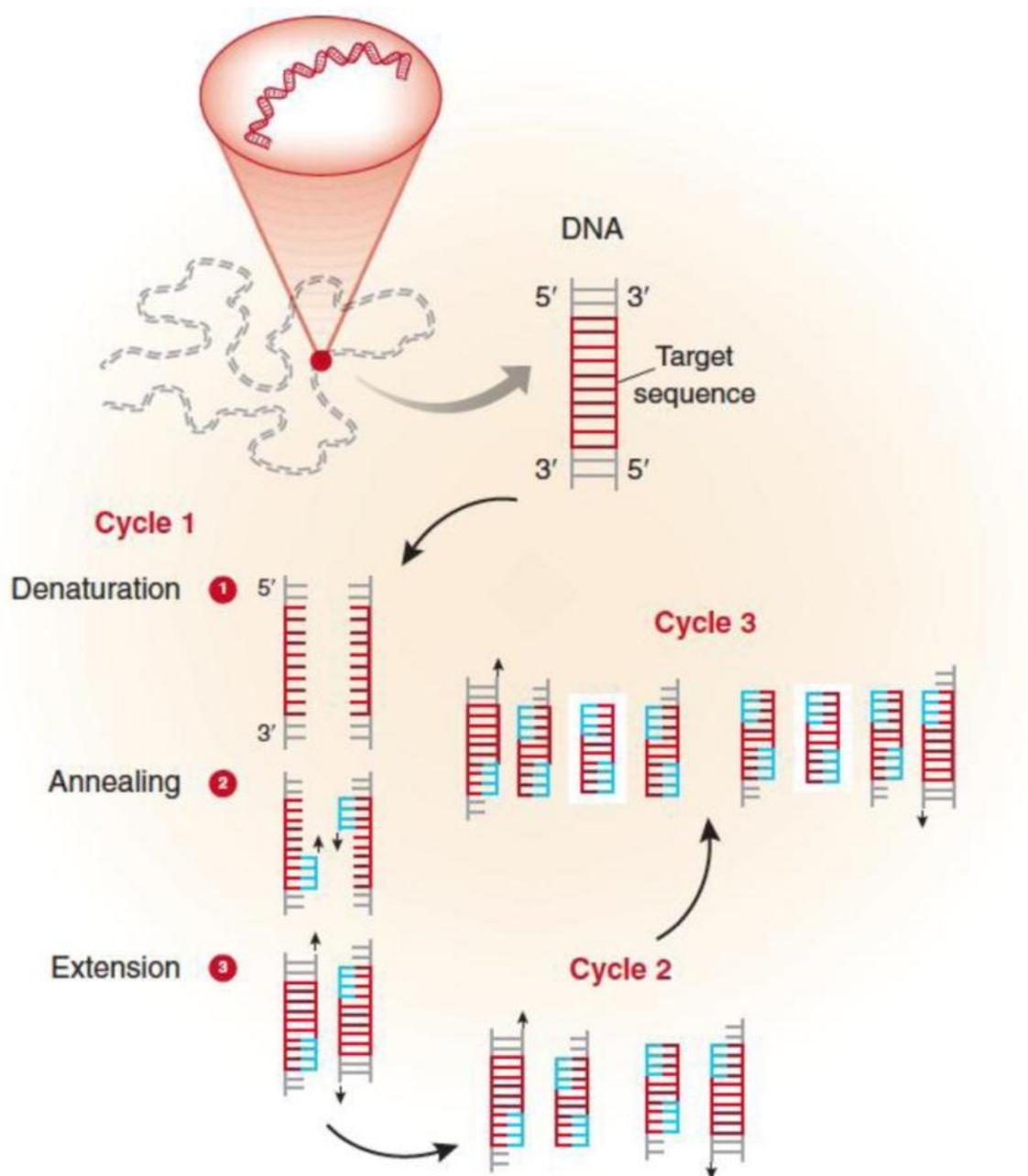


Figura 1. Esquema de presentación de la PCR (Garibyan y Avashia, 2013)

El uso potencial de esta técnica para el diagnóstico y la tipificación de patógenos es implícito, ya que permite la detección de cantidades mínimas de ADN molde. La prueba puede basarse en la presencia del amplicón y su tamaño particular o en la secuencia específica, que puede determinarse por secuenciación. Por ejemplo la PCR en punto final es usada rutinariamente para la detección e identificación de agentes

infecciosos específicos desde cultivo o directamente de muestra clínica (Kourkoumpetis *et al.* 2012).

Existen diversas variantes de la técnica de PCR, como PCR múltiple, anidada o PCR cuantitativa en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real permite tanto la detección como la cuantificación del producto de PCR en tiempo real, mientras se van sintetizando (Van Guilder *et. al.*, 2008).

Hay dos métodos comunes utilizados para la detección y cuantificación del amplicón: (1) el uso de tintes fluorescentes que se intercalan con el ADN bicatenario (por ejemplo SYBR Green) y (2) el uso sondas de ADN específicas de secuencia que consisten en informes marcados con fluorescencia. La ventaja de la PCR en tiempo real es la cuantificación del gen deseado durante la amplificación exponencial sin necesidad de un análisis después de la finalización del ciclo de PCR final, mientras que la principal desventaja es el alto costo del equipo.

En síntesis, la PCR es una técnica simple de entender y usar, y resulta rápidamente (Bologna *et. al.*, 2008). Es una técnica altamente sensible con el potencial de producir millones a miles de millones de copias de un producto específico para secuenciación, clonación y análisis. Sin embargo, aunque la PCR es una técnica valiosa, tiene limitaciones. Debido a que la PCR es una técnica altamente sensible, cualquier forma de contaminación de la muestra incluso por pequeñas cantidades de ADN. (Bologna *et al*, 2008; Smith y Osborn, 2009).

2.1.1.1. Estandarización de la PCR

Diferentes estudios han demostrado que la especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR está influenciada por los diversos componentes que integran la técnica: 1. mezcla de reacción, 2. régimen de ciclaje y 3. ADN polimerasa. Por ello, según Bolívar, Rojas y García (2014) resulta necesario planificar en cada caso una metodología para encontrar un equilibrio entre algunas condiciones para lograr la mayor especificidad y un alto rendimiento.

Algunos parámetros que influyen en la PCR son la concentración de dNTPs generalmente de 0,2 a 1mM (Rodríguez y Barrera, 2013), concentración y diseño de cebadores ya que un inadecuado diseño produce “dímeros de primers” que provoca a su vez un menor rendimiento del amplicón de interés (Rodríguez y Barrera, 2013; Cha y Thilly, 1997) y concentración de Mg²⁺ ya que concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento mientras que un exceso genera amplificaciones inespecíficas (Sint, Raso y Traugott, 2012); aunque Rochelle, De Leon, Stewart y Wolfe (1997) indican que las alteraciones en las concentraciones de MgCl₂ y dNTPs usualmente influyen poco en la mejoría de sensibilidad o especificidad de la prueba.

Además, debe considerarse la temperatura de alineamiento ya que el alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de sus bases y oscila entre 40 y 70°C (Bolívar, Rojas y García; 2014). Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que reduce el número de uniones incorrectas entre los cebadores y sitios apócrifos del ADN molde (Guevara, 2004; Espinoza, 2007).

2.1.2. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

El polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) es una de las técnicas útiles para estudiar la diversidad microbiana y es utilizada generalmente para la tipificación molecular de patógenos aprovechando el hecho de que las diferencias entre diversas secuencias se pueden identificar después de la digestión con endonucleasas de restricción específicas de secuencia (Gabaldon y OPATHY Consortium, 2019). Usualmente, la RFLP se utiliza en combinación con una PCR después de la generación de los amplicones deseados.

2.1.2.1 Enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción también denominadas nucleasas de restricción o endonucleasas de restricción, fueron descubiertas como enzimas propias de distintas bacterias y actualmente se dispone comercialmente de un gran número de ellas con elevada especificidad, estabilidad y

pureza. Su nomenclatura consta de tres letras (Fig. 2) tomadas del género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente (en ocasiones seguidas por una letra más, que identifica el serotipo), y por un número romano que las identifica cuando en una misma variante se hayan encontrado varias enzimas con distinta especificidad (Herraez, 2012)



Figura 2. Nomenclatura de las enzimas de restricción *HaeIII*, *EcoRI* y *BamHI*

Su importancia radica en su capacidad de reconocer ciertas secuencias en específico, conocido como sitio de restricción, donde genera una escisión dejando dos nuevos segmentos de ADN con extremos romos o cohesivos, tal como se describe en la Figura 3.

Nombre de la enzima	Bacteria de origen	(N = cualquier nucleótido)	Tipo de extremos	Productos resultantes de la escisión		
<i>Acc 65I</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus 65</i>	-G/G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G\G-	Cohesivos, saliente 5'	-G -C-C-A-T-Gp	★	pG-T-A-C-C- G-
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	-A-G/C-T- -T-C\G-A-	Romos	-A-G -T-Cp		pC-T- G-A-
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	-G/G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G\G-	Cohesivos, saliente 5'	-G -C-C-T-A-Gp	★	pG-A-T-C-C- G-
<i>Bgl II</i>	<i>Bacillus globigii</i>	-A/G-A-T-C-T- -T-C-T-A-G\A-	Cohesivos, saliente 5'	-A -T-C-T-A-Gp	★	pG-A-T-C-T- A-
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli RY13</i>	-G/A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A\G-	cohesivos, saliente 5'	-G -C-T-T-A- Ap		pA-A-T-T-C- G-
<i>Hae III</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	-G-G/C-C- -C-C\G-G-	Romos	-G-G -C-Cp		pC-C- G-G-
<i>Hin dIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	-A/A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A\A-	Cohesivos, saliente 5'	-A -T-T-C-G- Ap		pA-G-C-T-T- A-
<i>Kpn I</i>	<i>Klebsiella pneumoniae OK8</i>	-G-G-T-A-C/C- -C\C-A-T-G-G-	Cohesivos, saliente 3'	-G-G-T-A-C -Cp	★	pC- C-A-T-G-G-
<i>Mbo I</i>	<i>Moraxella bovis</i>	-N/G-A-T-C-N- -N-C-T-A-G\N-	Cohesivos, saliente 5'	-N -N-C-T-A-Gp	★★	pG-A-T-C-N- N-
<i>Not I</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	-G-C/G-G-C-C-G-C- -C-G-C-C-G-G\C-G-	Cohesivos, saliente 5'	-G-C -C-G-C-C-G-Gp		pG-G-C-C-G-C- C-G-
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuartii</i>	-C-T-G-C-A/G- -G\A-C-G-T-C-	Cohesivos, saliente 3'	-C-T-G-C-A -Gp		pG- A-C-G-T-C-
<i>Pvu I</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	-C-G-A-T/C-G- -G-C\T-A-G-C-	Cohesivos, saliente 3'	-C-G-A-T -G-Cp		pC-G- T-A-G-C-
<i>Pvu II</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	-C-A-G/C-T-G- -G-T-C\G-A-C-	Romos	-C-A-G -G-T-Cp		pC-T-G- G-A-C-

Figura 3. Descripción de enzimas de restricción más comunes

2.1.2.2 Perfil de restricción

La técnica de RFLP fue desarrollada por Botstein *et al.* (1980), y fue descrita como el corte de ADN molde con una enzima de restricción, donde los fragmentos resultantes serán separados por tamaño en un gel de agarosa.

Un perfil de restricción es la comparación del número y tamaño de los fragmentos resultantes luego de la aplicación de enzimas de restricción, el cual será distinto dependiendo de la cepa evaluada (Fig. 4).

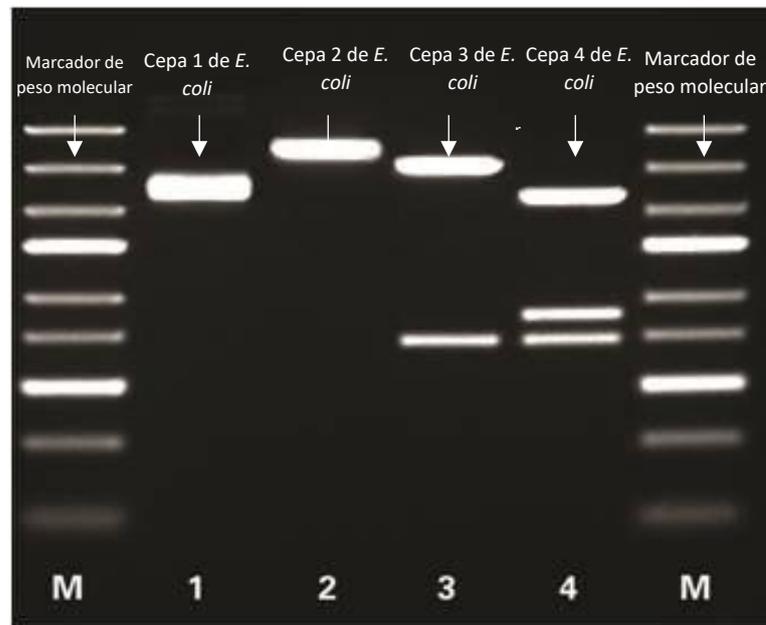


Figura 4. Ejemplo de perfiles de restricción para 4 cepas distintas de *E. coli*

2.1.3. Electroforesis en gel de agarosa

Muchos de las metodologías utilizadas para la tipificación molecular basadas en PCR, requieren un paso posterior que permita la visualización del producto de la PCR.

El método más utilizado para analizar el producto de una PCR es la electroforesis en gel de agarosa, el cual separa los productos de ADN en función del tamaño y carga. La electroforesis en gel de agarosa permite la determinación de la presencia y el tamaño del producto de PCR, mediante un conjunto predeterminado de productos de ADN con tamaños conocidos se ejecuta simultáneamente en el gel como marcadores moleculares

estandarizados para ayudar a determinar el tamaño del producto (Garibyan y Avashia, 2013).

2.2. La industria avícola en el Perú

La industria avícola representa un 24.5 % de la producción agropecuaria en el país y se enfoca principalmente en la producción de carne y huevos (MINAGRI, 2018). Se estima que el consumo per capita de carne de pollo a nivel nacional es de 49,5 kg/hab./año y que el crecimiento anual del sector en 2018 fue de 5.4% (MINAGRI, 2018). Las perspectivas de crecimiento de la industria avícola Nacional presentan una tendencia positiva en los últimos años, desde el 2014 hasta el 2018 se registró que la producción aumento en promedio alrededor de 50 millones de unidades por año (Industria Avícola, 2018)

La industria avícola nacional y en países vecinos si bien presentan un crecimiento sostenido en el tiempo, puede verse afectada drásticamente debido a que los factores de estrés y potenciales patógenos -como *Salmonella sp.*, virus de bronquitis infecciosa (IBV), el virus de Newcastle (NDV) o *A. paragallinarum* - asociados a las malas condiciones de almacenamiento de las aves pueden facilitar la ocurrencia de brotes más severos (Blackall & Soriano-Vargas, 2017).

2.3. Coriza infecciosa

La coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda de los pollos causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum* (Blackall *et. al.*, 2005), y se caracteriza por la presencia de signos clínicos como catarro nasal, resfrío, rinitis, conjuntivitis y edema con hinchazón facial (Yamamoto, 1977). En ocasiones se presenta un síndrome similar a la cabeza hinchado asociado a *A. paragallinarum* en pollos de engorde en ausencia de pneumovirus aviar, pero en presencia de otros patógenos bacterianos como *M. synoviae* y *M. gallisepticum* (Droual *et. al.*, 1990; Sandoval, Terzolo y Blackall, 1994). También, se ha informado de artritis y septicemia en parvadas de engorde y ponedoras, en las que la presencia de otros patógenos agrava la enfermedad (Sandoval, Terzolo y Blackall, 1994).

El principal reservorio de la infección son las aves portadoras crónicas (Blackall, 1990), la coriza infecciosa parece ocurrir con mayor frecuencia en otoño e

invierno, aunque dichos patrones estacionales pueden ser coincidentes con las prácticas de manejo (por ejemplo, la introducción de pollitas de reemplazo susceptibles en las granjas donde está presente la enfermedad) (Clark y Godfrey, 1967). La coriza infecciosa generalmente se caracteriza por baja mortalidad y alta morbilidad aunque las variaciones en la edad y la raza pueden influir en el cuadro clínico (Blackall, 1983), además, algunos factores como la mala vivienda, el parasitismo y la nutrición inadecuada pueden aumentar la gravedad y la duración de la enfermedad. Un factor que aumenta la tasa de mortalidad es la asociación con otras enfermedades como la viruela aviar, la bronquitis infecciosa, la laringotraqueitis infecciosa, la infección por *M. gallisepticum* y la pasteurelosis (Sandoval, Terzolo y Blackall, 1994; Yamamoto, 1972).

En la actualidad, el método preventivo más utilizado son las vacunas comerciales, que están ampliamente disponibles (Blackall, 1995). Las vacunas generalmente se inyectan en pollos de entre 3 y 4 semanas antes de un brote natural esperado. Cuando se administra a aves de crecimiento, estas reducen las pérdidas por enfermedad respiratoria complicada. Tanto las rutas subcutáneas como las intramusculares son efectivas (Blackall y Reid, 1987; Davis, Rimler y Shotts, 1976; Matsumoto y Yamamoto, 1975). El tratamiento utilizado contra la coriza infecciosa generalmente es la aplicación de antibióticos, en especial diversas sulfonamidas (Blackall, Matsumoto y Yamamoto, 1997)

2.3.1. *Avibacterium paragallinarum*

A. paragallinarum es una bacteria gram negativa no móvil. En cultivos de 24 horas, aparece como varillas cortas o cocobacilos de 1–3 mm de largo y 0.4–0.8 mm de ancho, con tendencia a la formación de filamentos. Se ha observado también presencia de cápsula en algunas cepas virulentas (Hinz, 1973; Nakata, Kume y Nakaze, 1980). *A. paragallinarum* se degenera en 48 a 60 horas, mostrando fragmentos y formas mal definidas. Los subcultivos en medio fresco en esta etapa volverán a producir la morfología típica en forma de barra (Soriano y Blackall, 2017).

La mayoría de los aislados de *A. paragallinarum* requieren de la forma reducida de NAD (NADH; 1.56–25 µg / mL de medio) para el crecimiento *in vitro*.

2.3.1.1. Clasificación taxonómica

- Nombre Científico: *A. paragallinarum*
- Filo : Proteobacteria
- Clase : Gammaproteobacteria
- Orden : Pasteurellales
- Familia : Pasteurellaceae
- Género : Avibacterium
- Especie : paragallinarum

2.3.1.2. Caracterización de *A. paragallinarum*

Actualmente existen dos esquemas relacionados para la tipificación serológica de *A. paragallinarum*: a) el esquema de Page, basado en la prueba de aglutinación en placa y consta de tres serotipos: A, B y C (Page, 1962) y b) el esquema de Kume, basado en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) con nueve serotipos: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4, distribuidas en tres serogrupos: A, B y C (Blackall *et al.*, 1990).

2.3.1.3 Gen HMTp210

Noro *et al.* (2007 y 2008), reportaron el gen *HMTp210* como una hemaglutinina y que presenta actividad como antígeno protector relacionado con la patogenicidad de *A. paragallinarum*. La secuencia del gen es de aproximadamente 6000 pares de bases y codifica para una proteína de 210 kDa; esta secuencia presenta tres regiones distintas según la homología de su secuencia de ADN y su variabilidad genética (Fig. 5)

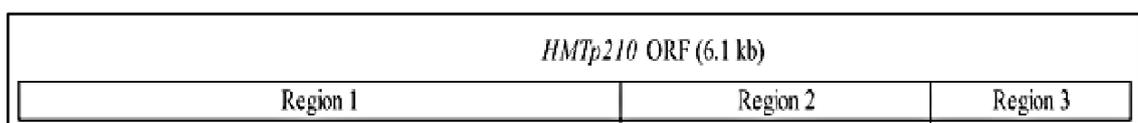


Figura 5. Estructura de la secuencia del gen *HMTp210* (Sakamoto *et. al.*; 2012)

Wu *et. al.* (201) reportaron que tanto las regiones 1 y 3 de la secuencia del gen *HMTp210* son altamente conservadas, no presentan una alta tasa de variabilidad genética entre los distintos serotipos de *A. paragallinarum*; sin embargo, también indicó que la región 2 del gen era hipervariable, es decir, es muy diversa para cada uno de los serotipos. a pero la homología de la región 2 es de alrededor del 50% entre los mismos. Sakamoto *et. al.* (2011) sugieren que la región 2 del gen *HMTp210* puede ser utilizado como marcador molecular para la clasificación *A. paragallinarum* dentro de los esquemas actuales de tipificación. Se conoce poco sobre la diversidad genética, variabilidad y complejidad del gen HMTp210, esto es en parte porque existe un pequeño número de muestras secuenciadas y almacenadas en bases de datos públicas, especialmente de muestras provenientes de América Latina (Araya *et. al.*, 2017)

III. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética – LEMyG a cargo del Centro de Excelencia – CITBM, del Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; en el distrito de Bellavista, Callao, Perú.

3.1. MATERIALES

3.1.1. Cepas de *Avibacterium paragallinarum*

Las muestras que se utilizaron en el presente trabajo de investigación correspondió a cepas de *A. paragallinarum* proporcionadas por el cepario de referencia del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Universidad Autónoma del Estado de México (Toluca, México). Para el trabajo de tipificación se necesitaron 9 cepas de referencia y 4 aislamientos mexicanos, previamente caracterizadas según el esquema de Kume (Tabla 1).

Los aislados microbianos fueron propagados previamente en 1 ml de yema de huevo, y se enviaron vía aérea desde México a Lima dentro de un contenedor hermético con hielo seco. A su llegada, fueron almacenados a una temperatura de -80 °C hasta su uso.

Tabla 1. Cepas de *Avibacterium paragallinarum*

Código BTS Consultores	Código CIESA	Nombre aislado/cepa	Serotipo	Notas
1	ESV-49	HP60	C-4	Cepa de referencia
2	ESV-48	SA-3	C-3	Cepa de referencia
3	ESV-57	0222	B-1	Cepa de referencia
4	ESV-133	ESV-133	B-1	Aislamiento mexicano, 2008
5	ESV-134	ESV-134	C-1	Aislamiento mexicano. Tepatitlán, Jalisco, 2008
6	ESV-43	E-3C	A-3	Cepa de referencia
7	ESV-42	2403	A-2	Cepa de referencia
8	ESV-168	LAVETEC-25	A-3	Aislamiento mexicano
9	ESV-41	221	A-1	Cepa de referencia
10	ESV-47	Modesto	C-2	Cepa de referencia
11	ESV-45	2671	B-1	Cepa de referencia
12	ESV-107	ESV-107	C-1	Aislamiento mexicano, Tehuacán, Puebla, Oct, 2008
13	ESV-44	HP14	A-4	Cepa de referencia

3.1.2. Controles positivos

Se utilizaron como controles positivos (Fig. 6) a 9 plásmidos tipo puC57 (2710 pb), los cuales contienen secuencias de ADN de la región 2 del gen *HMTp210* de cada una de las cepas de referencia, según el esquema de Kume (Tabla 2). La metodología utilizada para la obtención de los controles positivos fue la ligación de secuencias por extremos romos, el cual consiste en utilizar una enzima ligasa para unir la secuencia objetivo con el plásmido pUC57.

Se requirieron los controles positivos a la empresa Bio Basic Inc Life Sciences (Hong Kong, China). A llegar, los controles fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas a un volumen final de 100 µl y a una concentración de 40 ng/µl; los plásmidos fueron utilizados como controles positivos de amplificación y a su vez permitieron determinar el límite de detección de la PCR mediante la determinación del número de copias.

Tabla 2. Controles positivos utilizados, según el esquema de Kume

Nombre del Control Positivo	Cepa de referencia	Número de Accesoión (GenBank)	Tamaño de secuencia	Serogrupo	Serotipo
CS1	221	KU143734.1	1635 pb	A	A1
CS2	2403	KU143736.1	1620 pb	A	A2
CS3	E-3C	KU143737.1	1572 pb	A	A3
CS4	HP14	KU143738.1	1581 pb	A	A4
CS5	0222	KU143740.1	1620 pb	B	B1
CS6	H-18	KU143741.1	1611 pb	C	C1
CS7	Modesto	KU143742.1	1620 pb	C	C2
CS8	SA-3	KU143743.1	1611 pb	C	C3
CS9	HP60	KU143744.1	1758 pb	C	C4

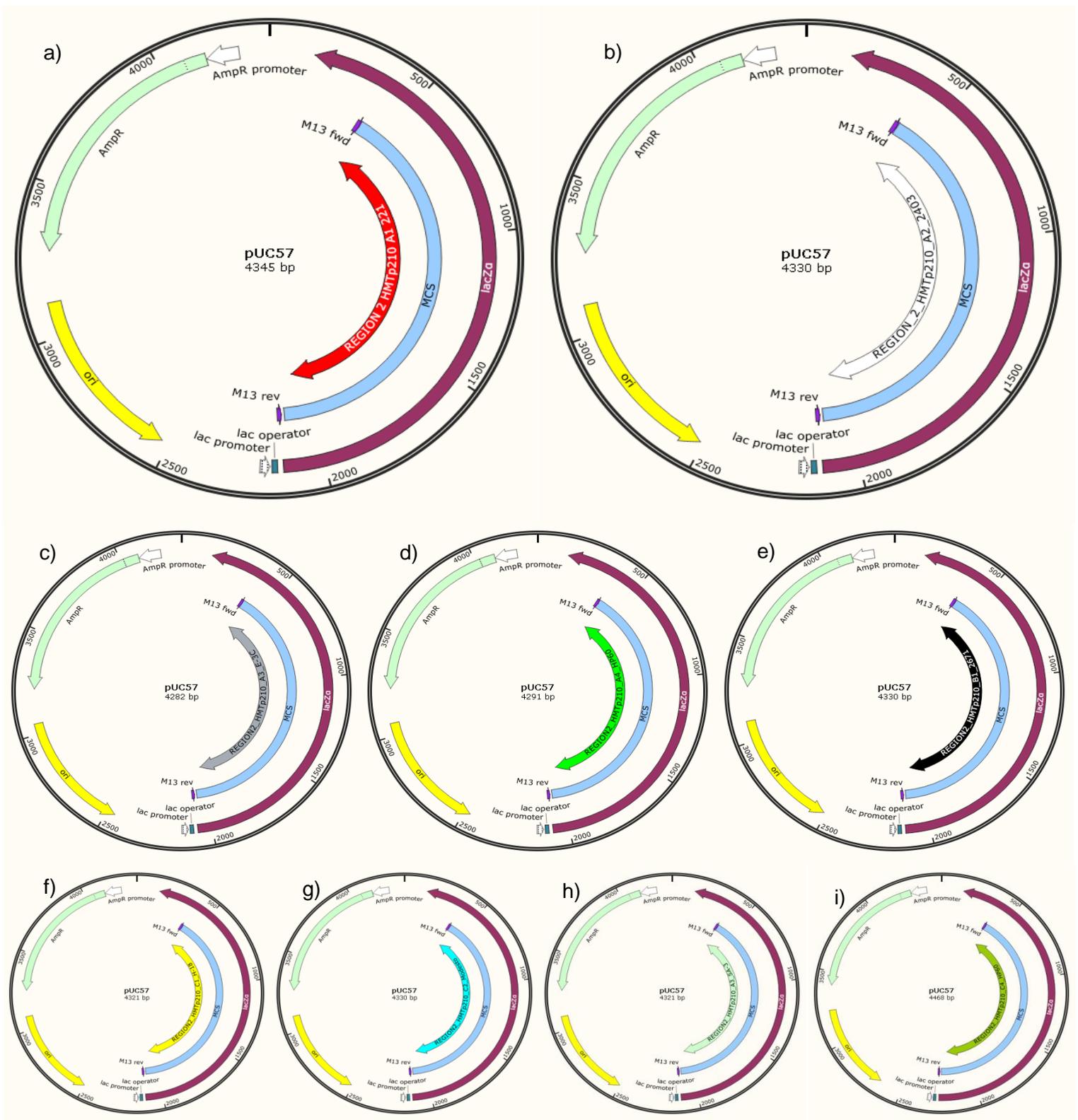


Figura 6. Controles sintéticos basados en el vector de clonación puC57, con secuencias parciales de las cepas de referencia de *A. paragallinarum*: a) 221, b) 2403, c) E-3C, d) HP14, e) 2671, f) H-18, g) Modesto, h) SA-3 e i) HP60

3.2. METODOS

3.2.1. Reactivación de las cepas de *A. paragallinarum*

Para la reactivación y mantenimiento de las cepas de *A. paragallinarum* se descongelaron los aislados *A. paragallinarum* a 37 °C en baño maría durante 1 hora. Se preparó 200 ml de infusión de cerebro-corazón (caldo BHI)(Roseburg y Clark, 1951) y se alicuotaron 10 ml de medio en tubos falcon de 15 ml, previamente rotulados (M1-M13). El medio fue previamente suplementado con 0.005% (p/v) de hemina, 0.0025% (p/v) nicotinamida adenina dinucleótido-reducida (NAD) y suero bovino fetal esterilizado por filtración al 1% (v / v), ya que se ha demostrado que muchas cepas de *A. paragallinarum* son dependientes de NAD y que tanto la hemina como el suero bovino fetal favorecen el crecimiento de las colonias (Droual *et. al.*, 1990).

Finalmente, las cepas de *A. paragallinarum* en cada tubo falcon de 15 ml y se dejó incubando a 37°C durante 24 horas.

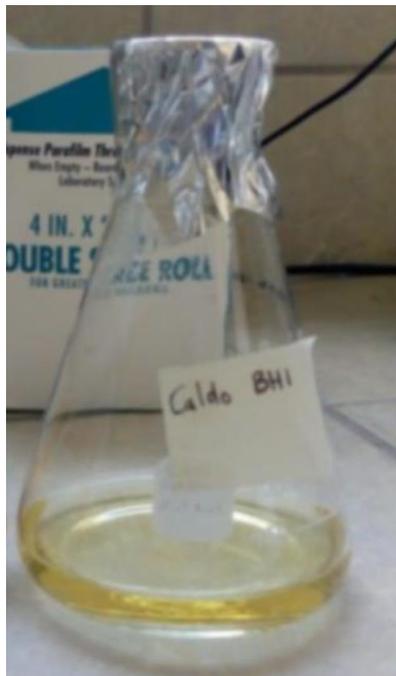


Figura 7. Preparación de medio infusión de cerebro-corazón (caldo BHI)

3.2.2. Análisis bioinformático

3.2.2.1. Selección de secuencias nucleotídicas

Se realizó la búsqueda de secuencias nucleotídicas de la región 2 del gen *HMTp210* en la base de datos del GenBank. De las nueve cepas de referencia tomadas según en el esquema de Kume (Blackall *et al.*, 1990b). Para ello, ingresamos a la página web de la base de datos de nucleótidos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=>) y buscamos los códigos de acceso de cada una de las cepas de referencia (Tabla 2). Finalmente, se procedió a descargar el archivo fasta de cada una de las secuencias nucleotídicas (Anexo 2).

3.2.2.2. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores, se realizó en primer lugar el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas seleccionadas, para lo cual se utilizó la herramienta *online* ClustalW 2.1 (<https://www.genome.jp/19olos-bin/clustalw>).

Se identificaron las secuencias consenso en los extremos de los alineamientos y se eligieron los cebadores tentativos, los cuales se analizaron mediante las plataformas *online* PrimerBLAST (para evaluar especificidad) y OligoAnalyzer 3.1 de IDTADN (para evaluar las condiciones termodinámicas).

Se sintetizaron los cebadores en la empresa fue Bio Basic Inc Life Sciences (Hong Kong, China), los cebadores fueron resuspendidos a una concentración de 100 μ M y almacenados a -20°C hasta su uso

3.2.2.3. Perfil de restricción y selección de enzimas de restricción

Primero, se realizó una simulación *in silico* de la PCR para cada una de las secuencias de las cepas de referencia utilizando la herramienta *online* PCR Products (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html) y se

almacenaron en archivos de texto ".txt" las secuencias resultantes o productos de PCR de cada simulación.

Posteriormente, utilizando el programa SnapGene 3.3.4 se realizó la búsqueda de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de corte único que permita la generación de perfiles de restricción específicos para cada secuencia. Finalmente, se realizó una simulación *in silico* de una electroforesis en gel de agarosa (2.5 % v/v) y con un marcador de peso molecular de 50 pb.

3.2.3. Extracción de ADN genómico de las cepas de *A. paragallinarum*

Para la extracción de ADN genómico de cada una de los aislados de *A. paragallinarum*, se utilizó el kit comercial Presto™ Mini gDNA Bacteria (Geneaid, Taiwan) y se realizó dentro de una cabina de bioseguridad clase II.

El primer paso consistió en la centrifugación de los cultivos de *A. paragallinarum* a 14 000 g por 1 minuto, posterior a ello se eliminó el sobrenadante (Fig, 8) y se adicionó al pellet, 180 µL de buffer de lisis 1



Figura 8. Células de *A. paragallinarum*, previo a la extracción del ADN genómico.

(Buffer GT) y 20 μ L de proteinasa K, se homogenizó en vortex y se incubó a 60°C por 15 minutos; durante la incubación, se invirtieron los tubos cada 3 minutos. Luego se adicionó 200 μ L de buffer de lisis 2 (Buffer GB) a la muestra, se homogenizó en vortex durante 10 segundos y se incubaron las muestras a 70 °C. por 15 minutos. Finalizada la incubación se agregó 200 μ L de etanol absoluto a la muestra lisada e inmediatamente se homogenizó en vortex durante 10 segundos. Se colocó la solución obtenida en una columna de sílica (columna GD) y se centrifugó la columna a 14 000 g por 2 minutos, se descartó el tubo colector y se pasó la columna a otro tubo colector. Después, se procedió al lavado de la columna GD, con 400 μ L del buffer de lavado 1 (Buffer W1) y se centrifugó a 14000 g por 30 segundos, se descartó el tubo colector y se pasó la columna a otro tubo colector. Nuevamente se lavó la columna GD, con 600 μ L del buffer de lavado 2 (Buffer Wash) y se centrifugó a 14000 g por 30 segundos, se descartó el tubo colector y se pasó la columna a otro tubo colector. Finalmente se centrifugó a 14 000 g por 3 minutos para secar la columna GD y luego se retiró la columna con cuidado y se colocó en un microtubo de 1.5 mL. Para el paso final, se agregó 40 μ L de buffer de elución y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se centrifugó la columna GD a 14 000 g por 2 minutos.

Con el objetivo de determinar la concentración de ADN y verificar la pureza e integridad del ADN genómico, la muestra de ADN fue analizada mediante espectrofotometría usando el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop® - ThermoScientific y se almacenaron a -20 °C para usos posteriores.

3.2.4. Detección molecular de *A. paragallinarum*

Para la detección de *A. paragallinarum* se realizó la prueba PCR descrita por Chen *et.al.* (1996), el cual amplifica un producto de 500 pb del gen *HPG-2*. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 μ L conteniendo Q5 Reaction Buffer 1X (New England Biolabs,

Estados Unidos), Q5 High GC Enhancer 1X (New England Biolabs, Estados Unidos), 2.5 mM de MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0.4 μM de cada cebador (Tabla 3), 1.25 unidades de Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Estados Unidos) y 10 ng de ADN genómico. Se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas, mientras que como control positivo se utilizó un aislado de *A. paragallinarum* del cepario de BTS Consultores SAC.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores para la amplificación de la secuencia parcial del gen *HPG-2*

Cebador	Secuencia	Tamaño esperado del amplicón
Forward_N-1	5'-TGAGGGTAGTCTTGACGCGAAT-3'	500 PB
Reverse_R-1	5'-CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT'-3'	

Los pasos de la PCR fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial:	95 °C por 5 minutos	
Desnaturalización:	94 °C por 30 segundos,	} 40 ciclos
Hibridación:	60 °C por 1 minuto	
Extensión:	72 °C por 1 minuto	
Extensión final:	72 °C por 7 minutos	
Conservación:	4°C continuos	

Por último, se realizó una corrida electroforética con los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 40 minutos.

3.2.5. Estandarización de reacción de PCR

La reacción de PCR fue realizada con los cebadores diseñados previamente (según el apartado 3.2.2.2) y que amplifican la región 2 del gen *HMTp210* para todas las cepas de referencia de *A. paragallinarum*. Para la estandarización de la PCR se tomó en consideración parámetros como la temperatura de alineamiento de los

cebadores, las concentraciones de los cebadores, y el límite de detección de ADN para demostrar la sensibilidad de la técnica.

Para obtener el límite de detección, se utilizó la herramienta *online* Endmemo (<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 μ L con Q5 Reaction Buffer 1X (New England Biolabs, Estados Unidos), Q5 High GC Enhancer 1X (New England Biolabs, Estados Unidos), 3.0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 0.1-0.5 μ M de cada cebador, 1.25 unidades de Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Estados Unidos) y 100 ng de ADN genómico.

Los pasos de la reacción de PCR fueron:

Desnaturalización inicial:	95 °C por 5 minutos	} 40 ciclos
Desnaturalización:	94 °C por 30 segundos,	
Hibridación:	54-64 °C por 30 segundos	
Amplificación:	72 °C por 90 segundos	
Amplificación final:	72 °C por 7 minutos	
Conservación:	4°C continuos	

Para encontrar la temperatura de alineamiento, se trabajó en un rango de 54-64 °C y para determinar la concentración de cebadores se trabajó en un rango de 0.1-0.5 μ M; de esta forma se podrá determinar cuáles son los parámetros óptimos de operación. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V por 80 minutos para observar los productos de PCR.

3.2.6. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Para realizar la prueba de RFLP se utilizaron las enzimas de restricción que se seleccionarán de acuerdo a los perfiles de restricción generados (según el apartado 3.2.2.3). Cada digestión enzimática se realizó según las cantidades de reactivos de la Tabla 4, mientras las condiciones de la reacción se indican en la Tabla 5.

Tabla 4. Preparación del mix de digestión enzimática.

Reactivos	[INICIAL]	[FINAL]	Volumen por muestra
Cut Smart Buffer (New England Biolabs)	10 X	1 X	1 µl
Enzima de restricción (New England Biolabs)	1 X	0.1 X	1 µl
Amplicón	-	-	8 µl
Volumen Final			10 µl

Tabla 5. Condiciones para la prueba de RFLP

Temperatura de Incubación	Tiempo de Incubación	Temperatura de Inactivación	Tiempo de Inactivación
Según la enzima de restricción*	1 hora	Según la enzima de restricción	2 horas

* Enzima de restricción (New England Biolabs)

Los productos de la digestión se almacenaron a - 20 °C hasta su utilización

3.2.7. Análisis de perfiles de restricción y tipificación de *A. paragallinarum*

Para observar los productos de la digestión por enzimas de restricción, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2.5% a 100 V durante 100 minutos, con el objetivo de determinar cuáles son perfiles de restricción generados para cada muestra, los cuales se compararon con los resultados de la simulación *in-silico*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Análisis bioinformático

4.1.1. Selección y diseño de cebadores

Se realizó el alineamiento múltiple mediante el programa *online* Clustal W 2.1 a las secuencias de nucleótidos correspondientes a las nueve cepas de referencia de *A. paragallinarum* y como resultado, se encontraron regiones consenso tanto al inicio como al final del alineamiento (Fig. 9). Si bien Sakamoto *et. al.* (2012) indicaron que la región 2 del gen *HMTp210* es hipervariable, se observa que el alineamiento múltiple de secuencias puede utilizarse como una estrategia para la búsqueda de regiones consenso para la selección y diseño de cebadores

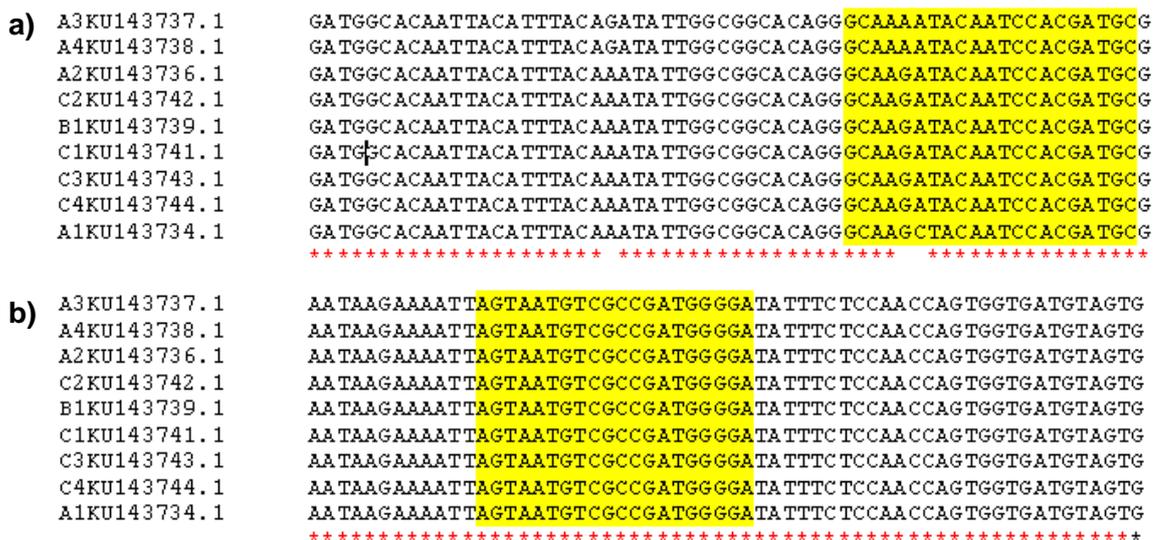


Figura 9. Regiones consenso en el alineamiento múltiple de la región 2 del gen *HMTp210*.

a) Región consenso al inicio del alineamiento b) Región consenso al final del alineamiento

De manera manual se seleccionaron secuencias de cebadores a partir de dichas regiones consenso (Fig. 9, resaltados en amarillo), donde al cebador para la cadena positiva se le denominó “Fb” y al cebador para la cadena negativa se le denominó “Rb”. Para evaluar que ambos cebadores presentaban propiedades termodinámicas adecuadas, se utilizó el programa *online* OligoAnalyzer 3.1 (Tabla 6).

Matveeva *et. al.* (2004) indica que algunas de las propiedades más importantes para evaluar la idoneidad de los cebadores es la baja

disposición de formación de estructuras secundarias (ΔG° mayor a -6 kcal/mol) y el porcentaje de G+C entre 40-60%; lo que coincide con los valores obtenidos (Tabla 6) con excepción de la formación de heterodímeros (- 8.6 kcal/mol); lo que puede afectar al rendimiento de la PCR debido a que la unión entre cebadores se contrapone a la unión de los cebadores con el ADN molde (Thornton & Basu, 2011).

Tabla 6. Propiedades termodinámicas de cebadores Fb y Rb, específicos para la región 2 del gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*

Secuencia	% G+C	Temp. de Fusión (Tm)	Formación de estructuras secundarias (ΔG°)(kcal/mol)			Tamaño de amplicón
			HMD	HTD	HRQ	
Fb 5'- GCAAGMTACAATCCACGATGC-3'	50	59 °C	-5.49	-8.6	1.77	~1500 pb
Rb 5'- TCCCCATCGGCGACACTACT-3'	55	62 °C	-5.19		1.53	

Dónde: HMD: homodímeros

HTP: heterodímeros

HRQ: horquillas

También se evaluó la inclusividad y especificidad de los cebadores para *A. paragallinarum* mediante la herramienta *online* Primer-BLAST. Se encontró que los cebadores “Fb” y “Rb” son capaces de unirse a 89 secuencias reportadas de *A. paragallinarum* de la base de datos del GenBank (incluyendo las nueve de referencia) pero que no son capaces de unirse a secuencias reportadas de otros agentes patógenos respiratorios como Virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o Virus de Laringotraqueitis infecciosa (ILTV). Primer-BLAST es una herramienta que permite evaluar tanto inclusividad como especificidad utilizando bases de datos de secuencias nucleotídicas, con el objetivo de asegurarnos que los cebadores van a unirse sólo al gen de interés (Ye *et al.*, 2012).

4.1.2. Perfil de restricción

Utilizando los cebadores “Fb” y “Rb” para realizar una PCR *in silico* con las nueve secuencias de cepas de referencia de *A. paragallinarum* (Tabla 2), se obtuvieron productos de PCR *in silico* y se guardaron en formato .txt (Tabla 7).

Tabla 7. Tamaños de secuencias obtenidas mediante PCR a la región 2 del gen *HMTp210* de nueve cepas de referencia de *A. paragallinarum*

Nombre de secuencia	Tamaño de secuencia	Cepa de Referencia	Serotipo
S1	1425 pb	221	A1
S2	1443 pb	2403	A2
S3	1395 pb	E-3C	A3
S4	1404 pb	HP14	A4
S5	1443 pb	0222	B1
S6	1434 pb	H-18	C1
S7	1443 pb	Modesto	C2
S8	1434 pb	SA-3	C3
S9	1581 pb	HP60	C4

Posteriormente, utilizando el programa SnapGene 3.3.4, se generaron perfiles de restricción únicos para cada cepa mediante la digestión por distintas enzimas de restricción. Se seleccionaron las enzimas *BtgI*, *BtgZI* (obtenida de la bacteria *Bacillus thermoglucosidasius*) y *Kas I* (obtenida de la bacteria *Kluyvera ascorbata*) ya que cumplían con requisitos mínimos de selección para una prueba RFLP (Tabla 8).

Mandakovic *et al.* (2016) sugieren que para realizar una prueba RFLP exitosa se debe buscar enzimas comerciales que generen perfiles de restricción únicos para cada genotipo, grupo o variedad que se desea clasificar.

Tabla 8. Requisitos para la selección de enzimas de restricción *Btgl*, *BtgZI* y *KasI*

Requisitos de selección	<i>Btgl</i>	<i>BtgZI</i>	<i>KasI</i>
Posee sitio(s) de reconocimiento en al menos una de las nueve secuencias	Si	Si	Si
La combinación genera un perfil de restricción único para cada cepa.	Si	Si	Si
Enzima de restricción disponible comercialmente	Si	Si	Si

Posteriormente, mediante una simulación *in silico* de electroforesis en gel de agarosa (2.5 % v/v) (Fig. 10) se evaluaron los perfiles de restricción obtenidos luego de la digestión enzimática de los productos de PCR con las enzimas de restricción *Btgl*, *BtgZI* y *KasI*, utilizando el programa Snapgene 5.0.7.

Al evaluar el número y tamaño de bandas presentes en gel de agarosa luego de la digestión por enzimas de restricción *Btgl*, *BtgZI* y *KasI* (Tabla 9) se observa que cada serotipo presenta un perfil de restricción único, lo que permite una tipificación adecuada de *A. paragallinarum* según el esquema de Kume.

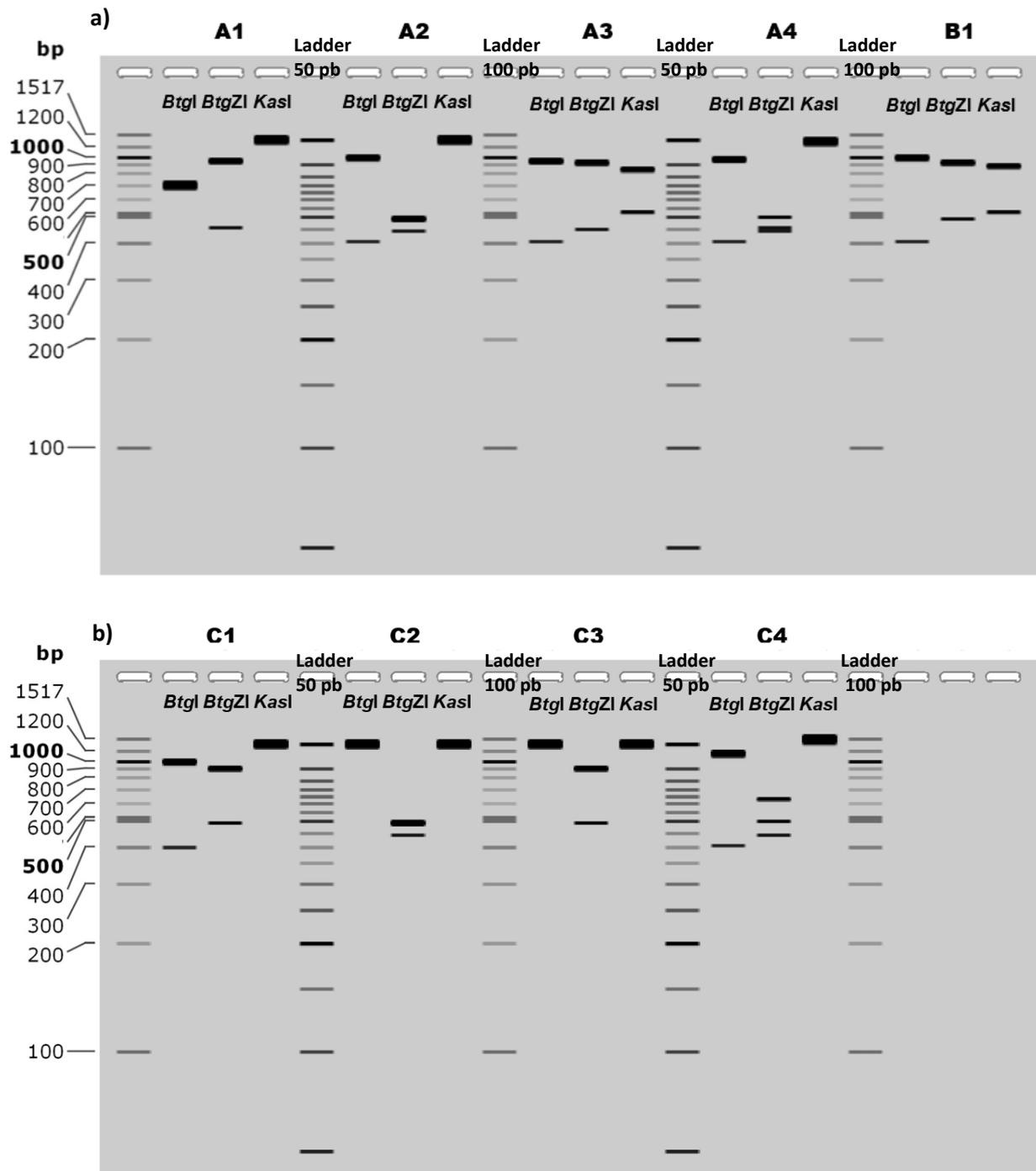


Figura 10. a) Perfiles de restricción para la tipificación molecular de serotipos A1, A2, A3, A4 y B1 de *A. paragallinarum*, en el programa SnapGene 5.0.4. (snapgene.com) b) Perfiles de restricción para la tipificación molecular de serotipos C1, C2, C3 y C4 de *A. paragallinarum*, en el programa SnapGene 5.0.4. (snapgene.com)

Tabla 9. Características generales de los perfiles de restricción para *A. paragallinarum*, clasificados según el esquema de Kume

Serotipo	Cepa de referencia	Enzima de restricción utilizada	N° de Fragmentos de restricción	Tamaño (bp)	Bandas presentes en gel
A1	221	<i>BtgI</i>	2	720/705	1
		<i>BtgZI</i>	2	966/459	2
		<i>KasI</i>	1	1425	1
A2	2403	<i>BtgI</i>	2	1035/438	2
		<i>BtgZI</i>	3	505/495/443	2
		<i>KasI</i>	1	1443	1
A3	E-3C	<i>BtgI</i>	2	987/408	2
		<i>BtgZI</i>	2	948/447	2
		<i>KasI</i>	2	863/532	2
A4	HP14	<i>BtgI</i>	2	996/408	2
		<i>BtgZI</i>	3	505/456/443	2
		<i>KasI</i>	1	1404	1
B1	0222	<i>BtgI</i>	2	1035/408	2
		<i>BtgZI</i>	2	948/495	2
		<i>KasI</i>	2	911/532	2
C1	H-18	<i>BtgI</i>	2	1035/399	2
		<i>BtgZI</i>	2	939/495	2
		<i>KasI</i>	1	1434	1
C2	Modesto	<i>BtgI</i>	1	1443	1
		<i>BtgZI</i>	3	505/495/443	2
		<i>KasI</i>	1	1443	1
C3	SA-3	<i>BtgI</i>	1	1434	1
		<i>BtgZI</i>	2	939/495	2
		<i>KasI</i>	1	1434	1
C4	HP60	<i>BtgI</i>	2	1173/408	2
		<i>BtgZI</i>	3	633/505/443	3
		<i>KasI</i>	1	1581	1

4.2. Extracción de ADN genómico de *A. paragallinarum*

El ADN genómico de las 13 cepas de *A. paragallinarum* fue extraído con éxito, la concentración e integridad del ADN obtenido se verificaron a través de la cuantificación por el espectrofotómetro Nanodrop (ThermoScientific, USA) (Tabla 10). La calidad del ADN de las muestras procesadas es óptima y coincide con lo descrito por Glasel (1995), que indica que la calidad o pureza del ADN se evalúa utilizando la relación de absorbancia a 260 y 280 nm (A260/A280) y esta debe ser igual o superior a 1,80 para considerarse ideal.

Tabla 10. Concentración y calidad de ADN genómico de cepas de *A. paragallinarum*

Código BTS	Nombre	Serotipo	ADN	A260/A280
Consultores	aislado/cepa	(IH)	(ng/μl)	
M1	HP60	C-4	150,437	2,09
M2	SA-3	C-3	153,568	2,10
M3	222	B-1	58,847	2,00
M4	ESV-133	B-1	95,442	1,80
M5	ESV-134	C-1	160,940	2,12
M6	E-3C	A-3	55,317	1,93
M7	2403	A-2	133,838	1,99
M8	LAVETEC-25	A-3	158,540	2,14
M9	221	A-1	106,711	2,11
M10	Modesto	C-2	53,603	1,94
M11	2671	B-1	118,539	2,13
M12	ESV-107	C-1	113,399	2,05
M13	HP14	A-4	147,323	2,15,

4.3. Detección molecular de *A. paragallinarum*

Chen *et.al.* (1996) estudió la secuencia del gen *HPG-2* y estableció una prueba basada en PCR para la detección rápida y sencilla de cepas de *A. paragallinarum*. Siguiendo lo descrito, se realizó una prueba de PCR con el fin de verificar la identidad de las muestras.

Al finalizar la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v), donde las trece cepas amplificaron un producto de ~500 pb (Fig. 11). Esto coincide con lo referido por Chen *et al.* (1996) y confirma que las muestras evaluadas son *A. paragallinarum*

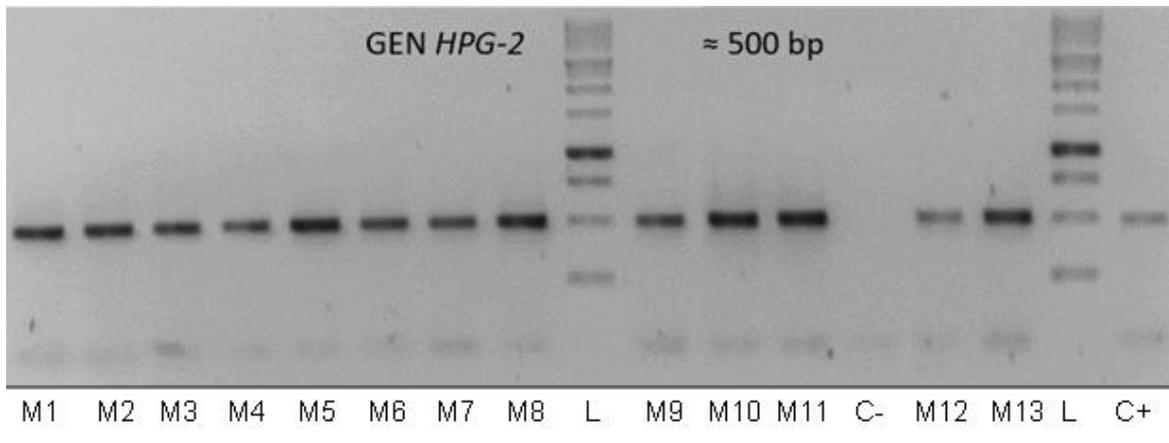


Figura 11. Amplificación del gen *HPG-2* para la detección molecular de *A. paragallinarum*. Carriles: (L) marcador de peso molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc.); de (M1) a (M13) las cepas de *A. paragallinarum*; (C-) control negativo para *A. paragallinarum* y (C+) control positivo para *A. paragallinarum*.

4.4. Estandarización de PCR de tipificación

La PCR de tipificación genera un producto de ~1400 pb y es específico para la región 2 del gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*. Para la estandarización de la prueba de PCR, se realizaron tres subgrupos de ensayos: a) para optimizar la temperatura de alineamiento de los cebadores, b) para optimizar las concentraciones de los cebadores y c) para establecer el límite de detección de ADN; teniendo en cuenta los parámetros sugeridos por Roux (2009).

En primer lugar, se estableció el número de copias de ADN de los controles positivos presentes en un microlitro, obteniendo una concentración promedio de copias ADN/ μ l mediante la herramienta *online* EndMemo (Tabla 11)

Tabla 11. Concentración (número de copias de ADN por microlitro) de los controles positivos.

Nombre del Control Positivo	Cepa de Referencia	Tamaño del plásmido	Serotipo	Concentración (copias/ μ l)	Promedio
CS1	221	4345 pb	A1	8.53×10^9	
CS2	2403	4330 pb	A2	8.56×10^9	
CS3	E-3C	4282 pb	A3	8.65×10^9	
CS4	HP14	4291 pb	A4	8.63×10^9	
CS5	0222	4330 pb	B1	8.56×10^9	
CS6	H-18	4321 pb	C1	8.57×10^9	8.55×10^9
CS7	Modesto	4330 pb	C2	8.56×10^9	
CS8	SA-3	4321 pb	C3	8.57×10^9	
CS9	HP60	4468 pb	C4	8.29×10^9	

Luego, se realizaron diluciones al control positivo CS2 (por estar más cerca al promedio) desde 8.53×10^8 ADN/hasta 8.53×10^{-1} para posteriormente correr una PCR. Se estableció como límite de detección 8.53×10^3 copias de ADN/ μ l. (Fig. 12). La prueba basada en PCR reportada por Chen *et. al.* (1996) para la detección de *A. paragallinarum* tenía un límite de detección de aproximadamente 3.8×10^2 copias de ADN/ μ l (o 1 pg de ADN genómico de *A. paragallinarum*), la cual presenta una sensibilidad analítica mayor que la PCR desarrollada en este trabajo, sin embargo los objetivos finales son distintos, siendo uno el de una detección y diagnóstico directo mientras el presente tiene como finalidad lograr la tipificación e identificación de cada tipo o variedad de *A. paragallinarum* basados en el esquema de Kume.

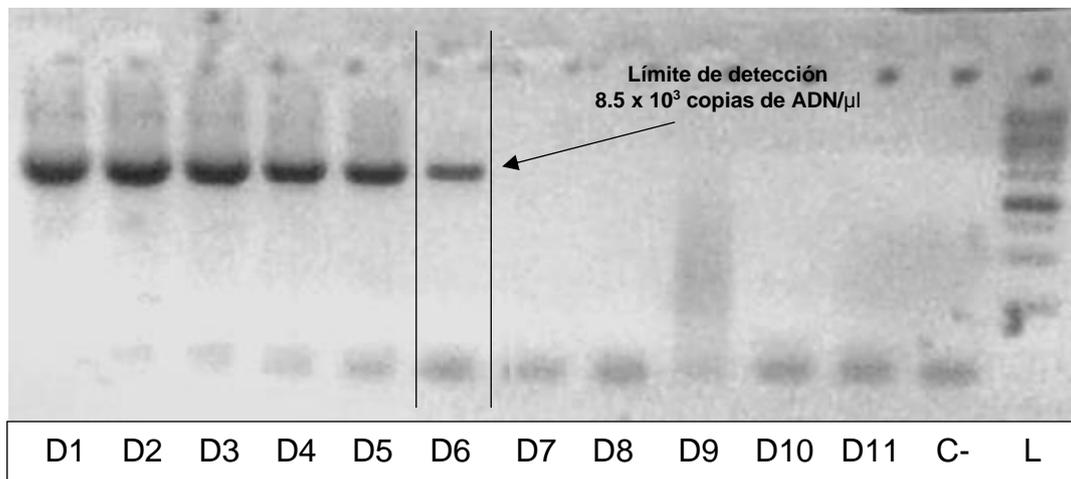


Figura 12. Límite de detección para la amplificación de la región 2 de gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*. Carriles: (L) marcador de peso molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc.); (D1 – D11) para las diluciones del control CS2 desde $8.5 \cdot 10^8$ a $8.5 \cdot 10^{-2}$ copias ADN/ μ l; (C-) control negativo para *A. paragallinarum*

Para establecer la temperatura de alineamiento ideal, se realizaron diversas PCR de la dilución $8.5 \cdot 10^3$ copias/ μ l del control positivo CS2. Se inició con un gradiente de temperatura de alineamiento desde 54°C hasta 64°C (Fig. 13); según lo señalado por Roux (2009) donde indica que para realizar una PCR de gradiente se debe tener como punto de partida un rango $\pm 5^\circ\text{C}$ del cebador con menor temperatura de fusión (en este caso el cebador “Fb”).

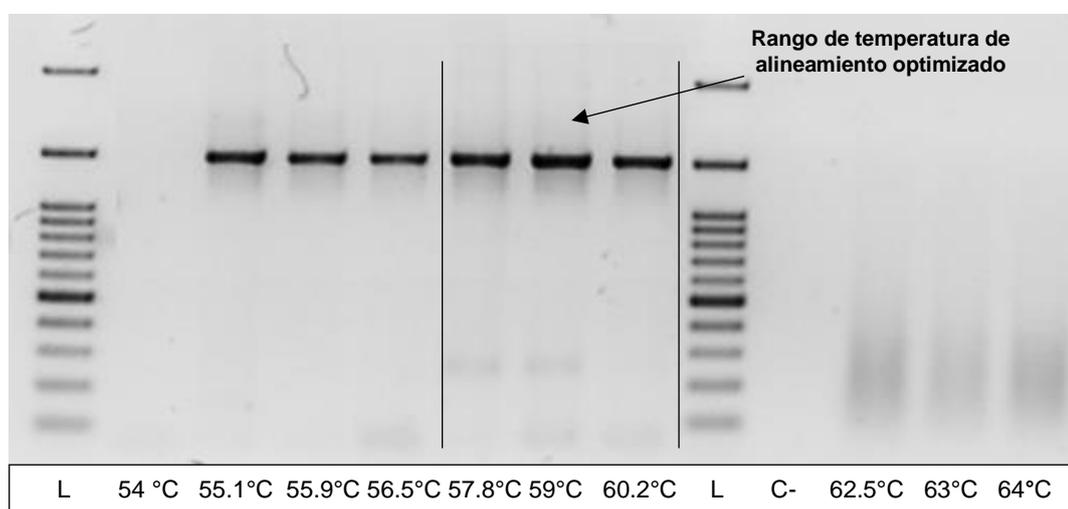


Figura 13. Gradiente (largo) de temperatura de alineamiento para la amplificación de la región 2 de gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*. Carriles: (L) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Geneaid); de (55°C) a (65°C) las temperatura de alineamiento a las que se sometió el control sintético CS2, (C-) control negativo para *A. paragallinarum*

Teniendo en cuenta el rango de temperaturas de alineamiento donde se observaron mejores resultados (Fig. 13), se realizó una nueva PCR, esta

vez con un gradiente de temperatura desde 57 °C hasta 60 °C (Fig. 14). Se observa que a una temperatura de alineamiento de 57 °C se obtuvieron los mejores resultados, ya que se visualiza una banda de mayor grosor, reflejando un mayor rendimiento y una mayor cantidad de producto de PCR.

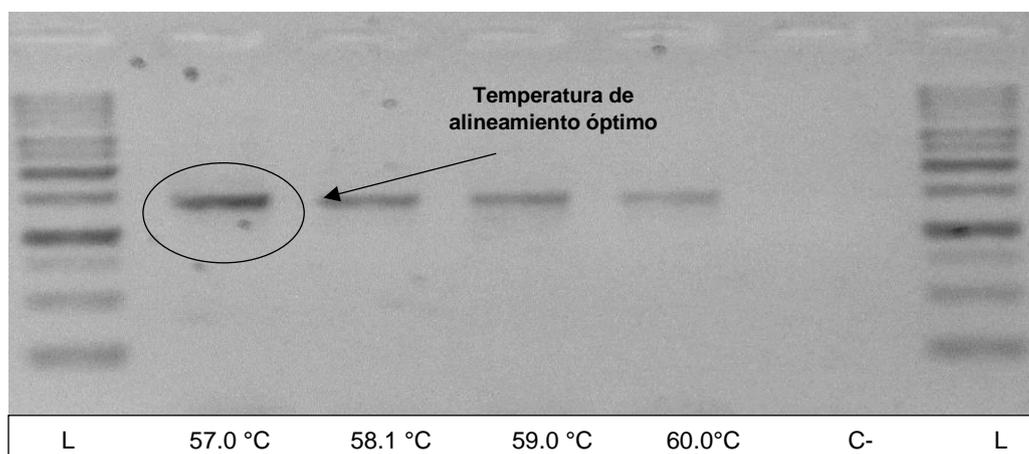


Figura 14. Gradiente (corto) de temperatura de alineamiento para la amplificación de la región 2 de gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*. Carriles: (L) marcador de peso molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc.); de (57° C) a (60 °C) las temperatura de alineamiento a las que se sometió el control sintético CS2, (C-) control negativo para *A. paragallinarum*

Para establecer la concentración de cebadores ideal, se realizaron PCRs de la dilución 8.5×10^3 copias de ADN/ μ l de los controles positivos. Se trabajó inicialmente con una PCR en un rango de concentraciones de cebadores desde 0.1 μ M hasta 0.5 μ M y posteriormente se realizaron nuevas PCR en un rango de concentraciones de cebadores desde 0.15 μ M hasta 0.25 μ M.

Con un diseño adecuado se puede reducir la presencia de dímeros, los cuales son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y cebadores, resultando en un bajo rendimiento (Innis *et. al.*, 1990), por lo cual se puede establecer a partir de los resultados de las de PCR que a una concentración de cebadores de 0.15 μ M se obtiene una mayor eficiencia y un mayor rendimiento al no visualizar formación de dímeros o la presencia de “smear”. (Fig. 15).

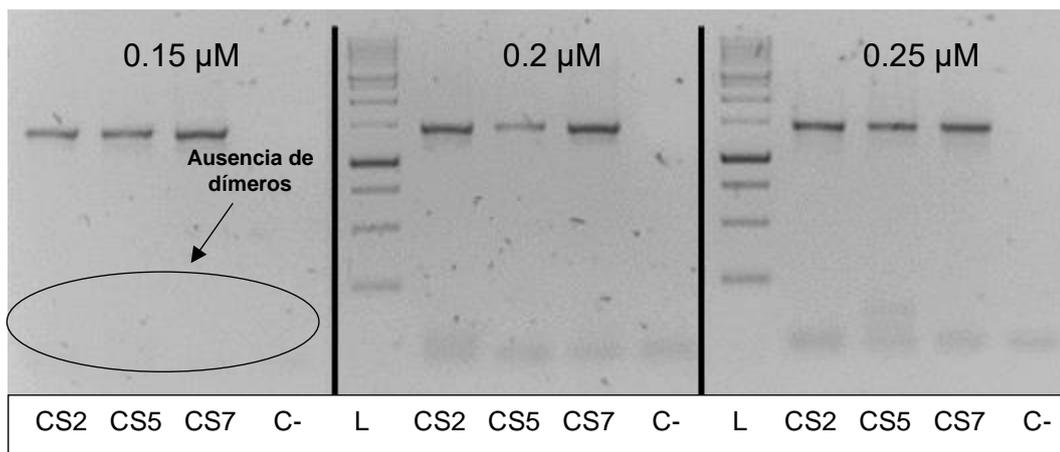


Figura 15. Gradiente de concentraciones de cebadores para la amplificación de la región 2 de gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*. Carriles: (L) marcador de peso molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc.); (CS2, CS5 y CS7) para los controles positivos sometidos a diferentes concentraciones de cebadores, (C-) control negativo para *A. paragallinarum*

Luego de estandarizar el límite de detección, la temperatura de alineamiento y la concentración óptima de cebadores, se realizó una PCR a partir de las diluciones 8.5×10^4 copias de ADN/ μl de los nueve controles positivos (fig. 16) y de las trece muestras de *A. paragallinarum* (fig. 17). Los productos de PCR se encuentran entre ~ 1400 - 1500 pb como se indicó previamente (Tabla 7) y no se observó presencia de dímeros de cebadores, lo que garantiza una PCR estandarizada y de buen rendimiento.

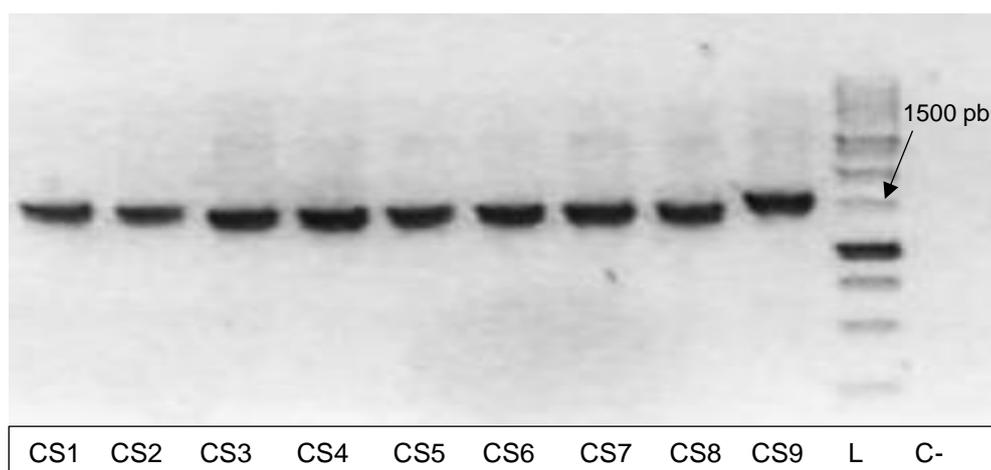


Figura 16. Productos de amplificación (controles) de la región 2 de gen *HMTp210* de *A. paragallinarum* de PCR estandarizada. Carriles: (L) marcador de peso molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc.); de (CS1) a (CS9) los controles sintéticos para *A. paragallinarum*, (C-) control negativo para *A. paragallinarum*

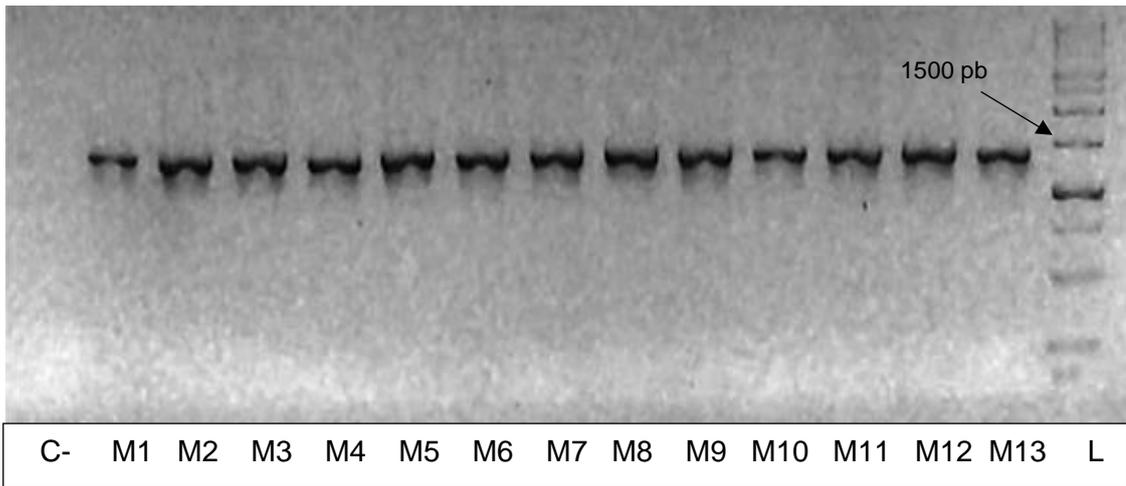


Figura 17. Productos de amplificación (muestras) de la región 2 de gen *HMTp210* de *A. paragallinarum*. Carriles: (L) marcador de peso molecular 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc.); de (1) a (13) las cepas de *A. paragallinarum*, (C-) control negativo para *A. paragallinarum*

4.5. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y tipificación de *A. paragallinarum*

Se realizaron las pruebas RFLP – o digestión con enzimas de restricción- a los productos de la PCR de tipificación, utilizando las enzimas *BtgI*, *BtgZI* y *KasI* previamente seleccionadas (Tabla 8), luego de realizar la electroforesis en gel de agarosa (fig. 18, 19,20,21 y 22) se comparó a los controles positivos y a las muestras de *A. paragallinarum* según el perfil de restricción esperado (Tabla 9).

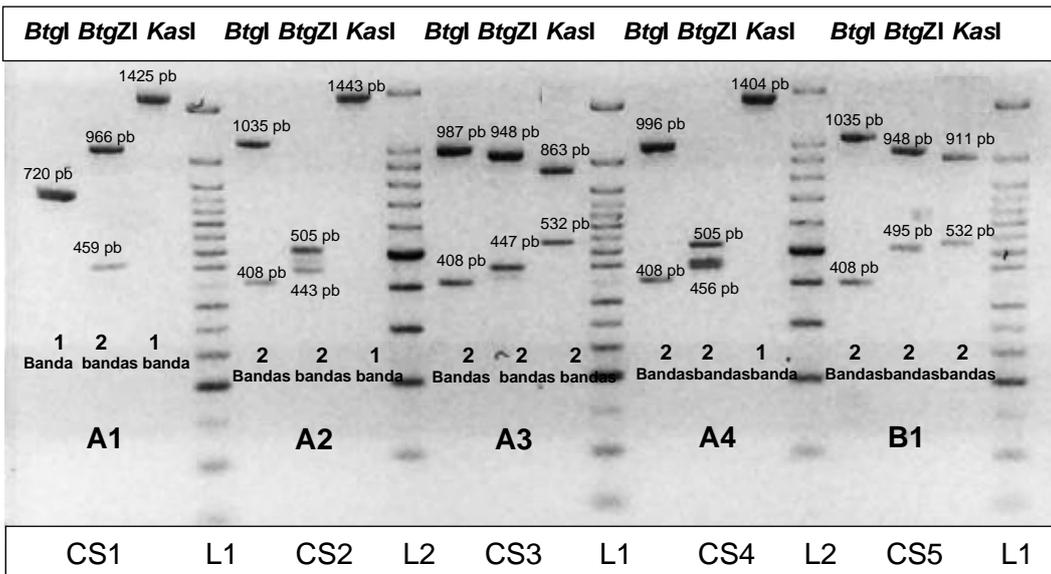


Figura 18. RFLP de los controles positivos para la tipificación de *A. paragallinarum*. Carriles: (L1) marcador de peso molecular 50 bp DNA ladder (New England Biolabs Inc.); (L2) marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Geneaid); de (CS1) a (CS5) los controles sintéticos para *A. paragallinarum*.

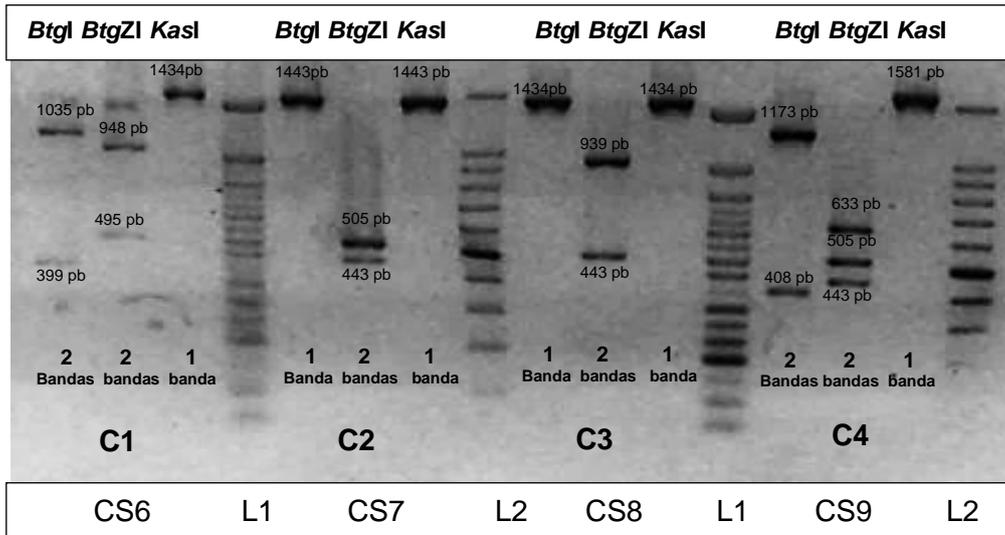


Figura 19. Prueba RFLP de los controles sintéticos para la tipificación de *A. paragallinarum*. Carriles: (L1) marcador de peso molecular 50 bp DNA ladder (New England Biolabs Inc.); (L2) marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Geneaid); de (CS5) a (CS9) los controles sintéticos para *A. paragallinarum*; de (1) a (13) las cepas de *A. paragallinarum*.

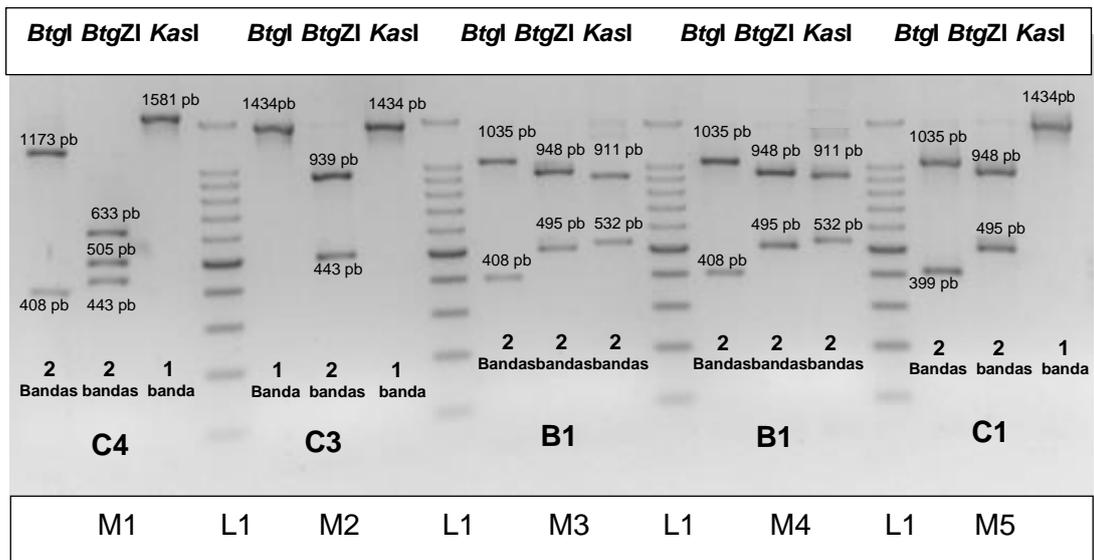


Figura 20. Prueba RFLP de las cepas de referencia para la tipificación de *A. paragallinarum*.. Carriles: (L1) marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Geneaid); de (1) a (5) las cepas de *A. paragallinarum*.

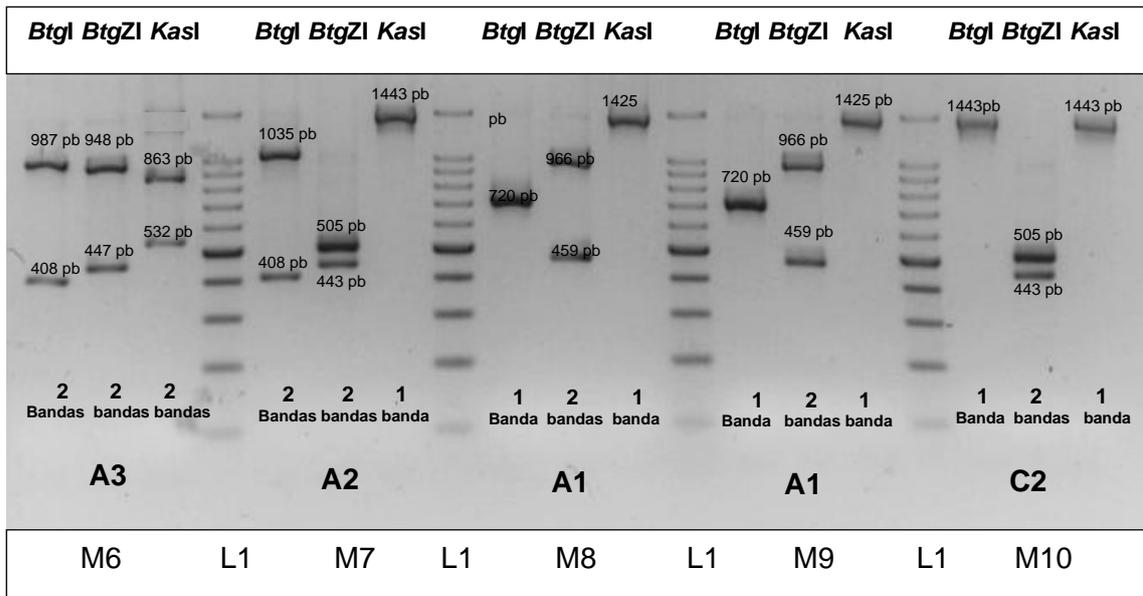


Figura 21. Prueba RFLP de las cepas de referencia para la tipificación de *A. paragallinarum*. Carriles: (L1) marcador de peso molecular 50 bp DNA ladder (New England Biolabs Inc.); (L2) marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Geneaid); de (6) a (10) las cepas de *A. paragallinarum*.

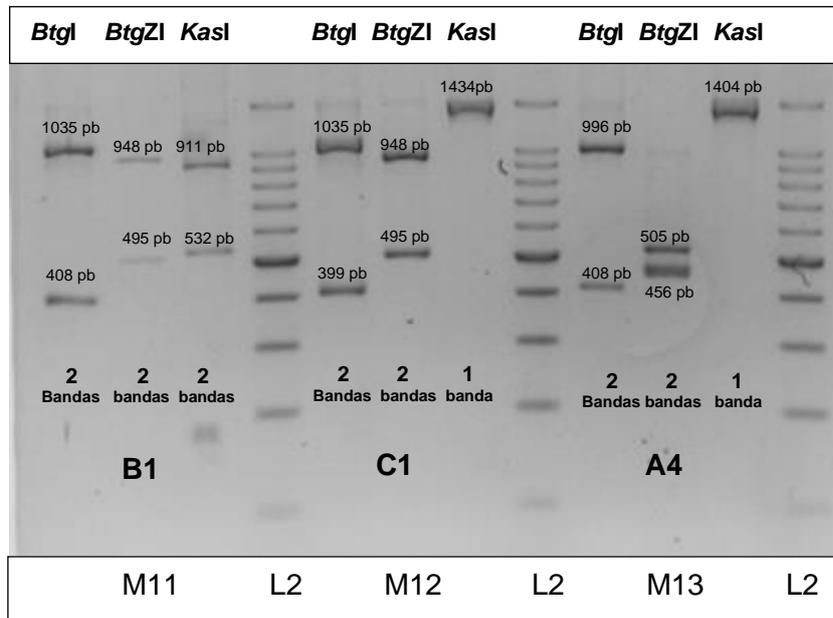


Figura 22. Prueba RFLP de las cepas de referencia para la tipificación de *A. paragallinarum*. Carriles: (L2) marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Geneaid); de (11) a (13) las cepas de *A. paragallinarum*.

Los resultados de la prueba basada en PCR-RFLP evidenciaron una alta eficacia como estrategia para la tipificación, donde los nueve controles positivos coincidieron con los resultados esperados. De las 13 cepas de *A. paragallinarum* procesadas se logró tipificar el 100 % de las muestras y obtuvo un 92.3 % de coincidencia entre los resultados de la prueba PCR-RFLP y los obtenidos con la tipificación serológica mediante la prueba de inhibición de la aglutinación (tabla 14). La muestra “M8” es un aislado de campo, y se debe realizar una previa purificación en placa para garantizar la presencia una cepa única en la muestra.

Tabla 12. Tipificación molecular de las cepas de *A. paragallinarum*, según el esquema de Kume

Código BTS	Nombre	ADN	A260/A280	Prueba de	Prueba
Consultores	aislado/cepa	(ng/μl)		Inhibición	basado
				de la	en PCR-
				aglutinación	RFLP
M1	HP60	150,437	2,09	C-4	C-4
M2	SA-3	153,568	2,10	C-3	C-3
M3	222	58,847	2,00	B-1	B-1
M4	ESV-133	95,442	1,80	B-1	B-1
M5	ESV-134	160,940	2,12	C-1	C-1
M6	E-3C	55,317	1,93	A-3	A-3
M7	2403	133,838	1,99	A-2	A-2
M8	LAVETEC-25	158,540	2,14	A-3	A-1
M9	221	106,711	2,11	A-1	A-1
M10	Modesto	53,603	1,94	C-2	C-2
M11	2671	118,539	2,13	B-1	B-1
M12	ESV-107	113,399	2,05	C-1	C-1
M13	HP14	147,323	2,15,	A-4	A-4

V. CONCLUSIONES

- Se diseñaron los cebadores denominados “Fb” (5'- GCAAGMTA CAATCCACGATGC-3 y “Rb” (5'-TCCCCATCGGCGACATTACT-3'), los cuales son específicos para la región 2 del gen *HMTp210* de *A. paragallinarum* y amplifican un producto de PCR de aproximadamente 1500 pares de bases.
- Se estableció como temperatura de alineamiento óptimo los 57 °C para una prueba basada en PCR-RFLP para la tipificación de *A. paragallinarum*.
- Se estableció como concentración ideal de cebadores 0.15 µM para la para una prueba basada en PCR-RFLP para la tipificación de *A. paragallinarum*.
- Se estableció una concentración de 8.53×10^3 copias de ADN/µl como límite de detección para una prueba basada en PCR-RFLP para la tipificación de *A. paragallinarum*.
- Se establecieron nueve perfiles de restricción para *Avibacterium paragallinarum* únicos para cada serotipo, que permite tipificar con éxito aislamientos de campo y cepas de referencia con un grado de coincidencia de 92.3 %.

VI. RECOMENDACIONES

- Purificar el producto de PCR para poder cuantificar la concentración inicial de ADN previo a la prueba RFLP para partir de una concentración única estandarizada.
- Evaluar un mayor número de muestras con el objetivo de determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba.
- Determinar la prevalencia de los serotipos de *A. paragallinarum* en aislados peruanos con el fin de producir vacunas específicas.
- Implementar la metodología propuesta en galpones de crianza como estrategia de prevención de brotes y vigilancia epidemiológica.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS

Anjaneya, A., Singh, S., Dhama, K., Wani, M., Gowthaman, V. and Chawak, M. (2014). Molecular Characterization of *Avibacterium paragallinarum* Isolated from Poultry Flocks of India. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(7), pp.440-451.

Araya-Hidalgo, E., Gutiérrez-Jiménez, C., Chaves-Ramírez, M., Suárez-Esquivel, M., Guzmán-Verri, C., & Barquero-Calvo, E. (2017). Sequence analysis of the hypervariable region in hmtp210 of *Avibacterium paragallinarum*. *The Journal of veterinary medical science*, 79(7), 1210–1214.

Blackall, P. & Reid, G.(1987). Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxideadsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Diseases*, 31, pp. 527-53

Blackall, P., Eaves, L. y Aus, G. (1990). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page Scheme: Comparison of the Use of Agglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. *Avian Diseases*, 34(3), p.643

Blackall, P., Eaves, L. y Rogers, D. (1990): Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *Journal Clinical Microbiology*, 28(11), p. 1185-1187.

Blackall, P., Matsumoto, M. & Yamamoto, R. (1997) *Infectious coryza*. *Poultry diseases*. 10th ed. Ames. pp.179-190.

Blackall, P., Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, L. and Bisgaard, M. (2005). Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 55, pp353-62.

Blackall, P. & Soriano-Vargas, E. (2017). Infectious coryza and related bacterial infections. In: D. Swayne, J. Glisson, L. McDougald, L. Kolan, D. Suarez and V. Nair, ed., *Diseases of poultry*, 13th ed. Ames, United States: Wiley-Blackwell, pp.859-868.

Bolivar, A., Rojas, A. & Garcia-Lugo P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed.* 3, pp 25-33

Cabrera, A., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C., Blackall, P. y Soriano-Vargas, E. (2010). Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, 43(3), pp.549-551.

Calderón, E., Thomas, K., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C. y Soriano-Vargas, E. (2010). Identification of *Avibacterium paragallinarum* Serovar B-1 from Severe Infectious Coryza Outbreaks in Panama. *Avian Diseases Digest*, 5(3), pp. 38-39.

Chen, X., Mifflin, J., Zhang, P. y Blackall, P. (1996). Development and Application of DNA Probes and PCR Tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*, 40(2), p.398.

Christensen, H., Blackall, P., y Bisgaard, M. (2009). Phylogenetic relationships of unclassified, satellitic Pasteurellaceae obtained from different species of birds as demonstrated by 16S rRNA gene sequence comparison. *Research Microbiology*, 160(1), pp. 315-321.

Corney, B., Diallo, I., Wright, L., Hewitson, G., De Jong, A., Tolosa, X., Burrell, P., Duffy, P., Rodwell, B., Boyle, D. y Blackall, P. (2008). Rapid and sensitive detection of *Avibacterium paragallinarum* in the presence of other bacteria using a 5' Taq nuclease assay: a new tool for diagnosing infectious coryza. *Avian Pathology*, 37(6), pp.599-604.

Droual, R., Bickford, A., Charlton, B., Cooper, GL (1990) Outbreak of infectious coryza in Northern California. *Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference*.

Gariyban, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*. 133(3), pp. 1–4.

Glasel J. A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques*, 18(1), pp.62–63.

Kourkoumpetis, T. K., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Desalermos, A., & Mylonakis, E. (2012). Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 54(9), pp.1322–1331.

Kume, K., Sawata, A., Nakai, T. y Matsumoto M. (1983). Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *Journal Clinical Microbiology*, 17(1), pp. 958-964

Harper, M., John, M., Turni, C., Edmunds, M., St Michael, F., Adler, B., Blackall, P.J., Cox, A.D. y Boyce, J.D. (2015). Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *Journal Clinical Microbiology*. 53(1), pp. 477–485.

Herráez, Á. (2012). Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud (2a. ed.--). Barcelona: Elsevier.

Mandakovic, D., Glasner, B., Maldonado, J., Aravena, P., González, M., Cambiazo, V, & Pulgar, R. (2016) Genomic-Based Restriction Enzyme Selection for Specific Detection of *Piscirickettsia salmonis* by 16S rDNA PCR-RFLP. *Front. Microbiol.* 7:643

Matveeva, O., Foley, B., Nemtsov, V. (2004). Identification of regions in multiple sequence alignments thermodynamically suitable for targeting by consensus oligonucleotides: application to HIV genome. *BMC Bioinformatics*. 5, pp.44.

Mifflin, J., Chen, X. and Blackall, P. (1997). Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping. *Avian Pathology*, 26(1), pp. 119-127.

MINAGRI, M. (2018). Boletín estadístico mensual de la producción y comercialización de productos avícolas. Lima: MINAGRI

Morales-Erasto, V., Posadas-Quintana, J., Fernández-Díaz, M., Saravia, L., Martínez-Castañeda, J., Blackall, P. and Soriano-Vargas, E. (2014). An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(2), pp.272-276.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 51(1), pp.263–273.
- Noro, T., Yaguchi, K., Amimoto, K. y Oishi, E. (2007). Identification and Expression of a Gene Encoding an Epitope that Induces Hemagglutination Inhibition Antibody to *Avibacterium paragallinarum* Serovar A. *Avian Diseases*, 51(1), pp.84-89.
- Noro, T., Oishi, E., Kaneshige, T., Yaguchi, K., Amimoto, K. y Shimizu, M. (2008). Identification and characterization of haemagglutinin epitopes of *Avibacterium paragallinarum* serovar C. *Veterinary Microbiology*, 131(3-4), pp.406-413.
- Page, L. (1962). *Haemophilus* Infections in Chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 23(1), pp.85-95.
- Roux K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009(4).
- Sakamoto, R., Kino, Y. y Sakaguchi, M. (2012). Development of a Multiplex PCR and PCR-RFLP Method for Serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), pp.271-273.
- Sandoval, V., Terzolo H., Blackall P. (1994). Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. *Journal Avian Diseases*. 38, pp.672-678
- Sint, D., Raso, L. and Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*. 3, pp. 898-905.
- Soriano-Vargas, E., Téllez, G., Hargis, B., Newberry, L., Salgado-Miranda, C. y Vázquez, J. (2004). Typing of *Haemophilus paragallinarum* Strains by Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Based Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, 48(4), pp.890-895.
- Thornton, B. & Basu, C. (2011). Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 39 (2): pp. 145-54

Turni, C., Singh, R., Schembri, M. y Blackall, P. (2014). Evaluation of a multiplex PCR to identify and serotype *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 5, 7, 12 and 15. *Letters in Applied Microbiology*, 59(4), pp.362-369.

VanGuilder, H, Vrana, K. & Freeman, W. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. 44(5), pp. 619–626.

Whang, H., Sun, H., Blackall, P., Zhang, Z., Zhou, H., Xu, F. y Chen, X. (2016). Evaluation of a proposed molecular methodology for the serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), pp.555-560.

Wroblewski, D., Halse, T., Hayes, J., Kohlerschmidt, D. y Musser, K. (2013). Utilization of a real-time PCR approach for *Haemophilus influenzae* serotype determination as an alternative to the slide agglutination test. *Molecular and Cellular Probes*, 27(2), pp.86-89.

Wu, J., Wu, Y., Shien, J., Hsu, Y., Chen, C., Shieh, H. y Chang, P. (2011). Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine*, 29(4), pp.660-667.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, PP.134.

VII.ANEXOS

Anexo 1. Caldo Infusión Cerebro – Corazón

Componentes	g/L
Dextrosa	2.0
Peptona de gelatina	10.0
Infusión de corazón	10.0
Fosfato disódico	2.5
Cloruro sódico	5.0
Infusión de cerebro	7.5

Anexo 2. Secuencias nucleotídicas (formato fasta) utilizadas para el alineamiento

>A1KU143734.1 Avibacterium paragallinarum 221 Hmtp210 (hmtp210) gene, partial cds

```
GATGGCACAATTACATTTACAAAATATTGGCGGCACAGGGCAAGCTACAATCCACGATGCGATTAATAATG
TTCTCACTAAAGGGATCTACCTTAAAGCGGATCAGAATGATCCAACAGGAAATCAAGGTCAGAAAGTGG
ACTTGGTAATGCAATAACGCTTTCGGCAACAAATCAATGGGCGAATAACGGCGTAAATTTATAAAACGAAC
AATTTAACCACCTTATAATTCACAAAATGGCAGATTTTATTTGGAATGCGTGAAGATCCAAGTGTAATAAC
AAATTACAGCGGGAACCTATAATACAACGGGTGATGCGAACAATAAAAAATCAACTAAATAATACACTTCA
ACAAACCACGCTTGAAGCAACTGGGATCACCAGTAGCGTAGGTTCAACTAAGCTGCGCTTTAGCTTA
GGGGCAGACAGCGTCACTTCTCGAAAGGTGGAGCTGGCAGCGTGAACCTTTCTGGCGTAAGCGATGCCA
CAGCCGACACCGACGCTGCCACTCTAAAACAAGTGAAGAATACCGCACAACATTAGTGGGTGATAATGA
CATCACCGCAGCAGATCGTAGTGGCGGCACAAGCAATGGCATTACCTACAACCTAAGCCTTAATAAAGGT
ACGGTTTCGGCAACAGAAGAAAAAGTGGTGTGAGGGAAAACCTGTCTATGAAGCCATTAGAAATGCCATCA
CAGGCAACATCTTACAATTGGCTTAGACGATACCACCTTGAACAAAATCAACAATCCCGCGGATCAAGA
TCTTTCAAACCTCAGTGAAGTGGCAAAAATGCCATTACGGGCTTAGTGGATGTGGTGAACAAAACAAAT
TCACCGATCACAGTTGAGCCTTCTACCGATAGCAACAAGAAAAAACCTTCACTGTAGGCGTGGATTTCA
CCGATACCATTACGGAAGGTGACGCAACGGATGATAAAAAACCTGACGACTTCAAAATCCGTTGAAAGCTA
TGTCACAAACAACTCGCAACTTCTCTACAGATATTTTGTATCGGATGGGCGTTCTGGTAACGCAACA
ACGGCAAAATGATGGGGTGGGTAAACGTCGTTTTGTCTGATGGCTTTACGATCAAATCTGAAAACCTTACGC
TAGGTTCAAAAACAATATAATGGCTCTGATAGCTTAGGGGTAATGTATGACGATCAAAATGGGGTCTTTAA
ATTAAGCCTAAATATGACCGCACTTACCACCTCATTGGCTAATACTTTTCGCGAAGTTGGATGCCTCTAAC
CTTACTGATGATAGCAATAAAGAGAAATGGCGTACTGCGTTGAATGTGTATTCAAAAACAGAAGTAGATG
CAGAAATTCAAAAATCCAAGGTAACACTCACACCAGATTCGGGTTTGATCTTTGCGACCAACAAGCTGG
GAGTGGTAATAACGCAGGTATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTCGCCGATGGGGATATTTCT
CCAACCAGTGGTGTAGTGTGACAGGTGTCAGCTCTACGCCCTAATGCAGAAAGGTATTTCGCGTGTATG
GTGATGAAGTTAGTCCAACGAAAGACTCAAAACAACAGCACCTACAAATGCAAACCAACTGCGACGACAGC
ACCTACAGCATCTAGCACTCAAGGT
```

>A2KU143736.1 Avibacterium paragallinarum strain 2403 Hmtp210 (hmtp210) gene, partial cds

```
GATGGCACAATTACATTTACAAAATATTGGCGGCACAGGGCAAGATACAATCCACGATGCGATTAATAATG
TTCTCACCAAATGATCTCGCTTTCGGCAACAGAAGAAGAAGTGGTGTGAGGGGAAGCTGTCTATGAAGC
ACTTAAAGGTGCAAAAACCAACGGTTTCAGCAGAAGCCAACAAAGGCATTACTGGCTTGGTGGATGTGGTG
AAAAAAGCAAATTCACCGATCACAGTTGAGCCTTCTACCGATAACAACAAGAAAAAACCTTCACTGTGC
GCTTAATGAAAGACATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAGTCAGGGCAAGATCCAAATCAAGT
TACGGGCAGAATGAGCAGTGCAGGTTTAACTTCAAAAAAGGCGACACAACAATGGTTCAACCACCACT
TTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTTGATAGCACAACAATTTCTGCTCAAACAACCTTAGTGAAAGTAAGTC
GTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTAGCCCCGACAAAATTTATCTATCGGTGC
GGAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAGCGGATAACACCTCCGATAAA
```

TCTCGCATCACCTTAGCCCAAGATGCGATTACTCTTGCGGGGAACGCAACCGGAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTCAGATGGTAAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACCTTATTAGGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGATGTGAAGCAAGCTCTTACCGATGCGACATTGGCATATAAAGCGGACAATAAAAACGGTAAAACAGTTAAATTGACTGACGGATTGAATTTTACTAGCACGACCAATATTGATGCTTCAGTGAAGATAGTGGTGTGGTGAAATTCACCTTAAAAGATAAAATTAATAGGCTTAAAACTATCGCAACTGAATCTTTGAATGCTTCTCGAAATATCATCGCTGGCGGCACAGTAACCGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAGGAAATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCAGCAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGTGAAAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTCAGTTAGATAAACTTTTTTAAAGCGATCAATGACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAGATCCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAAACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGGATCAAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGGTATTGATGGTATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTCGCCGATGGGGATATTTCTCCAACCAGTGGTGTAGTGTAGTGACAGGTCGTCAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAAGGTATTCGCGTGTATGGTGTGAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCACTCAAGGT

>A3KU143737.1 Avibacterium paragallinarum strain E-3C Hmtp210 (hmtp210) gene, partial cds

GATGGCACAATTACATTTACAGATATTGGCGGCACAGGGCAAATACAATCCACGATGCGATTAATAATGTTCTCATCAAATACCTTAAAGCGGATAAGAATGATCCAACAGGAAATAAAAGTGAGAAAGTGGAACCTGGTAATGCAATAACGCTTTTGGTGGATGTGGTGAAAAAAGCAGATTCACCGATCACAGTTGAGTCTTCTACCATAAACAAACAAGAAAAAACCTTCACTGTCCGGCTTAGTGAAAGAAAATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAGTCAGGGCAAGGTCAAAAATCAAGTTACGGGCAAATGAGCAGTGCAGGTTTAACTTCAAAAAAGGGCAACCAACAAATGGTTCAACCACCACTTTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTGATAGCACAGCTCAACAAACTTAGTGAAAGTAAGTCGTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTAGCCCGACAAAAATTATCTATCGGTGCGGAAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAGCGAATAACACTGCCGATAAAATCTCGCATCACCTTAGCCCAAGATGCGATTACCTTTCGGGGGAACGCAACAGGAACGGCGATTAAATTTGACTGGCGTTGCAGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACCTTATTAGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGATGTGAAGCAAGCTTACCAGATGCGACATTGGCATATAAAGCGGACAATAAAAACGGTAAAACAGTTAAATTTGACTGACGGATTGAATTTTACTAGCACGACCAATATTGGCGCCTCAGTAGAAGATAGTGGTGTGGTGAAATTCACCTTAAAAGATCGATTAACAGGCTTAAAACTATCGCAACTGAGTCTTTGAATGCTTCTCAAAAACATTAATGCTGGCGGCACAGTAACCGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAGGAAATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCAGCAACAGATGGTATTAAAGTCTCTGGCGTGAAAGCGGGACAGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTCAGTTAGATAAACTTTTTAAAGCGATCAATGACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAATTCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAAACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCAACCGTGTGAATACAGGTTGGGGATCAAAGGTAGGTATTTTGGGAACAGGTATTGATGGTATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTGCGCGATGGGGATATTTCTCCAACCAGTGGTGTAGTGTAGTGACAGGTCGTCAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAAGGTATTCGCGTGTATGGTGTAAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCACTCAAGGT

>A4KU143738.1 Avibacterium paragallinarum strain HP14 Hmtp210 (hmtp210) gene, partial cds

GATGGCACAATTACATTTACAGATATTGGCGGCACAGGGCAAATACAATCCACGATGCGATTAATAATGTTCTCATCAAATACCTTAAAGCGGATAAGAATGATCCAACAGGAAATAAAAGTGAGAAAGTGGAACCTGGTAATGCAATAACGCTTTTGGTGGATGTGGTGAAAAAAGCAGATTCACCGATCACAGTTGAGTCTTCTACCATAAACAAACAAGAAAAAACCTTCACTGTCCGGCTTAGTGAAAGAAAATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAGTCAGGGCAAGATCCAAATCAAGTTACGGGCGAATGAGCAGTGCAGGTTTAACTTCAAAAAAGGGCACACAACAAATGGTTCAACCACCACTTTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTGATAGCACAAACAAATCTGCTCAAAACAACTTAGTGAAAAGTAAGTCGTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAAATTAGCCCCGACAAAAATTATCTATCGGTGCGGAAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGAATAACACAACAGGTAAATCAAGCATTACGTTATCGGACAGTGCATTACCTTGTGCGGGCTACAGCTGGAAATGCGATTAACCTCACTGGCGTTGCAGATGGCAGCATTACAGCAGGTTCAAAGATGCGGTGAAATGGGGGGCAGTTGCGTACCTTATTAGGGTTGATAGCGGGGCTAAAATTGGCGGTACTGA

GAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGATGTGAAGCAAGCTCTTACCGATGCGAAATTGGCATATAAA
GCGGACAATAAAAAACAGTAAAACAGTTAAATTGACTGACGGATTGAATTTTACTAGCAGCACCATAATTG
ATGCTTCAGTGGAAAGATAGTGGTGTGGTGAATTCACCTTAAAAGATAAATTAATAGGCTTAAAAACTAT
CGCAACTGAATCTTTGAATGCTTCTCGAAATATCATCGCTGGCGGCACAGTAACCGTGGCGGGCGAGACA
GAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAGGAAATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATG
CAGCAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGTGAAAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGG
TCAGTTAGATAAACTTTTTAAAGCGATCAATGACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAGAT
CCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAAACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATA
AATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGGATCAAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGGTATTGATGGTAT
TGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTCGCCGATGGGGATATTTCTCCAACCAGTGGTGTAGTGTG
ACAGGTCGTCAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAAGGTATTCGCGTGTATGGTGTGAAGTTAGTCCAACGA
AGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCACTCAAGGT

**>B1KU143739.1 Avibacterium paragallinarum strain 0222 Hmtp210 (hmtp210)
gene, partial cds**

GATGGCACAAATTACATTTACAAATATTGGCGGCACAGGGCAAGATACAATCCACGATGCGATTAATGATG
TTCTCACCAAATGATCTCGCTTTTCGGCAACAGAAGAAGTGGTGTGAGGGGAAGCTGTCTATGAAGC
ACTTAAAGGTGCAAAAACCAACGGTTTCAGCAGAAGCCAACAAAGGCATTACTGGCTTGGTGGATGTGGTG
AAAAAAGCAAATTCACCGATCACAGTTGAGCCTTCTACCGATAACAACAAGAAAAAACCTTCACTGTGCG
GCTTAATGAAAGACATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAAGTCAGGGCAAGATCCAAATCAAGT
TACGGGCAGAATGAGCAGTGCAGGGTTAACCTTCAAAAAAGGCGACACAACAAATGGTTCAACCACCACT
TTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTTGATAGCACACAACAAATTCCTGCTCAAACAACTTAGTGAAAGTAAGTC
GTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTAGCCCCGACAAAATATCTATCGGTGC
GGAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAA
TCTCGCATCACCTTAGCCCAAGATGCGATTACTCTTTCGGGGAACGCAACCAGAACGGCGATTAAATTGA
CTGGTGTGTCAGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACCTT
ATTAGGGGTTGATAGCGGGGCTAAAAATTGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGAT
GTGAAGCAAGCTCTTACCGATGCGACATTGGCATAATAAAGCGGACAATAAAAAACGGTAAAACAGTTAAAT
TGACTGACGGATTGAATTTTACTAGCAGCACCATAATTGGCGCCTCAGTAGAAGATAGTGGTGTGGTGAA
ATTACCTTAAAAGATCGATTAACAGGCTTAAAAACTATCGCAACTGAGTCTTTGAATGCTTCTCAAAC
ATTATTGCTGGCGGCACAGTAACCGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAG
GAAATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCAGCAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGT
GAAAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTGAGTTAGATAAACTTTTTTAAAGCGATCAAT
GACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAGATCCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAA
ACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGA
ATTAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGATATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTCGCCGATGGG
GATATTTCTCCAACCAGTGGTGTAGTGTGACAGGTCGTCAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAAGGTATTC
GCGTGTATGGTGTGAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCACTCAAGG

**>C1KU143741.1 Avibacterium paragallinarum strain H-18 Hmtp210 (hmtp210)
gene, partial cds**

GATGGCACAAATTACATTTACAAATATTGGCGGCACAGGGCAAGATACAATCCACGATGCGATTAATAATG
TTCTCACCAAATGATCTCGCTTTTCGGCAACAGAAGAAGTGGTGTGAGGGGAACCTGTCTATGAACC
ACTTAAAGGTGCAAAAACCAACGGTTTCAGCAGAAGCCAACAAAGGCATTACTGGCTTGGTGGATGTGGTG
AAAAAAGCAAATTCACCGATCACAGTTGAGCCTTCTACCGATAACAACAAGAAAAAACCTTCACTGTGCG
GCTTAATGAAAGACATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAAGTCAGGGCAAGATCCAAATCAAGT
TACGGGCAGAATGAGCAGTGCAGGGTTAACCTTCAAAAAAGGCGACACAACAAATGGTTCAACCACCACT
TTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTTGATAGCACACAACAAATTCCTGCTCAAACAACTTAGTGAAAGTAAGTC
GTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTAGCCCCGACAAAATATCTATCGGTGC
GGAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAA
TCTCGCATCACCTTAGCCCAAGATGCGATTACTCTTTCGGGGAACGCAACCAGAACGGCGATTAAATTGA
CTGGTGTGTCAGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT
ATTAGGGGTTGATAGCGGGGCTAAAAATTGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGAT
GTGAACAGGCTCTCACTAATGCGACCTTAGCATATAAAGCGGACAGTAAAACGATAAAAACGGTAAAT
TGACTGAAGGATTGAATTTTACTAGCAGCACCATAATTGACGCCCTCAGTAGAAGATAGTGGTGTGGTGAA
ATTACCTTAAAAGATCGATTAACAGGCTTAAAAACTATCGCAACTGAGTCTTTGAATGCTTCTCAAAC
ATTATTGCTGGCGGCACAGTAACCGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAG
GAAATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCAGCAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGT
GAAAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTGAGTTAGATAAACTTTTTTAAAGCGATCAAT

GACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAGATCCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAA
ACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGG
ATTAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGATATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTCGCCGATGGG
GATATTTCTCCAACCAGTGGTGATGTAGTGACAGGTCGTGAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAAGGTATTC
GCGTGTATGGTGATGAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCACTCAAGG

**>C2KU143742.1 Avibacterium paragallinarum strain Modesto Hmtp210 (hmtp210)
gene, partial cds**

GATGGCACAATTACATTTACAAATATTTGGCGGCACAGGGCAAGATACAATCCACGATGCGATTAATAATG
TTCTCACCAAATGATCTCGCTTTCGGCAACAGAAGAAGAAGTGGTGTGAGGGGAAGCTGTCTATGATGC
ACTTAAAGGTGCAAAAACCAACGGTTCAGCAGAAGCCAACAAAGGCATTACTGGCTTGGTGGATGTGGTG
AAAAAAGCAAATTCACCGATCACAGTTGAGCCTTCTACCGATAACAACAAGAAAAAACCTTCACTGTCTG
GCTTAATGAAAGACATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAGTCAGGGCAAGATCTAAATCAAGT
TACGGGCAGAATGAGCAGTGCAGGTTTAACTTCAAAAAAGGCGACACAACAATGGTTCAACCACCACT
TTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTTGATAGCACACAATTTCTGCTCAAACAACTTAGTGAAAGTAAGTC
GTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTTAGCCTCGACAAAATTTATCTATCGGTGC
GGAAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAA
TCTAGCATCACCTTAGCCCAAGATGCGATTACTCTTGCAGGGGAACGCAACCGGAACGGCGATTAATTTGA
CTGGTGTTCAGATGGCAACATTACGGTAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACCTT
ATTAGGGGTTGATAGCGGGGCTAAAAATGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGAT
GTGAAGCAAGCTCTTACCGATGCGACATTGGCATATAAAGCGGACAATAAAAACGGTAAAACAGTTAAAT
TGACTGACGGATTGAATTTTACTAGCACGACCAATATTGATGCTTCAGTGGAAGATAACGGTGTGGTGAA
ATTCACCTTAAAAGATAAATTAACAGGCTTAAAAACTATCGCAACTGAATCTTTGAATGCTTCTCAAAAT
ATCATCGCTGGCGGTACGGTAAACAGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAG
GAAATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCAGCAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGT
GAAAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTCAGTTAGATAAACTTTTTAAAGCGATCAAT
GACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAAAATCCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAA
ACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGG
ATCAAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGGTATTGATGGTATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTC
GCCGATGGGATATTTCTCCAACCAGTGGTGATGTAGTGACAGGTCGTGAGCTCTACGCCTTAATGCAGA
AAGGTATTCGCGTGTATGGTGTATGAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAG
CACTCAAGGT

**>C3KU143743.1 Avibacterium paragallinarum strain SA-3 Hmtp210 (hmtp210)
gene, partial cds**

GATGGCACAATTACATTTACAAATATTTGGCGGCACAGGGCAAGATACAATCCACGATGCGATTAATAATG
TTCTCACCAAATGATCTCGCTTTCGGCAACAGAAGAAGAAGTGGTGTGAGGGGAAGGTGTCTATGATGC
ACTTAAAGGTGCAAAAACCAACGGTTCAGCAGAAGCCAACAAAGGCATTACTGGCTTGGTGGATGTGGTG
AAAAAAGCAAATTCACCGATCACAGTTGAGCATTCTACCGATAACAACAAGAAAAAACCTTCACTGTCTG
GCTTAATGAAAGACATTGAAGGGGTAAACAGCATTACCTTTGATAAGCCAGGGCAAGATCTAAATCAAGT
TACGGGCAGAATGAGCAGTGCAGGTTTAACTTCAAAAAAGGCGACACAACAATGGTTCAACCACCACT
TTTGCAGAAGATGGCTTAACCATTTGATAGCACACAATTTCTGCTCAAACAACTTAGTGAAAGTAAGTC
GTGATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTTAGCCTCGACAAAATTTATCTATCGGTGC
GGAAAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAA
TCTCGCATCACCTTAGCCCAAGATGCGATTACTCTTGCAGGGGAACGCAACCGGAACGGCGATTAATTTGA
CTGGTGTTCAGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT
ATTAGGGGTTGATAGCGGGGCTAAAAATGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGAT
GTGAAGCAAGCTCTCACCAATGCAACCTTAGCATATAAAGCGGACAATAAAAACGGTAAAACAGTTAAAT
TGACTGACGGATTGAATTTTACTAGCACGACCAATATTGATGCTTCAGTGGAAGATAGTGGTGTGGTGAA
ATTCACCTTAAAAGATCGATTAACAGGCTTAAAAACTATCGCAACTGAGTCTTTGAATGCTTCTCAAAAC
ATTATTGCTGGCGGCACAGTACAGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAG
GAAATGACCCGACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCGGTAAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGT
GAAAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTCAGTTAGATAAACTTTTTAAAGCGATCAAT
GACGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAAAATCCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAA
ACGGCACGGCTCCAACCACCTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGG
ATTAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGGTATTGATGCTGGGAATAAGAAAATTAGTAATGTCGCCGATGGG
GATATTTCTCCAACCAGTGGTGATGTAGTGACAGGTCGTGAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAAGGTATTC
GCCTGTATGGTGATGAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCACTCAAGG

**>C4KU143744.1 Avibacterium paragallinarum strain HP60 Hmtp210 (hmtp210)
gene, partial cds**

GATGGCACAATTACATTTACAAATATTGGCGGCACAGGGCAAGATAACAATCCACGATGCGATTAATAATG
TTCTCACCAAATGATCTCGCTTTCGGCAACAGAAGAAGTGGTGTGAGGGAAAGCTGTCTATGAAGCACT
TAAAAGTGCAAAACCAACAACGGTTTCAGCAGAAGCCAACAAAGGCATTAAAGTTACTGGCGAGAAATCA
TCAAACACCACAGGCAACAGCTTCACAATTGGCTTAGACGATGCCACCTTGAACAAAAATCAACAATGCCG
CGAATCAAGATCTTTCAAACCTCGGTGAATATGGCAAAAAATGCCATTACTGGCTTGGTGGATGTGGTGAA
AAAAAGCAAAATTCACCGATCACAGTTGAGTCTTCTACCGATAACAACAAGAAAAAACCTTCACTGTCCGC
TTAGAGAAAAACATTACAGAGGTAAAACAGCATTACCTTTGATAAGTCAGGGCAAGATCCAAATCAAGTTA
CGGGCAGAATGAGCAGTGCAGGGTTAACCTTCAAAAAAGGGCAGACACAACAATGGTTCAACCACCACTTT
TGCAGAAGATGGCTTAACCATTGATAGCACACAACAATTTCTGCTCAAACAACTTAGTGAAAGTAAGTCGT
GATGGCTTCTCGGTGAAAAATGGCAGCGATGAAAGCAAATTAGCCCCGACAAAATTTATCTATCGGTGCGG
AAAATGCAGAACACGTTGAAGTAACTAAATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGAATAACACAACAGGTAAATC
AAGCATTACGTTATCGGACAGTGCATTACCCCTTGCTGCGGCTACAGCTGGAAATGCGATTAAACTCACT
GGCGTTGCAGATGGCAGCATTACAGCAGGTTCAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACCTTAT
TAGGGGTTGATAGCGGGGCTAAAAATGGCGGTACTGAGAAAACAACGATCAGTGAAGCCATTTCTGATGT
GAAGCAAGCTCTTACCGATGCGAAAATGGGCATATAAAGCGGACAATAAAAAACAGTAAAACAGTTAAATTG
ACTGACGGATTGAATTTTACTAGCACGACCAATATTGATGCTTCAGTGGAAGATAGTGGTGTGGTGAAT
TCACCTTAAAAGATAAAATTAATAGGCTTAAAACTATCGCAACTGAATCTTTGAATGCTTCTCGAAATAT
CATCGCTGGCGGCACAGTAACCGTGGGCGGCGAGACAGAGGGCATTGTGCTAACAAAATCTGGCTCAGGA
AATGACCGCACTTTATCTTTATCTGGTGCAGGCAATGCAGCAACAGATGGCATTAAAGTCTCTGGCGTGA
AAGCAGGGACGGCAGACACCGATGCGGTGAATAAAGGTCAGTTAGATAAACTTTTTTAAAGCGATCAATGA
CGCATTAGGCACAACAGATTTAGCGGTAACCAAAGATCCAAATCAAACCTCTATCTTTAATCCGATAAAC
GGCACGGCTCCAACCACCTTTTAAAGACGCGGTGGATAAAATTAACCACCGCTGTGAATACAGGTTGGGGAT
CAAAGGTAGGTATTTTGGCAACAGGTATTGATGGTATTGATGCTGGGAATAAGAAAAATAGTAATGTCCG
CGATGGGGATATTTCTCCAACCAGTGGTGTAGTGTGACAGGTCGTCAGCTCTACGCCTTAATGCAGAAA
GGTATTCGCGTGTATGGTGTATGAAGTTAGTCCAACGAAGACTCAAACAACAGCACCTACAGCATCTAGCA
CTCAAGGT



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo, Bryan Oliver Velásquez Colque

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación	<input type="checkbox"/>	Ingeniería	<input type="checkbox"/>
Escuela Profesional:	Biotecnología					
Departamento Académico:	Ciencias					
Escuela de Posgrado	Maestría	<input type="checkbox"/>	Doctorado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Programa:						
De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:						
Estandarización de una prueba basada en PCR-RFLP del gen <i>HMTp210</i> para la tipificación molecular de <i>Avibacterium paragallinarum</i>						
presentado en 52 folios, para la obtención del Grado académico:					()	
Título profesional:	(X)	Investigación anual:		()	()	
<ul style="list-style-type: none">➤ He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.➤ Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.➤ Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.➤ De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.						
Nuevo Chimbote, 10 de Abril de 2023						
Firma:						
Nombres y Apellidos: Bryan Oliver Velásquez Colque						
DNI: 72944160						

NOTA: **Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesisistas e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.**