

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



Detección molecular de *Bordetella bronchiseptica* en *Canis familiaris*, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022

TESIS

**Para optar el Título profesional de Médico Veterinario y
Zootecnista**

Bach. Flores Sánchez, Lesly

Tumbes, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VATERINARIA Y ZOOTECNIA**



Detección molecular de *Bordetella bronchiseptica* en *Canis familiaris*, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Mg. Jorge Echevarría Flores (presidente):

Dr. Héctor Sánchez Suarez (secretario):

Mg. Víctor Guzmán Tripul (vocal):

Tumbes, 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VATERINARIA Y ZOOTECNIA**



Detección molecular de *Bordetella bronchiseptica* en *Canis familiaris*, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma.

Bach. Lesly Flores Sánchez (Autor):

Dra. Rosa Liliana Solis Castro (Asesor):

Dra. Rosa Liliana Solis Castro
Asesora de Tesis
Orcid 0000-0002-1813-8644

Tumbes, 2023

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO
SECRETARIA ACADÉMICA



"AÑO DE LA UNIDAD, LAPAZ Y EL DESARROLLO"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los diecisiete días del mes de febrero del dos mil veintitrés, siendo las ~~.....~~ ^{Doce} horas y ~~.....~~ ^{Cincuenta} minutos, en el Laboratorio de bioquímica en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Tumbes, se reunieron el Jurado Calificador, ratificado por **Resolución N° 015-2022/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D**, el Mg. JORGE OSWALDO ECHEVARRÍA FLORES (Presidente), Dr. HÉCTOR ALFREDO SÁNCHEZ SUÁREZ (Secretario) y Mg. VÍCTOR SANTOS GUZMÁN TRIPUL (Vocal), reconociendo en la misma resolución además, a la Dra. ROSA LILIANA SOLÍS CASTRO como asesora, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: "**Detección molecular de *Bordetella bronchiseptica* en *Canis familiaris*, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes-2022**", para optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista, presentado por la: **Br. FLORES SÁNCHEZ LESLY**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del (la) sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara a la: **Br. FLORES SÁNCHEZ LESLY** con calificativo ~~.....~~ ^{APROBADA - MUY BUENO}. Se hace conocer a la sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica.

En consecuencia, queda APTA para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las ~~.....~~ ^{Doce} horas y ~~.....~~ ^{Cincuenta} minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, en forma presencial, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.

Tumbes, 17 de febrero del 2023

Mg. JORGE OSWALDO ECHEVARRÍA FLORES
DNI N° 02645807
Presidente

Dr. HÉCTOR ALFREDO SÁNCHEZ SUÁREZ
DNI N° 02837861
Secretario

Mg. VÍCTOR SANTOS GUZMÁN TRIPUL
DNI N° 18090530
Vocal

INFORME TURNITIN

Detección molecular de Bordetella bronchiseptica en Canis familiaris, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022

por Lesly Flores Sanchez

Fecha de entrega: 21-feb-2023 11:46p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2020211467

Nombre del archivo: Tesis_FLORES_LESLY_-_RLSC-2023.docx (6.2M)

Total de palabras: 7510

Total de caracteres: 41356



Dra. Rosa Liliana Solis Castro

Asesora de Tesis

Orcid 0000-0002-1813-8644

INFORME TURNITIN

Detección molecular de Bordetella bronchiseptica en Canis familiaris, urbanización Andrés Araujo Morán, Tumbes- 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%	9%	4%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	worldwidescience.org Fuente de Internet	1%
3	pt.scribd.com Fuente de Internet	1%
4	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1%
5	bmcvetres.biomedcentral.com Fuente de Internet	<1%
6	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1%
7	repository.ucc.edu.co Fuente de Internet	<1%
8	myslide.es Fuente de Internet	<1%
9	www.scielo.br Fuente de Internet	


Dra. Rosa Liliana Solis Castro
Asesora de Tesis
Orcid 0000-0002-1813-8644

INFORME TURNITIN

		<1 %
10	academic.oup.com Fuente de Internet	<1 %
11	Nicole Guiso, Nicolas Hegerle. " Other s, lessons for and from pertussis vaccines ", Expert Review of Vaccines, 2014 Publicación	<1 %
12	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
13	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	<1 %
14	repository.lasallista.edu.co Fuente de Internet	<1 %
15	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
16	bdigital.dgse.uaa.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
17	moam.info Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.xoc.uam.mx Fuente de Internet	<1 %
19	www.scivac.org Fuente de Internet	<1 %


Dra. Rosa Liliana Solis Castro
Asesora de Tesis
Orcid 0000-0002-1813-8644

INFORME TURNITIN

20	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
21	www.theibfr.com Fuente de Internet	<1 %
22	es.wikipedia.org Fuente de Internet	<1 %
23	journaldatabase.info Fuente de Internet	<1 %
24	repositorio.utp.edu.co Fuente de Internet	<1 %
25	new.medigraphic.com Fuente de Internet	<1 %
26	nexusacademicpublishers.com Fuente de Internet	<1 %
27	www.zora.uzh.ch Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo


Dra. Rosa Liliana Solis Castro
Asesora de Tesis
Orcid 0000-0002-1813-8644

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, a mis hermanos, a mi tía
Doris, a mis abuelos y mi hija Allison, por ser la
fuerza fundamental en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su gracia y fortaleza que me brinda día a día.

A mis padres y a mi hija Allison, quienes en momentos difíciles fueron pilares fundamentales para continuar con esta meta trazada.

A mi asesora Dra. Rosa Liliana Solis Castro, por sus virtudes con sus aportes profesionales, su constancia y su tiempo brindado.

A todas aquellas personas que contribuyeron en mi proceso académico y elaboración de este trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ESTADO DEL ARTE.....	3
2.1. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	3
2.2. Traqueobronquitis infecciosa canina	4
2.3. Contagio y diseminación.	4
2.4. Signología.....	5
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Materiales	8
3.1.1. Materiales para la recolección de muestra:	8
3.1.2. Materiales para el procedimiento de siembra:	8
3.1.3. Materiales para el procedimiento de extracción de DNA:	8
3.1.4. Materiales para el procedimiento de PCR:	9
3.1.5. Materiales para el procedimiento de electroforesis:.....	9
3.2. Metodología	9
3.2.1. Muestreo.....	9
3.2.2. Metodología de hisopado:.....	11

3.2.3.	Metodología de siembra:.....	12
3.2.4.	Metodología para extracción de DNA:.....	14
3.2.5.	Medición de DNA:	15
3.2.6.	Metodología para PCR:.....	15
3.2.7.	Electroforesis en gel Agarosa:	17
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
V.	CONCLUSIONES	25
VI.	RECOMENDACIONES	26
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Lista de primers utilizados para la determinación de <i>Bordetella bronchiseptica</i> . 15	
Tabla 2. Mix de insumos para PCR 16	16
Tabla 3. Caracterización del termociclador para PCR 16	16
Tabla 4. Caninos positivos al género y especie de <i>Bordetella bronchiseptica</i> según la edad, sexo, raza y estilo de vida..... 23	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Recolección de datos en caninos muestreados.....	11
Figura 2. Toma de muestra (hisopado) en caninos de la urbanización Andrés Araujo Morán	12
Figura 3. KWIK-STIK <i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC® 4617™	13
Figura 4. Siembra de cepa <i>Bordetella bronchiseptica</i> en agar chocolate.....	13
Figura 5. Tinción Gram.....	14
Figura 6. Extracción de DNA obtenido.....	15
Figura 7. Procedimiento y uso del termociclador para PCR	17
Figura 8. Corrida de muestras de DNA en electroforesis.....	17
Figura 9. Procedimiento para electroforesis	18
Figura 10. Geles con muestras positivas a <i>Bordetella bronchiseptica</i> . A. Muestras positivas N° 7 y N° 10. B. Muestras positivas a especie <i>bronchiseptica</i> N° 7 y N° 43, positivo al género <i>Bordetella</i> N° 10.....	19
Figura 12. Medición de DNA	20
Figura 13. Porcentaje de casos positivos y negativos al género y especie <i>Bordetella bronchiseptica</i> , urbanización Andrés Araujo Morán, 2022	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado.....	30
Anexo 2. Ficha de recolección de datos.....	31
Anexo 3. Resumen de datos.....	32
Anexo 4. Medidas obtenidas de la extracción de DNA.....	33

RESUMEN

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

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa, *Bordetella bronchiseptica*, Traqueobronquitis infecciosa, diagnóstico, perros.

ABSTRACT

Bordetella bronchiseptica is the epidemiological agent of the canine infectious Tracheobronchitis respiratory disease known as "kennel cough", being its contagion very easily and quick, producing severe inflammation in the respiratory tract. This research had as main objective the identification of *B. bronchiseptica* in *Canis familiaris* through polymerase chain reaction (PCR) technique, using oligonucleotides and short DNA sequences (general and specific primers) for an accurate molecular detection. Likewise, the determination of the incidence of *B. bronchiseptica* in canines according to the type of breed, sex, age, and lifestyle. The sample was 45 canines from Andrés Araujo Morán urbanization, which were sampled using a nasopharyngeal swab and taken later for its study to the laboratory of Molecular Biology of the University of Tumbes. Statistical analysis was performed using the t-test and showed not statistically significant. The results showed that 4.44% of the canines sampled were positive for *B. bronchiseptica* and 2.22% to other species of the genus *Bordetella*.

Keywords: Polymerase chain reaction; *Bordetella bronchiseptica*, infectious tracheobronchitis; diagnosis; dogs

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias en caninos son múltiples y son causados por diversos patógenos. Uno de ellos, la bacteria *B. bronchiseptica*, es la causante de la enfermedad de Traqueobronquitis infecciosa canina, conocida también como Tos de las perreras (1). Esta enfermedad puede llevar al canino a una inmunosupresión debilitando su tracto respiratorio y por ende adquirir nuevas enfermedades, por lo que el hacinamiento y contacto con otros canes hace que sea rápidamente propagada (2).

Los problemas respiratorios incluyendo *B. bronchiseptica* son frecuentes a nivel mundial, sin embargo, en algunas ocasiones esta enfermedad puede evidenciarse desde unos signos de gripe común, como tos, fiebre, secreciones, hasta llegar a una neumonía, letargo y la muerte (3). Solo en países industrializados se tiene datos epidemiológicos de la presencia de este agente etiológico por lo cual es importante estudios de investigación en países en vías de desarrollo como el nuestro.

Durante la revisión bibliográfica no se han evidenciado reportes sobre la existencia de esta enfermedad en nuestro departamento. No en tanto, Tumbes por tener una variabilidad climática es propicio a que muchas enfermedades se establezcan en diversos animales, es de importancia determinar la presencia e incidencia de ellos, como el agente primario de Traqueobronquitis infecciosa canina, *B. bronchiseptica*. Esta bacteria en su forma infectante ataca a las vías respiratorias siendo perjudicial para los perros susceptibles y sin vacunación.

Así también, en el departamento de Tumbes, los caninos se encuentran susceptibles a enfermedades por el hacinamiento de caninos en las calles, hogares o clínicas veterinarias, adicionado a esto, la desinformación de los dueños sobre esta enfermedad.

Por lo tanto, determinando la existencia del patógeno, así como de la enfermedad permitirá tomar medidas de prevención y control respecto a ella.

Sin embargo, la determinación de la presencia del patógeno *B. bronchiseptica* mediante cultivo microbiológico no es fácilmente aislable, por lo cual, una manera de detectar la bacteria es a través de las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final o la PCR cuantitativa. La muestra se toma mediante hisopado nasal, debido a que por ser una enfermedad respiratoria el agente patógeno se encuentra en mayor cantidad y exclusivamente en el tracto respiratorio superior de los caninos (4).

Por lo expuesto anteriormente, para este trabajo se propusieron como objetivos la identificación de *B. bronchiseptica* en *Canis familiaris* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Asimismo, se determinó la incidencia de *B. bronchiseptica* en los caninos según el tipo de raza, sexo, edad y estilo de vida en la urbanización de Andrés Araujo Moran.

II. ESTADO DEL ARTE

Las enfermedades respiratorias están influenciadas por el cambio climático y estacionalidad, puede producir una mayor prevalencia de enfermedades respiratorias en los meses más fríos (6).

Una de las patologías más frecuentes de observar en los perros son las patologías del sistema respiratorio, y siendo de mayor frecuencia también en perros jóvenes (7).

2.1. *Bordetella bronchiseptica*

Se reconoce como agente etiológico principal del tracto respiratorio a *B. bronchiseptica*, provocando enfermedad no sólo en perros, también en conejos y cerdos (8).

Alvarez, señala que *B. bronchiseptica* tienen afinidad para colonizar el tracto respiratorio como tráquea, fosas nasales y pulmón (9), puede estar latente en el hospedero y al surgir estrés en el animal puede agravar la enfermedad causando los signos comunes de la enfermedad, llegando incluso a la muerte (10).

El mayor interés en *B. bronchiseptica* radica desde el animal hasta las pérdidas económicas por enfermedades respiratorias endémicas, las investigaciones seguirán aumentando, en particular en los países económicamente avanzados (11).

B. bronchiseptica es el agente causal de la enfermedad respiratoria de Traqueobronquitis infecciosa canina conocida como “tos de las perreras”, siendo el contagio muy fácil y rápidamente, llegando a producir cuadros graves de inflamación en las vías respiratorias, la tos seca y persistente es un signo muy marcado (12).

2.2. Traqueobronquitis infecciosa canina

Consiste en la afección del tracto respiratorio, comúnmente la tráquea y principales bronquios, surgiendo una mayor cantidad de casos positivos en temporadas de frío. La tos, siendo el signo más común de la enfermedad, puede tener una duración de varias semanas, surgiendo fiebre, secreciones y signos generales (13).

La Traqueobronquitis infecciosa canina tiene varios agentes etiológicos, siendo el principal una bacteria Gram negativa *B. bronchiseptica*, otros que influyen en esta enfermedad son: *Parainfluenza*, *adenovirus tipo 2* y *Mycoplasma sp*, actuando en su mayoría de veces como complicantes. *B. bronchiseptica* puede causar Traqueobronquitis infecciosa canina por sí sola (14).

2.3. Contagio y diseminación.

B. bronchiseptica tiene predilección en lugares de hacinamiento con poca ventilación y pésimas condiciones de higiene, hoy en día también puede diseminarse por diversas circunstancias: falta de vacunación, exposiciones, paseadores de perros, etc. La transmisión y la frecuencia de esta enfermedad son más altas entre los perros mantenidos bajo estricto confinamiento, como en la cría y perreras. “Tos de las perreras” ha sido considerada para ser una enfermedad muy compleja, siendo muy difícil de controlar la infección y propagación, llegando a veces al extremo de sacrificar a los perros infectados (14,15).

La propagación entre perros es similar al resfriado común en humanos, dándose por fluidos de la boca o nariz de perros infectados, otra forma de diseminar la enfermedad es a través del aire por estornudos o tos, así mismo por contacto con objetos inanimados o incluso por manipulación. Los gatos en ocasiones pueden tener un papel de portadores silenciosos (16). Todos los perros pueden ser susceptibles a la enfermedad, siendo los cachorros aún más propensos a la enfermedad a partir de los 45 días cuando los anticuerpos de la madre dejan de tener acción sobre ellos mediante el destete (17).

2.4. Signología.

Al infectarse un perro usualmente inicia con tos seca, seguido de estornudos, secreciones nasales, dificultad para respirar, debilidad, en algunos casos depresión, deshidratación, etc. (3). Una de las formas para la exploración física es por palpación de la tráquea, la auscultación puede ser variable, inespecífica y radiografía siempre anormal (18). La duración de la enfermedad sintomática es de 6 a 12 semanas con probabilidad de extenderse, puede presentar tres fases en el transcurso de la enfermedad: Catarral, paroxístico y convalecencia (8).

La enfermedad se ve afectada cuando hay cambios ambientales, el cambio climático tiene un papel fundamental (19)

2.5. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Bordetella bronchiseptica*

La técnica más específica para el diagnóstico de esta enfermedad es la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction), esta prueba permite tener millones de copias de ADN con solo una molécula de *B. bronchiseptica* (20)

A nivel nacional no se encuentran estudios relaciones con la detección molecular de la bacteria *B. bronchiseptica*. Sin embargo, a nivel internacional destacan estudios como los de:

Molina et al. (1) que identificaron cepas de *B. bronchiseptica* de secreciones nasales de perros con signos respiratorios y en perros visiblemente sanos. Se recolectó la muestra mediante hisopado, y se sembraron en medio infusión cerebro-corazón, para luego inocularse en agar Mac Conkey. Se identificó *B. bronchiseptica* por movilidad, pruebas bioquímicas y tinción Gram. Se concluyó que, de 130 muestras tomadas en un rango de 8 meses, se aislaron 11, de estos aislamientos, 5 (45%) fueron de caninos callejeros y 6 (55%) de caninos de instituciones de entrenamiento. No se llegó a aislar cepas de caninos en casas particulares.

Por su parte Rodríguez et al. (21), determinaron la presencia de *B. bronchiseptica* en secreciones nasales y conjuntivales de canes, de instituciones de rescates en la ciudad de Cuenca. Se emplearon métodos

microbiológicos para el cultivo e identificación de la bacteria, y se determinó la susceptibilidad a antibióticos con el método de difusión de disco. Se concluye que un 9,6 % estuvo asociado a *B. bronchiseptica*.

Corona et al (5) identificaron *B. bronchiseptica* mediante PCR en tiempo real con cebadores específicos, el ADN extraído de 50 muestras extraídas con hisopos de la garganta de caninos divididos en 3 grupos: A < 1 año, B entre 1 y 7 años, C > 7 años. Se concluye que, de 50 muestras, 26 fueron positivas (52%), en particular 26% grupo A, 16% grupo B y 10% grupo C.

Matsuu et al (20) detectaron patógenos con el método de reacción en cadena de la polimerasa, recolectando la muestra mediante hisopos nasales y/o faríngeos para asociarlos con la enfermedad respiratoria infecciosa canina (CIRD) en perros asintomáticos y con CIRD, de casas particulares y perreras. Mediante PCR se detectó 9 patógenos (*B. bronchiseptica*, *CAV-2*, *CDV*, *CHV-1*, *CIV*, *CPiV*, *CPnV*, *CRCoV* y *Mycoplasma cynos*). Los resultados fueron que en perros de casas particulares con CIRD resultaron positivos a *B. bronchiseptica* 44.3%. En perros alojados en perreras con CIRD resultaron positivos a *B. bronchiseptica* 28.6%. Se concluyó que en perros con CIRD y asintomáticos tanto en casas particulares como en perreras, de 9 patógenos respiratorios *B. bronchiseptica* es el más infeccioso, siendo el agente más prolífico a comparación de los otros.

Schulz et al. (4) tuvieron como investigación la prevalencia de 7 patógenos respiratorios en 71 perros con CIRD y en 90 perros clínicamente sanos, se recogieron muestras mediante hisopos nasales y faríngeos para su estudio en PCR tiempo real. Se detectó *B. bronchiseptica* en 78.7% de perros con signos respiratorios y en 45.6% de perros clínicamente sanos. Como se observa, *B. bronchiseptica* se detectó más significativamente en perros con CIRD que en clínicamente sanos, siendo el agente infeccioso más común en perros.

Singh et al (22) investigaron *B. bronchiseptica* en ADN extraído de 185 muestras de suero recogidas, se usaron perros enfermos de diferentes edades, sexo, raza y lugar como muestra para la detección de la bacteria. Se llegó a la conclusión que PCR con plantilla de ADN extraído en suero puede ser una opción para la detección rápida de *Bordetellas* y que, de 185

muestras, 14 resultaron positivos, es decir, *B. bronchiseptica* pudo invadir los tejidos del perro, aunque *B. bronchiseptica* fue la principal *Bordetella* que ha colonizado en las fosas nasal y oral del perro, otras *bordetellas* estuvieron presentes en hisopos nasales de perros.

Así mismo, Kaczorek et al (23) utilizaron método molecular para detectar la prevalencia de patógenos respiratorios en canes de Polonia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar cuál de los cuatro patógenos más comunes se puede detectar a partir de torundas y líquido de lavado traqueal en perros con síntomas de tos en las perreras en el noreste de Polonia. Se analizaron muestras en 40 caninos, los cuales 13 resultaron positivos a *B. bronchiseptica*.

De igual manera, Bemis et al (24) identificaron *B. bronchiseptica*, y compararon las propiedades bacteriológicas de 50 aislamientos de *B. bronchiseptica* que fueron sembradas en agar. Las cincuenta cepas de *B. bronchiseptica* fueron aisladas de 30 de perros, 10 de cerdos, 3 de gatos, 2 de conejillos de Indias, 2 de ratas, 1 de una mono y 2 incognitos. Se tuvo como conclusión que todos los organismos estudiados fueron bacilos gramnegativos (*B. bronchiseptica*).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales, insumos y equipos que se usaron durante la ejecución de la tesis fueron:

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales para la recolección de muestra:

Guantes estériles, mascarillas, alcohol medicinal, hisopos nasales estériles, cooler mediano, hielos en gel, tubos largos con medio de transporte, plumón indeleble, hojas de recolección de datos, lapicero.

3.1.2. Materiales para el procedimiento de siembra:

Placas petri estériles, asa de siembra, mechero bunsen, tubos eppendorf, matraz de 250ml, tubo de 100ml, agua destilada, Agar MacConkey, Agar nutritivo, Agar chocolate, tubos vacutainer, agujas vacutainer, algodón, capuchón, mechero bunsen, fósforos, muestra en tubo de colecta, láminas portaobjetos, KWIK-STIK *Bordetella bronchiseptica* ATCC ®, agua fisiológica estéril, colonia de bacteria aislada, cristal violeta, lugol, alcohol ácido, safranina, aceite de inmersión, incubadora, cámara de siembra, autoclave, microscopio, guantes estériles, mascarillas, guardapolvo, jabón líquido antibacterial, papel toalla, alcohol medicinal 96°.

3.1.3. Materiales para el procedimiento de extracción de DNA:

Micropipetas y puntas de 10ul,100ul,1000ul estériles, rack para base, tubos eppendorf estériles, recipiente de desechos, tampón de lisis (Tris HCL EDTA, NaCL), Proteinasa k, SDS, fenol cloroformo, isopropanol, etanol 70%, TE, muestra en pellet, microcentrifuga, cámara de extracción, guantes estériles, mascarillas, guardapolvo, jabón líquido antibacterial, papel toalla, alcohol medicinal 96°.

3.1.4. Materiales para el procedimiento de PCR:

Tubos eppendorf estériles, micropipetas y puntas de 10ul, 100ul, 1000ul estériles, rack para base grande y pequeña, tubos pequeños estériles, pinza para sujetar, recipiente de desechos, DNA, cebadores, agua ultrapura, Mix de PCR, cámara de PCR, termociclador, guantes estériles, mascarillas, guardapolvo, jabón líquido antibacterial, papel toalla, alcohol medicinal 96°.

3.1.5. Materiales para el procedimiento de electroforesis:

Micropipeta y puntas de 10ul estériles, cinta adhesiva, lámpara, papel tisú, papel toalla, alcohol, rack con hielo, matraz de 150ml, agarosa, TBE, imán, tubo de 100ml, base para gel, peineta para gel, cinta adhesiva, Ladder de 100pb, producto de PCR, Fluorescent Dye, recipiente de corrida, fuente de poder, lámpara, cámara agitadora para Agarosa, equipo de electroforesis, cámara fotográfica, guantes estériles, mascarillas, guardapolvo, jabón líquido antibacterial, papel toalla, alcohol medicinal 96°.

3.2. Metodología

3.2.1. Muestreo

Tumbes cuenta con una población de 256,423 habitantes (censo 2021- INEI- TUMBES), la población específica de la urbanización Andrés Araujo Morán es de 25,180 (censo 2021- INEI- TUMBES), según la norma técnica de DIGESA para la prevención y control de la rabia humana la población aproximada de caninos para la urbanización sería de 500.

Dónde:

$$n_0 = \frac{NZ^2 \cdot p(1-p)}{(N-1)e^2 + Z^2 p(1-p)}$$

n = Tamaño de la muestra

N = Tamaño de la población

e = Error estimado

Z = Valor de la recta Z que depende de a

r = Proporción muestra.

De acuerdo con los padrones existentes se tiene una población de 500 caninos de diferentes edades en la urbanización de Andrés Araujo Morán, de ello se tiene:

$$N = 500$$

$$e = 0.15$$

$$z = 1,96$$

$$P = 0,60$$

De acuerdo con el desarrollo de la formula se tuvo un valor de n = 45 caninos.

El muestreo se determinó mediante el coeficiente de elevación con la siguiente formula:

$$K = \frac{N}{n} = \frac{500}{38} = 13.157$$

Dónde: N= Población y n = Muestra

Por lo tanto, luego de un sorteo para empezar la primera muestra, se continuó en el hogar +13 y así sucesivamente, hasta alcanzar la muestra N° 45.

La presente investigación se realizó en la urbanización Andrés Araujo Morán para la toma de muestras y el proceso de siembra y detección molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes.

El tiempo de duración fue de 7 meses para la recolección de datos, toma de muestras y procedimiento para el diagnóstico.

Se explicó el propósito del estudio al propietario del animal, y se procedió a la observación clinicopatológica y determinación si presenta los signos de Traqueobronquitis infecciosa. Una vez que se evidenció la presencia de signos, se pidió la firma del consentimiento informado (Anexo 1) al

propietario, explicando que la toma de la muestra, así como el manejo de los datos se hará en forma ética, respetando los derechos de los participantes. Se procedió al llenado de datos en una ficha (Anexo 2) (Figura 1).



Figura 1. Recolección de datos en caninos muestreados

3.2.2. Metodología de hisopado:

Antes de iniciar con el procedimiento de toma de muestra en los caninos, con guantes estériles y mascarilla, se sujetó al canino, mediante sujeción, correas, collares o en caso sea necesario bozales para mayor seguridad. Con una mano se tomó el hisopo agarrándolo ventralmente y se introdujo en uno de los orificios nasales rotando el hisopo por al menos dos segundos, luego de obtener la muestra se devolvió a su envase de recolección original estéril con medio de transporte caldo BHI, guardado en un cooler con hielo en gel, para ser llevada al laboratorio para su respectivo estudio inmediatamente (25). (Figura 2).



Figura 2. Toma de muestra (hisopado) en caninos de la urbanización Andrés Araujo Morán

Al término de llenado de datos de los 45 caninos, se resumió en una hoja adicional los datos obtenidos (Anexo 3).

3.2.3. Metodología de siembra:

Las muestras obtenidas en el tubo de colecta con medio de transporte BHI se incubaron con un mínimo de 6 horas. Para la preparación de Agar chocolate se utilizó sangre recolectada en tubos EDTA, luego se vertió un 5% al Agar nutritivo estéril a 70°C, calentándose en el mechero evitando que se lisen los eritrocitos y alcance un color marrón oscuro. Inmediatamente se vertió en placas estériles para su solidificación, así mismo, se dejó a temperatura de 32 °C para la prueba de esterilidad. Se procedió a sembrar utilizando el mechero y el asa de siembra con el método de estrías. De la misma manera también se sembró el control positivo, siendo su presentación: KWIK-STIK *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617™, cepas liofilizadas y almacenadas a temperatura de 2°C a 8°C, obtenido de la empresa GenLab del Perú. (Figura 3).



Figura 3. KWIK-STIK *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617™

A temperatura ambiente se procedió a romper el sobre y extraer el tubo donde se almacenaba la cepa, se agrietó la parte superior de la ampolla para liberar el líquido hidratante, inmediatamente sumergir el hisopo en el líquido liberado y presionar en la parte inferior para una suspensión homogénea. Se esperó de 24 a 48 horas a crecer las colonias. Las colonias positivas se mostraron pequeñas a medianas, de color blanco grisáceo, brillantes. (Figura 4).

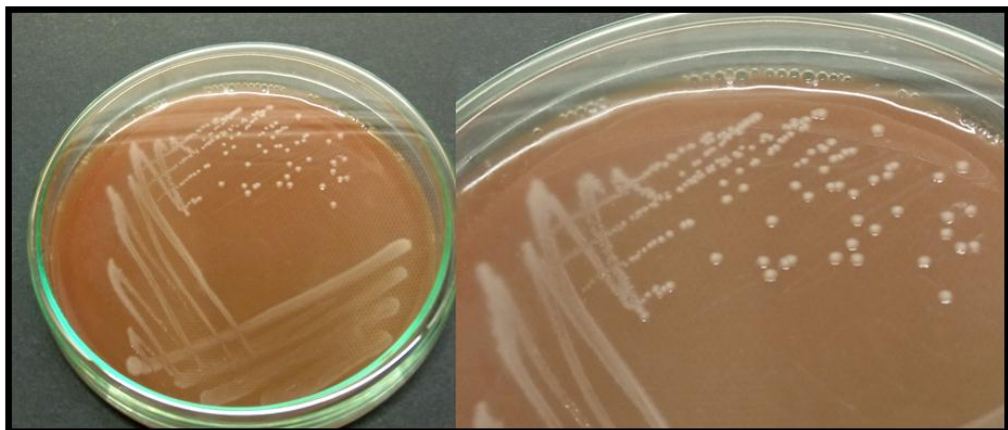


Figura 4. Siembra de cepa *Bordetella bronchiseptica* en agar chocolate

A las colonias de la cepa ATCC se le realizó un extendido para posteriormente colorearlo mediante la coloración Gram. A los extendidos se les añadió cristal violeta por 1 minuto, lugol por 1 minuto, alcohol cetona por 30 segundos para decolorar el extendido y safranina por 1 minuto, luego se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente. Se observó en el microscopio en el aumento 100X (Figura 5).



Figura 5. Tinción Gram

3.2.4. Metodología para extracción de DNA:

Del caldo BHI del tubo de colecta se vertió en tubos eppendorf para centrifugar a 14,000rpm por 15 minutos para obtener un pellet bacteriano. Para la extracción de DNA se utilizó el procedimiento de Fenol cloroformo modificado. Al pellet se agregó 250 ul del Tampón de lisis (Tris HCL, EDTA y NaCl), luego 5ul de proteinasa k y 35 ul de SDS, se homogenizó y se dejó actuar por 15 minutos. Se agregó 290 ul de fenol cloroformo (1:1), se mezcló y se centrifugó por 6 minutos 14,000 rpm, se extrajo 300ul del sobrenadante y se vertió la misma cantidad de fenol cloroformo (1:1).

Se centrifugó por 6 minutos por 14,000 rpm, se obtuvo el sobrenadante en un tubo limpio y se agregó 300 ul de isopropanol y se mezcló por inversión, se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 600ul de etanol al 70% mediante movimientos suaves durante 5 minutos para luego centrifugar por 6 minutos a 14,000 rpm.

Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar por 30 minutos aproximadamente. Por último, se agregó 50ul de TE y se dejó 24 horas en refrigeración a 8 °C para hidratarse. Luego de obtenido el DNA se almacenó a -20°. (Figura 6).

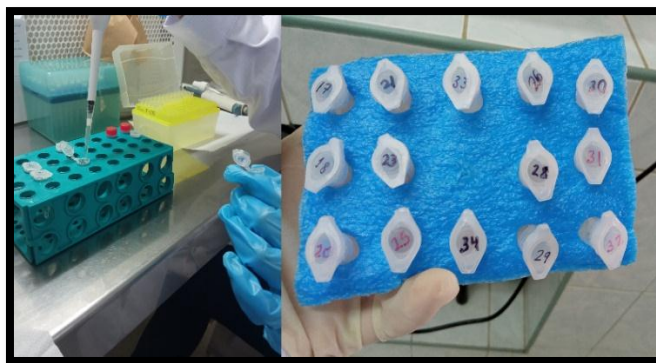


Figura 6. Extracción de DNA obtenido

3.2.5. Medición de DNA:

El DNA obtenido de cada una de las muestras fue medido en un NanoDrop (Facultad de Ingeniería pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes). Para iniciar la medición, se inoculó 1ul del blanco, en este caso se utilizó T.E. (Anexo 4).

3.2.6. Metodología para PCR:

Al iniciar se realiza el protocolo de desinfección, bioseguridad y descongelación de los reactivos. En un tubo eppendorf de 0.5 ml se preparó el mix de reacción para realizar la reacción de PCR con cada una de las muestras de DNA obtenido. Las cantidades fueron las siguientes: Agua ultrapura estéril 8.5ul, Mix 12.5ul, primer 428BBfim-1F, primer 425BBfim-2R, primer 237BBFla 4F, primer 237BBFla 2R. Los dos pares de primers que se usaron para la investigación, fueron sintetizados por la empresa (MASED Representaciones, Lima- Perú) (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la determinación de *Bordetella bronchiseptica*

Nombre de primers	Secuencia 5' – 3'	Referencias
425BBfim-1F	TGAACAATGGCGTGAAAGC	Bhardwaj et al (2)
425BBfim-2R	TCGATAGTAGGACGGGAGGAT	Bhardwaj et al (2)
237BB Fla 4F	TGGCGCCTGCCCTACT	Kaczorek et al (23)
237BB Fla 2R	AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT	Kaczorek et al (23)

primer con una cantidad de 0.5 ul, y se le agregó 2 ul de DNA, en total una muestra el volumen final fue de 25ul (Tabla 2).

Tabla 2. Mix de insumos para PCR

MIX PARA PCR	
H2O	8.5 ul
MIX	12.5 ul
425 F	0.5 ul
425 R	0.5 ul
237 F	0.5 ul
237 R	0.5 ul
DNA	2 ul
TOTAL	25 ul

Se llevaron al termociclador con las temperaturas, tiempos y ciclos como se detalla a continuación. (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización del termociclador para PCR

Etapa de PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicio desnaturalización	95°C	10 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	35
Hibridación	53°C	30 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	7 min	1
Almacenamiento	4°C	--	--

Así mismo por cada 15 muestras para PCR, se realizó dos mix adicionales para la cepa positiva obtenida por el mismo protocolo de extracción de DNA y una negativa, a la cual solo se agregó 2ul de agua ultrapura. (Figura 7).

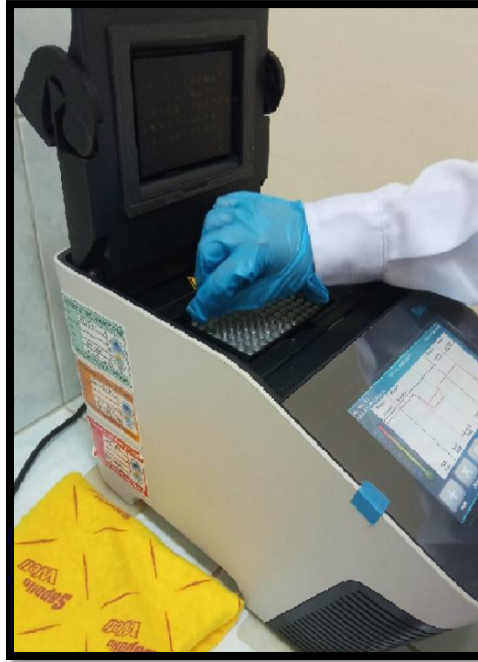


Figura 7. Procedimiento y uso del termociclador para PCR

3.2.7. Electroforesis en gel Agarosa:

El procedimiento de electroforesis se usó para confirmar la extracción del DNA y para observar los productos de PCR.

Para confirmar la extracción de DNA de las 45 muestras se preparó tres geles de Agarosa al 1% (1gr de agarosa con 100ml de TE), se añadió en cada posillo 1ul de Fluorescent Dye con 5ul de muestra, se corrió en 80 voltios/40 minutos. De esta manera se confirmó que el protocolo de extracción fue efectivo. (Figura 8).

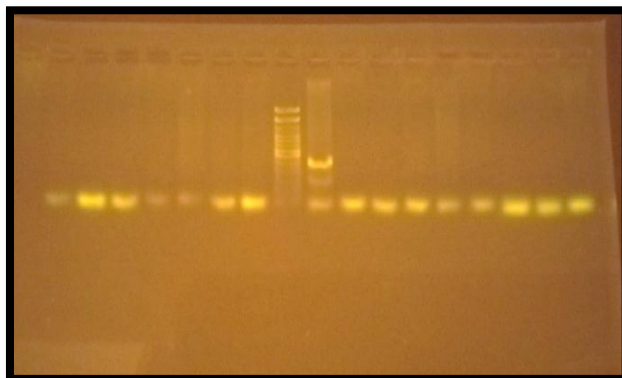


Figura 8. Corrida de muestras de DNA en electroforesis

Para evaluar si se logró amplificar exitosamente, se visualizó el fragmento amplificado mediante electroforesis. Se mezclaron 5 μ l de productos de PCR amplificados con 1 μ l de colorante Fluorescent Dye listo para usar, previamente descongelado, se procesaron junto con un Ladder ADN de 100bp en gel de agarosa al 1%.

La corrida electroforética se realizó a 80 voltios, un aproximado de 45 minutos y usando tampón de electroforesis 1X TBE (26). (Figura 9).



Figura 9. Procedimiento para electroforesis

En la Figura 10 se puede observar que luego de la electroforesis, en el gel se visualizaron las bandas tanto para el género *Bordetella* (425 bp), así como para la especie *B. bronchiseptica* (banda de 237 bp).

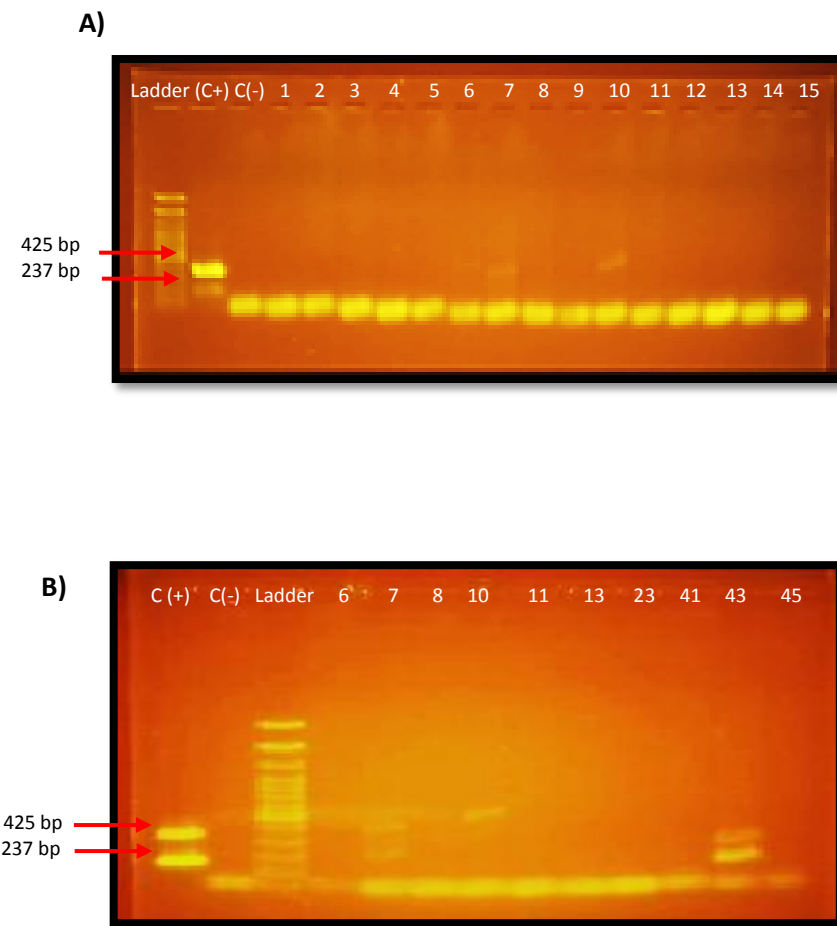


Figura 10. Geles con muestras positivas a *Bordetella bronchiseptica*. A) Muestras positivas N° 7 y N° 10, y B) Muestras positivas a especie *B. bronchiseptica* N° 7 y N° 43, positivo al género *Bordetella* N° 10.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó del mes de abril al mes de noviembre en la Urbanización Andrés Araujo Morán, para determinar la presencia de *B. bronchiseptica* en *Canis familiaris*. Se muestrearon a 45 caninos y las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Biología molecular, facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Tumbes. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa es una técnica específica para el diagnóstico de enfermedades, y esta prueba permite tener millones de copias de ADN con solo una molécula de *B. bronchiseptica* (20). Este método es preciso, y su sensibilidad y viabilidad ha sido demostrado por otras investigaciones (4,23,23).

Sin embargo, aunque en las referencias no se menciona, cabe señalar que en las muestras que tuvieron cantidades mayores a 40 ng de DNA total se hizo posible la visualización de las bandas del género y especie, y las muestras que tuvieron menor cantidad de DNA total se considerarían como falso negativas. Debido a esto se debe considerar que una buena extracción de DNA total debe presentar buena calidad tanto al presentar banda en el gel de electroforesis, y mostrar un gráfico en el nanodrop cuando se realiza la cuantificación tal como se muestra en la Figura 11.

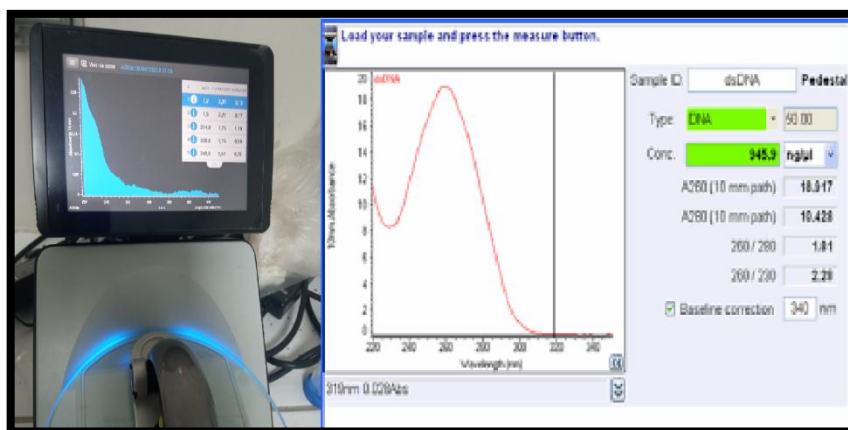


Figura 11. Medición de DNA

Los resultados de los 45 caninos muestreados fueron los siguientes:

Casos positivos y negativos al género *Bordetella* y especie *B. bronchiseptica*

Del 100% del total de las muestras (n=45), 2 muestras (4.45%) fueron positivas a la especie *B. bronchiseptica*, mientras que 1 muestras (2.22%) fue positiva sólo al género *Bordetella*, entretanto, el 93.33% fueron negativas.

Cuando se realizó la prueba estadística de t-student, los datos no mostraron diferencias estadísticamente significativas, es decir que la bacteria puede estar presente o no en los caninos enfermos, y puede deberse a otro organismo o patógeno.

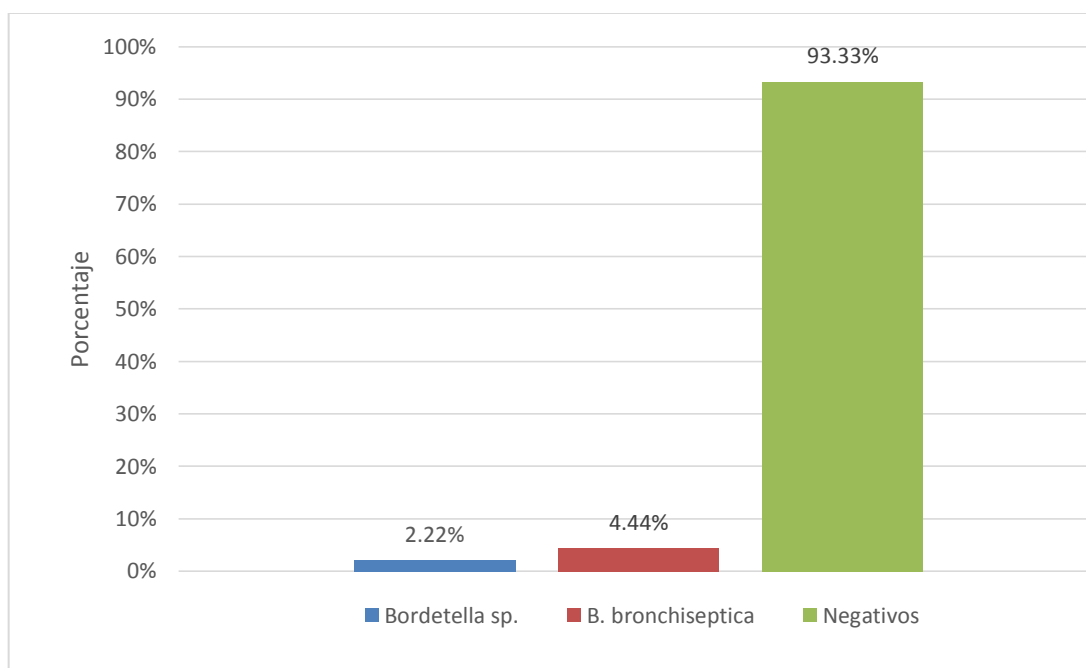


Figura 12. Porcentaje de casos positivos y negativos al género *Bordetella* y especie *B. bronchiseptica*, urbanización Andrés Araujo Morán, 2022.

Los resultados obtenidos se contrastan con el estudio realizado por Singh et al., en el cual, de 185 muestras, el 7.6% fueron positivos a *B. bronchiseptica*, indicando también que en su estudio otras especies del género *Bordetella* podrían invadir los tejidos nasales de los caninos (22). Estos resultados se correlacionan con el presente trabajo de investigación por tener como resultado 2 casos

positivos (4.44%) a la especie de *B. bronchiseptica* y un 2.22% de positivos al género *Bordetella*, pudiendo ser entre ellos una de las siguientes especies: *B. parapertussis* patógenos en humanos y corderos; *B. avium*, en aves infectadas especialmente en pavos; y otras con menos incidencia como *Bordetella hinzii*, *B. holmesii*, *B. petrii*, *B. trematum* y *B. ansorpii* (27)

Cabe mencionar que para una muestra representativa se debe considerar la población total de una localidad, los caninos a considerar deben ser de casas particulares, condición callejera e internamientos donde los caninos se vean hacinados. En la investigación de Molina et al. (1) no se halló ningún caso positivo de *B. bronchiseptica* en caninos de casas particulares, no obstante, en los resultados del presente trabajo de investigación se muestra que 1 canino de casa particular fue positivo a *B. bronchiseptica* y otro de los caninos fue positivo a cualquiera de las especies del género *Bordetella*, y esto es de importancia en epidemiología cuando otras especies del género pueden provocar enfermedad en otras especies de animales. En contraste, de los 10 caninos muestreados en condición callejera se encontró 1 caso positivo, aunque la incidencia es baja, este hallazgo es importante cuando la población de estos animales en situación de abandono es más densa (20).

Además, Molina et al., encontraron 11 positivos de 130 muestras, los cuales 5 casos positivos (45%) fueron en caninos en condición callejera y 6 casos positivos (55%) fueron de caninos que se encuentran internados en entrenamiento. De esto, se puede considerar que en futuras investigaciones también se tenga en consideración a los caninos en condición callejera o en hacinamiento, puesto que tienen una mayor probabilidad a estar infectados con la bacteria.

Nuestros resultados distan mucho a lo mostrado por Abdelazziz (29), debido a que obtuvo un resultado de 22 % de positividad a *B. bronchiseptica*. Si bien, en dicho estudio las muestras se colectaron mediante hisopado nasofaríngeo, sino que se derivaron de secciones de tejido pulmonar fijados en formalina y parafina. Por lo tanto, al estudiarse tejidos se tiene una mayor posibilidad de encontrar la presencia de la bacteria en cuestión, al realizarse el diagnóstico de esta.

Por último, Kaczorek et al. (23) estudiaron los 4 patógenos principales causantes de Traqueobronquitis infecciosa canina en Polonia. Informaron que el 84% de los

caninos muestreados y con signos característicos de la enfermedad fueron positivos a *Herpesvirus canino*, 8 % a *Adenovirus canino tipo 2* y *Parainfluenza* y *B. bronchiseptica* en un 4%. Los investigadores sugirieron que se utilice como muestra el líquido de lavado traqueal, ya que podría ser más efectivo para aislar el *virus del herpes canino*, *parainfluenza* y *B. bronchiseptica*, mientras que el hisopado es más adecuado para aislar *Adenovirus caninos tipo 2*.

Las edades de los caninos positivos a *B. bronchiseptica*, fueron las siguientes: Canino #7 con la edad de 1 año y el canino #43 con la edad de 7 años, ambos caninos machos, mestizos y con estilos de vida sedentarios, el canino #10 positivo a otras *Bordetella* con edad de 2 años, hembra, mestizo y estilo de vida activo (Tabla 4).

Tabla 4. Caninos positivos al género y especie de *Bordetella bronchiseptica* según la edad, sexo, raza y estilo de vida.

Caninos	Edad	Sexo	Raza	Estilo de vida	Ubicación
Canino #7	1 año	Macho	Mestizo	Sedentario	Casa
Canino #43	7 años	Macho	Mestizo	Sedentario	Calle
Canino #10	2 años	Hembra	Mestizo	Activo	Casa

Estos resultados se relacionan a lo mencionado por Fingerhann (28), debido a que los animales más susceptibles son los caninos recientemente destetados y adultos débiles, convalecientes o inmunosuprimidos. La infección por *B. bronchiseptica* juega un papel importante en condiciones de estrés, por ser un patógeno oportunista los caninos que se encuentra hacinados o en confinamientos están más propensos a enfermar, en mayor razón a caninos que no se les brinda una mejor calidad de vida por no tener una raza específica. Los caninos machos no castrados suelen estresarse, huir, o deambular más que las hembras, siendo esta una de las posibles causas de ser los machos más propensos a esta enfermedad (30).

De los caninos, resultó solo 1 caso positivos al género *Bordetella*, es decir, que presentó solo la banda de 437 bp, representado en el 4.44%. El canino # 10,

presentó los signos característicos, principalmente las secreciones nasales, tos, mientras que los de menor intensidad fueron los vómitos, inapetencia, debilidad, sedentarismo. Esto se correlaciona con lo descrito por Asteinza (3), ya que los caninos positivos a *Bordetella* sp. presentan tos seca, seguido de estornudos, secreciones nasales, dificultad para respirar, debilidad, y en algunos casos depresión, deshidratación, etc. Sin embargo, el canino #10 presentó signos característicos de la enfermedad, pero con menor intensidad comparado a los que presentaron los dos canes positivos a la especie de *B. bronchiseptica*.

En este estudio la técnica de PCR para la detección de *B. bronchiseptica* fue estandarizada con los primers que muestran la banda de peso molecular 425 bp que detecta el género *Bordetella*, así como también detecta más específicamente la especie *B. bronchiseptica* (banda de 237 bp). Es factible de realizar por la facilidad de realización para estudios de monitoreo de agentes infecciosos. Aunque la incidencia de *B. bronchiseptica* es baja, es importante demostrar su presencia por técnicas moleculares que son utilizadas en microbiología y que van de la mano con la clínica, en particular de los que podrían ser agentes emergentes.

Además, la técnica de PCR permite el análisis de un mayor número de muestras de forma simultánea y se pueden tener resultados en menor tiempo cuando se compara con el método de cultivo. Sin embargo, como se ha mencionado antes, se deben cumplir ciertos requisitos como la calidad de la muestra, calidad y cantidad de DNA total para que la técnica muestre los resultados confiables y evitar falsos negativos.

V. CONCLUSIONES

1. El método de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa es factible de realizar, por ser un método rápido y específico para la detección de *Bordetella bronchiseptica*. Se determinaron molecularmente 2 casos positivos a *B. bronchiseptica*, y 1 caso positivo al género *Bordetella* en caninos de la urbanización Andrés Araujo Moran.
2. Los signos característicos con mayor intensidad fueron las secreciones nasales y tos productiva, con menor intensidad los vómitos, inapetencia y sedentarismo. Los caninos positivos a la enfermedad fueron de edades susceptibles, machos, mestizos y con una vida sedentaria, principalmente.

VI. RECOMENDACIONES

1. En futuras investigaciones incluir como muestra a caninos que habitan en calles y/o albergues u hacinamientos, por los estudios que corroboran una mayor incidencia de la bacteria.
2. Asimismo, investigar los otros agentes etiológicos de la Traqueobronquitis infecciosa canina como Herpesvirus canino, Parainfluenza y Adenovirus canino tipo 2, de la misma forma sugiriendo también la posibilidad de realizar lavados traqueales.
3. Los propietarios y clínicas veterinarias podrían llevar un calendario sanitario más amplio y seguro al incluir la vacuna contra *B. bronchiseptica* y por ende que los caninos de la región no se vean afectados por esta enfermedad, llevando una mejor calidad de vida al igual que sus propietarios

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Molina GG, Rosales E, Bárcenas. Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains from canine origin. *Vet Méx.* 2006;37(3):313–25.
2. Bhardwaj M, Singh BR, Vadhana P. Bhardwaj et al. *Bordetella Bronchiseptica Infection Mini Review.* *Adv Anim Vet Sci.* 2013;1(35):2307–8316.
3. Asteinza I. *Bordetella bronchiseptica*, tos de las perreras. Nueva Oriental Coapa, Tlalpan México. [Revisado el 10 de junio del 2019]. Disponible en: <http://www.animalhome.com.mx/pdf/bordetella-tos-de-las-perreras.pdf>
4. Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet J.* 2014;201(3):365–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.019>
5. Corona A, Vercelli A, Casassa A. Identificazione molecolare di *Bordetella bronchiseptica* mediante real-time PCR con SYBR Green in cani con problemi respiratori. *Veterinaria.* 2013;27(6):9–13.
6. Andrés Martín A, Moreno-Pérez D, Alfayate Miguélez S, Couceiro Gianzo JA, García García ML, Korta Murua J, et al. Etiología y diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad y sus formas complicadas. *An Pediatr.* 2012;76(3).
7. Muñoz L, Fredes F, Faundez P, Sanz L, González C. Tos crónica en un perro asociada a *Filaroides osleri*. *Parasitol Latinoam.* 2007;62(1–2):72–5.
8. Valladares-Carranza B, Ortega-Santana C, Velazquez-Ordoñez V, Zamora-Espinosa JL, Peñuelas-Rivas CG, Castro-Maruri J, et al. *Bordetella bronchiseptica* como un riesgo importante de salud pública. Estudio clínico patológico en conejos. *Rev Electron Vet.* 2011;12(10).
9. Alvarez Hayes, J. Biotecnología y vacunas. Proteómica aplicada a la identificación de factores de virulencia e inmunógenos presentes en el fenotipo infectante de *Bordetella pertussis*. [Tesis Doctorado]. 2013. Universidad nacional de La Plata, Argentina. pp. 221.
10. Lugo S. *Bordetella bronchiseptica* in laboratory animals: diagnosis and incidence. 2003. [Revisado el 16 de julio del 2020]. Visto en: <file:///C:/Users/Nobel/Downloads/Bordetella%20bronchiseptica%20in%20laboratory%20animals%20-%20.pdf>
11. Pennock PW. y Archibald J. Disease of the lower respiratory tract, p. 572-581. *Canine medicine.* American Veterinary Publications. Wheaton. 1968

12. Reglamento veterinario Spain long distance Aranda de Duero 2016. pp 7. Disponible en: <http://www.spainlongdistance.com/wp-content/uploads/2016/05/REGLAMENTO-VETERINARIO-DE-SLD-ARANDA-2016.pdf>
13. Albi S, Hernández Á. Bronquitis (traqueobronquitis) aguda. 2010;1–4.
14. Manejo de la traqueobronquitis infecciosa canina (TIC) “Tos de las Perreras” (Canine infectious tracheobronchitis management “Kennel Cough”). Redvet. 2006;7(2):1-9.
15. Goodnow RA. Biology of Bordetella bronchiseptica. Microbiol Rev. 1980;44(4):722–38.
16. Sinclair L. Control De Infecciones Del Sistema Respiratorio Superior En Su Refugio. Anim Shelter Hum Soc Int [Internet]. 1997; Available from: http://www.hsi.org/assets/pdfs/control_infecciones_respiratorias.pdf
17. Lorenzana C. Actualización en la Terapéutica del Moquillo Canino. Uso del Interferón Recombinante Felino. Virbac al Día. N° 11, 1-6. Disponible en: <http://laboratoriouniversal.com/home/biblioteca/12.pdf>
18. Ynaraja E. Identificación, clasificación y tratamiento de cuadros de tos en el perro. Servicios Veterinarios. La Vall de Uixó-Castellón. Aspectos clínicos. Disponible en: <http://www.norvet.com.mx/Memorias2011/TOS%20norvet%202010.pdf>
19. Torremorell M. Cambio climático y enfermedades animales. 2010;1–4. Available from: http://www.produccion-animal.com.ar/clima_y_ambientacion/63-enfermedades.pdf
20. Matsuu A, Yabuki M, Aoki E, Iwahana M. Molecular detection of canine respiratory pathogens between 2017 and 2018 in Japan. J Vet Med Sci. 2020;82(6):690–4.
21. Rodríguez A. y Martínez A. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Bordetella bronchiseptica aislada en perros. [Tesis de Pregrado] Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. 2016. Visto en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24099/1/tesis.pdf>
22. Singh PL. Detection of Bordetella bronchiseptica in Serum of Apparently Healthy and Clinically Sick Pet Dogs. Adv Anim Vet Sci. 2015;3(2):123–7.
23. Kaczorek E, Schulz P, Małaczewska J, Wójcik R, Siwicki AK, Stopyra A, et al. Prevalence of respiratory pathogens detected in dogs with kennel cough in Poland. Acta Vet Brno. 2016;85(4):329–36.
24. Bemis DA, Greisen HA, Appel MJG. Bacteriological variation among Bordetella bronchiseptica isolates from dogs and other species. J Clin Microbiol. 1977;5(4):471–80.
25. Protocolo de toma de muestra para la detección de SRS-CoV-2 en animales. Facultas de ciencias veterinarias. Universidad nacional de La Plata. Argentina
26. Bhardwaj M. Evaluation of molecular and serological techniques for

diagnosis of bordetellosis in dogs Thesis Monika Bhardwaj Roll No . : 5069 in partial fulfillment of the requirements Master of Veterinary Science (Veterinary Bacteriology) May , 2013. 2013;

27. Colihuinca, L. Género: Bordetella. Universidad Santo Tomás. Microbiología avanzada. Escuela de Tecnología médica. Octubre, 2012.
28. Fingerhann, M. Caracterización molecular y funcional de la respuesta a la acidez en posible rol en la infección persistente. Trabajo de tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. 2011.
29. Abdelaziz, K. Bacterias asociadas a los cilios en la neumonía letal por Bordetella bronchiseptica de perros y gatos. Artículo de investigación. 2016.
30. May, J. Mayores diferencias entre caninos machos y hembras. Blog animal Volta. Enero, 2021.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado.



Yo..... con
D.N.I....., doy mi consentimiento y acepto la
participación de la investigación “Detección molecular de
Bordetella bronchiseptica en *Canis familiaris*” a cargo de la
Bach. Lesly Flores Sánchez, y asesorada por la MSc. Liliana
Solis.

El objetivo de este trabajo de investigación es: Identificar molecularmente a *Bordetella bronchiseptica* en muestras nasofaríngeas de *Canis familiaris*, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos; así mismo, determinar la incidencia de *Bordetella bronchiseptica* en los caninos de la urbanización Andrés Araujo Moran, según el tipo de raza, sexo, edad y tipo de vida.

ACEPTO, que se tomen 1 a 2 muestras de hisopado, específicamente de la zona nasofaríngea, de igual manera a completar la hoja con los datos de mi mascota.

La información que se obtendrá será confidencial, garantizando el respeto a la privacidad. Así mismo soy consciente que la investigación será publicada, pudiendo retirarme del estudio previo aviso sin generar algún gasto y/o perjuicio. Para finalizar, consiento participar de la investigación.

Firma del propietario

Tumbes,.....de.....del 2022

Anexo 2. Ficha de recolección de datos.

FECHA: _____

Canino N°: _____

HORA: _____

DATOS DEL PROPIETARIO

Nombre: _____

Edad: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

DATOS DEL CANINO

Nombre: _____

Raza: _____

F.Nacim: _____

Sexo: _____

Edad: _____

Vacunación: No
Si

Si: Puppy
Triple
Cuádruple
Quíntuple
Rabia
Séxtuple

Desparasitación: No
Si

Mucosas: Normales
Anémicas
Cianóticas
Ictéricas

C.C: Muy delgado
Delgado
Ideal
Sobrepeso
Obeso

Tipo de vida: Activo
Sedentario
Regular

Tos
Estornudos

Inapetencia
Disnea

Expectoración
Descarga nasal

Vómitos
Arcadas

Fiebre

Otras observaciones:

Anexo 3. Resumen de datos

RESUMEN DE DATOS																	
CANINOS	NOMBRE	EDAD			SIGNOLOGIA		SEXO		RAZA		TIPO DE VIDA			VACUNACIÓN		FECHA	OBS
		0-5 años	6-10 años	11-15 años	SI	NO	MACHO	HEMBRA	Específica	Mestizo	Activo	Sedentario	Regular	SI	NO		
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	
22																	
23																	
24																	
25																	
26																	
27																	
28																	
29																	
30																	
31																	
32																	
33																	
34																	
35																	
36																	
37																	
38																	
TOTAL																	

Anexo 4. Medidas obtenidas de la extracción de DNA.

N° MUESTRA	MEDIDAS DNA		
	Ng/ul	A260/A280	A250/A230
1	2.1	9.55	0.12
2	1.8	2.86	0.11
3	3.8	5.79	0.23
4	2.5	12.85	0.16
5	2.0	5.41	0.06
6	86.5	1.83	1.30
7	41.8	1.84	1.03
8	82.6	1.75	1.26
9	67.2	1.79	1.11
10	37.4	1.70	0.83
11	99.5	1.73	1.34
12	10.4	1.65	0.21
13	68.1	1.74	1.14
14	79.5	1.41	0.35
15	13.8	1.76	0.21
16	10.7	1.51	0.17
17	11.6	1.34	0.24
18	21.9	1.70	0.37
19	9.4	1.92	0.16
20	29.0	1.38	0.46
21	27.8	1.46	0.38
22	9.6	1.81	0.15
23	9.7	2.20	0.21
24	17.3	1.84	0.27
25	22.1	1.49	0.42
26	50.4	1.54	0.75
27	40.9	1.44	0.59
28	10.7	1.75	0.19
29	45.9	1.55	0.57
30	58.2	1.71	0.51
31	35.7	1.34	0.53
32	52.5	1.58	0.55
33	0.9	1.13	0.09
34	0.7	0.55	0.09
35	9.2	2.42	0.58
36	109.0	2.03	1.36
37	113.7	1.81	1.02
38	75.6	1.79	0.81
39	86.6	1.77	0.76
40	49.3	1.77	0.60
41	86.0	1.99	0.89
42	2.6	2.38	0.05
43	42.6	1.72	0.56
44	67.3	2.02	0.82
45	41.7	1.60	0.55