



11674 4
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

**AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Bordetella bronchiseptica*
DE ORIGEN FELINO E IDENTIFICACIÓN DE
FACTORES DE VIRULENCIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

GERARDO GARZA MALACARA

TUTOR: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA
DR. FRANCISCO SUÁREZ GUEMES

COLABORADOR INVITADO: DRA. GABRIELA BÁRCENAS MORALES.

CUAUTITÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I.- Índice de Tablas, Figuras y Cuadros	iv
II.- Resumen	1
III.- Abstract	2
1.- Introducción	3
1.1 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	3
1.2 Factores de Virulencia de <i>B. bronchiseptica</i>	9
1.3 Factores Antigénicos	12
1.4 Aislamiento	13
1.5 Trastornos Respiratorios en Gatos	13
2.- Justificación	16
3.- Hipótesis	17
4.- Objetivo General	18
4.1 Objetivos Particulares	18
5.- Desarrollo Experimental	19
5.1 Material	19
5.1.1 Material Biológico	19
5.2 Metodología	20
5.2.1 Muestreo de los gatos y aislamiento e identificación de cepas.	21
5.2.1.1 Muestreo e identificación de cepas	21
5.2.2 Identificación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los factores de virulencia de las cepas aisladas mediante diversas técnicas	22

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2.1 Prueba de Hemólisis	22
5.2.2.2 Prueba de Hemoaglutinación	23
5.2.2.3 Determinación de la Dermonecrotina	23
5.2.2.3 Determinación del Patrón Electroforético en Geles de SDS-PAGE	24
5.2.2.5 Detección de la Pertactina	24
5.2.2.6 Determinación de la Fase I	25
5.3 Prueba de Patogenicidad	26
5.4 Análisis Estadístico	27
6.- Resultados	28
6.1 Aislamiento e Identificación de Cepas de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	28
6.2 Prueba de Hemólisis	33
6.3 Prueba de Detección de la Dermonecrotina	35
6.4 Prueba de Hemoaglutinación	36
6.5 Prueba de la Detección de la Fase I	37
6.6 Determinación del Patrón Electroforético en Geles de SDS-PAGE	39
6.7 Detección de la Pertactina por Inmuno-electrotransferencia	39
6.8 Prueba de Patogenicidad	40
7.- Discusión	42
8.- Conclusiones	49
9.- Bibliografía	50

I Índice de Tablas, Figuras y Cuadros

Tablas

Tabla 1 Pruebas Bioquímicas de las cepas aisladas	28
Tabla 2 Número de Muestreos en gatos con y sin signos respiratorios.	29
Tabla 2A Aislamiento de <i>Bordetella bronchiseptica</i> a partir de gatos	30
Tabla 3 Relación total de los aislamientos de <i>Bordetella bronchiseptica</i> a partir de una población de gatos.	31
Tabla 4 Resultados de la prueba de seroaglutinación de las cepas aisladas	32
Tabla 5 Prueba de hemólisis de las cepas aisladas de <i>Bordetella bronchiseptica</i> de origen felino.	34
Tabla 6 Títulos Hemoaglutinantes de cepas de <i>Bordetella bronchiseptica</i> aisladas de gatos	36
Tabla 7 Detección de la Fase I en las cepas aisladas de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	38
Tabla 8 Signología de los gatos de prueba de patogenicidad y el tiempo (en horas) de aparición de los mismos	41

Figuras

Figura 1 Diagrama de muestreo, identificación y caracterización de cepas	20
Figura 2 Clasificación de Hemólisis producidas por las cepas aisladas de <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	33
Figura 3 Lesión provocada por la dermonecrotoxina de <i>Bordetella bronchiseptica</i> en piel de cuye.	35

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4	Prueba de Hemoaglutinación de cepas aisladas de <i>Bordetella bronchiseptica</i>.	37
Figura 5	Incorporación de colorante cristal violeta para determinar la Fase I De las cepas aisladas de <i>Bordetella bronchiseptica</i>.	38
Figura 6	Patrón electroforético de cepas aisladas de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	39
Figura 7	Detección de la pertactina en las cepas aisladas de <i>Bordetella Bronchiseptica</i> mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia.	40
Cuadros		
Cuadro 1	Pruebas primarias de identificación	21
Cuadro 2	Pruebas secundarias de identificación	22

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II Resumen

Bordetella bronchiseptica es un coco bacilo gram negativo, aeróbico, móvil; reconocido como el agente causal de la traqueobronquitis infecciosa canina (tos de las perreras), así mismo es asociado a neumonías en diversas especies animales, entre ellas el gato, pudiendo llegar a producir la muerte en cachorros.

Actualmente en México no existen reportes de su aislamiento, ni estudios de patogenicidad de este microorganismo en gatos por lo que estos puntos sirvieron de objetivos para la realización de éste trabajo en el D.F. y municipios conurbados de Tlalnepantla y Cuautitlán Izcalli. Se muestrearon un total de 86 gatos tanto por exudado nasal como faríngeo, incluyendo animales sanos y animales con signos clínicos de enfermedad respiratoria; de estos se aislaron 19 cepas.

No todas las cepas aisladas produjeron hemólisis a los eritrocitos utilizados de diferentes especies. Por otra parte el patrón electroforético mostrado por las cepas fue muy similar entre ellas, sin embargo sólo en nueve se detectó la pertactina, en cuatro de las cepas se observó la expresión de la dermonecrotina y los títulos hemoaglutinantes fueron encontrados desde negativo hasta 1:32.

Los resultados obtenidos indican la prevalencia de *Bordetella bronchiseptica* en la población.

PALABRAS CLAVES: *Bordetella bronchiseptica*, gatos, pertactina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III Abstract

Bordetella bronchiseptica is a gram-negative, aerobic, motil rod-shaped bacterium responsible as primary cause of infectious tracheobronchitis (kennel-cough). This bacterium is also known as a respiratory disease agent in different animal species, cats in this, it might can cause death mainly in kittens.

There are no reports of its isolation in Mexico, neither patogenicity studies of this microorganism in cats, this was the main reason to perform this study in Mexico City and metropolitan area including Tlalnepantla and Cuautitlan Izcalli, 86 cats were sampled, with and without clinical respiratory signs by nasal and faringeal exudates; 19 strains were isolated.

Not all the strains produced hemolysis in the different erythrocytes. On the other hand the electrophoresis pattern showed by the strains were very similar, although only in nine the pertactin was detected, dermonecrotxin expression was observed in four strains and the hemoaglutinant titles were through negative to 1:32.

The results show the prevalence of *Bordetella bronchiseptica* in the area.

KEY WORDS: *Bordetella bronchiseptica*, cats, pertactin.

1. Introducción

1.1 *Bordetella bronchiseptica*

El primer germen que puede considerarse similar a la *Bordetella bronchiseptica* fue aislado por Galli-Valerio en 1806 y descrito nuevamente en 1908, este autor denominó al germen como *Bacillus caniculae*. *B. bronchiseptica* ha sido reconocida como un patógeno del tracto respiratorio en mamíferos, originalmente fue aislada de perros e identificada como *Bacillus bronchians* por Ferry en 1910. En 1912-1913 microorganismos con características idénticas a los descritos por Ferry fueron aislados de cuyes, simios y humanos, por lo que a este se le renombró como *Bacterium bronchisepticus* (Ferry, 1912; Smith 1913); posteriormente, cambia de nomenclatura nuevamente en 1925 por Bergey como *Alcaligenes bronchisepticus*, en 1929 por Topley y Wilson como *Brucella bronchiseptica*, en 1935 por Haupt como *Alcaligenes bronchicanis* y en 1946 por Wilson y Miles como *Haemophilus bronchisepticus*. Fue clasificada en estos géneros debido a las características de crecimiento, morfológicas y bioquímicas tan similares entre ellos. Moreno-López finalmente describe el género *Bordetella* (en honor a Jules Bordet; quien aisló el microorganismo causante de la tosferina) y la especie *Bordetella bronchiseptica* (Pittman, 1974) reportado por Bárcenas, 1998.

B. bronchiseptica es un patógeno común del tracto respiratorio en un gran número de especies animales. Es el agente etiológico de la rinitis atrófica del cerdo y bronconeumonía, traqueobronquitis canina y bronconeumonía en animales de

laboratorio y otros animales de compañía. En casos esporádicos se ha reportado en humanos; generalmente éstas últimas infecciones se presentan en pacientes inmunocomprometidos, entre ellos quienes presentan fibrosis quística, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad de Hodgkins o leucemia (Randy, 2000). El papel de *B. bronchiseptica* en infecciones del tracto respiratorio en gatos domésticos, ha sido estudiado, sin llegar a reconocer su importancia (Hoskins *et.al.*, 1998).

Las infecciones del tracto respiratorio tanto en perros como en gatos generalmente son secundarias a infecciones virales, trauma o intervenciones quirúrgicas. La flora bacteriana normal de las fosas nasales y de la faringe es diversa, existen muchas especies de bacterias capaces de causar rinitis, sinusitis o faringitis como invasoras secundarias (Speakman *et.al.*, 1997).

B. bronchiseptica coloniza la mucosa nasal como patógeno primario; sin embargo, es asociada con mayor frecuencia a traqueobronquitis infecciosa y puede causar neumonía y septicemia. Su habitat natural es el tracto respiratorio superior de perros, cerdos, gatos, conejos, cuyes, ratas, caballos y otros animales (Welsh,1996 Goodnow, 1980).

Las enfermedades que afectan tanto al tracto respiratorio anterior como al posterior son, en conjunto, los desórdenes más diagnosticados en pequeñas especies. La variedad de signos clínicos en enfermedades del aparato respiratorio, el amplio espectro de agentes etiológicos capaces de producir trastornos respiratorios y el tiempo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que tardan las pruebas diagnósticas definitivas, a través de un lavado bronquial o bronquioalveolar, puede llegar a explicar el porqué los tratamientos de problemas respiratorios comúnmente son aplicados sin un diagnóstico confirmatorio (Hoskins *et. al.*, 1998; Elliot, 1991; Belford, 1999).

El tracto respiratorio anterior se divide del tracto respiratorio posterior por límites anatómicos muy relativos y realmente no muy bien definidos. Sin embargo, los clínicos en afán por diagnosticar una enfermedad respiratoria específica comienzan por clasificar los signos clínicos como propios del aparato respiratorio anterior o posterior. El tracto respiratorio anterior incluye las fosas nasales, senos paranasales, faringe y laringe y el tracto respiratorio posterior incluye a la traquea, bronquios y pulmones (Bedford, 1989).

Existen dos extremos de patogenicidad:

1. Toxicidad sin capacidad de invasión.
2. Capacidad de invasión sin toxicidad.

Sin embargo, la mayoría de las bacterias ocupan posiciones intermedias entre estos dos extremos, con alguna capacidad invasiva ayudada en cierta medida por toxinas de acción local y factores de diseminación (Roitt *et.al.*, 1993).

B. bronchiseptica, es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como un cocobacilo gram negativo, pequeño de 0.2 – 0.5 x 0.5 – 1.0 μ , aerobio, positivo

a catalasa y oxidasa; no fermenta carbohidratos, es móvil, no produce esporas sus toxinas juegan un papel importante en su patogenicidad. La bicapa lipídica externa de los microorganismos gram negativos tiene especial importancia, ya que a menudo es susceptible a acciones capaces de lisar las membranas, como las que ejercen el complemento y ciertas células citotóxicas. La superficie externa de la bacteria contiene fimbrias, que pueden impedir la función de los fagocitos, aunque también actúan como blanco para la respuesta de anticuerpos (Goodnow, 1980; Labaw y Mosley, 1955; Richter y Krees, 1967; Roitt *et.al.*,1993). Estos organismos se unen a los cilios del epitelio respiratorio en toda su extensión produciendo una cilioestasis unos minutos posteriores a su unión, lo que coadyuva a su patogenicidad. Los cambios patológicos son caracterizados por pérdida de cilios, necrosis de las células epiteliales, y la infiltración de la mucosa del epitelio respiratorio con leucocitos polimorfonucleares. En infecciones más severas se presenta un exudado, que es observado en el tracto respiratorio alto como una rinitis con descarga nasal purulenta y en el tracto respiratorio bajo como una traqueobronquitis con obstrucción de los bronquios y bronquiolos por el exudado celular. *B. bronchiseptica* ha sido aislada de pulmones de gatos con neumonía y se ha encontrado asociada con virus herpes felino, calicivirus y *Mycoplasma sp.* (Bemis 1998; Spekman *et al.* 1997; Weish *et al.* 1996).

La presencia de *B. bronchiseptica* como patógeno primario, secundario o copatógeno no se ha establecido completamente, pero se sabe que se encuentra asociado con enfermedad respiratoria en diferentes especies (Willoughby *et. al.* 1991). Se reconoce que es un comensal de vías respiratorias superiores de canideos, félicos, porcinos, conejos, equinos, cobayos, ratas y quizá de otros animales. La inhalación es

la vía principal de entrada de este microorganismo; y se propaga por contacto directo, indirecto y por fomites (Speakman 1997; Willoughby *et. al.* 1991; Coutts *et. al.* 1996). El periodo de incubación de *B. bronchiseptica* varía de cuatro a diez días, el rango de morbilidad va del 25 al 75 % y puede ser aislada de las fosas nasales al inicio del curso de la enfermedad. Persiste en el tracto respiratorio posterior aunque no se encuentre más en los cornetes nasales y por lo general un lavado traqueal ofrece una oportunidad de obtener cultivos puros.

Entre las cepas de *B. bronchiseptica* es considerable la variación de su capacidad para colonizar y causar patologías en los animales. La mayor parte de estas cepas poseen fimbrias y flagelos, lo que facilita su adherencia. Al parecer ésta bacteria tiene una fuerte afinidad por la mucina respiratoria, es probable que esta ayude al microorganismo a fijarse y colonizar las fosas nasales. Las cepas virulentas de *B. bronchiseptica* producen una enzima extracelular, adenilatociclasa, que tiene la propiedad de alterar las funciones celulares del huésped; incluyendo la fagocitosis y la lisis bacteriana intracelular. Además ésta enzima tiene la capacidad para inmovilizar los cilios respiratorios (cilioestasis), por lo que disminuye la fagocitosis local actuando a nivel de citoesqueleto y favoreciendo con esto la infección bacteriana. Las cepas que no producen fimbrias, adenilatociclasa, o ambas, no se adhieren totalmente a las vías respiratorias de los animales. *B. bronchiseptica* sintetiza una toxina intracelular termolábil con un peso molecular aproximado de 190 Kd; esta toxina es homogénea y la inactivan la tripsina, formalina y el glutaraldéhid; es mortal para ratones cuando se les inyecta en el peritoneo y produce necrosis cuando se inyecta por vía intradérmica en cobayos. Por esta razón, se ha designado como toxina dermonecrótica y es causa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

primaria de atrofia nasal de los cornetes (rinitis atrófica) de lechones, conejos, ratas y ratones. Puede intervenir en neumonía y otros procesos infecciosos respiratorios porcinos y de otros animales (Goodnow, 1980; Willoughby *et. al.* 1991).

Otros factores de virulencia que pueden actuar en la patogénesis de la infección son: producción de fosfatasa ácida y alcalina, hemolisina, adhesina y citotoxina. La función exacta de estas enzimas y de sus productos tóxicos no está bien dilucidado, pero producen destrucción de membranas, aumento de permeabilidad, aumento de vascularización, dolor, y aumento de secreción (Heiss *et.al.* 1994; Gueirard P., Guiso N. 1993).

La infección por *B. bronchiseptica* generalmente causa patologías de naturaleza subaguda o crónica y se relaciona con enfermedades como:

- Cerdos: rinitis atrófica y bronconeumonía grave en lechones.
- Perros: traqueobronquitis infecciosa (tos de las perreras), bronconeumonía después de distemper (moquillo canino).
- Conejos, cobayos, ratas: bronconeumonía, infecciones de vías respiratorias altas y septicemia.
- Gatos y caballos: infecciones respiratorias.
- Hombre: generalmente en individuos inmunocomprometidos rara vez se considera infecciosa; no obstante se ha encontrado que produce bronquitis, neumonía, peritonitis, meningitis, infecciones de heridas y septicemia terminal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2 Factores de Virulencia de *Bordetella bronchiseptica*

En relación a sus factores de virulencia, se ha observado que cuando la bacteria es crecida en agar se observan colonias lisas o rugosas; denominándose a las primeras en Fase I, como virulentas y a las segundas en Fase IV, como avirulentas (Leslie y Gardner, 1931). En desacuerdo con esta clasificación, se realizaron otras investigaciones que revelaron diversos tipos de fases intermedias (Fase II y III). Se encontró que la Fase I es extremadamente inestable y se transforma rápidamente a la Fase II, III y IV después de varios pases en medio artificial (Nakase, 1957). Evidencias de la inestabilidad de las fases fueron reportadas por Lacey(1953), quien observó más colonias en Fase I en Bordet-Gengou y agar sangre que en agar nutritivo. Esto sugiere que la composición de los medios de cultivo puede afectar el tipo de la fase de la colonia. Se encontraron diferencias dentro de la Fase III (III-1 y III-2) asociadas a antígenos capsulares específicos, antígenos somáticos o ambos.

Existen contradicciones en la literatura relacionados con la fase en cuanto a la virulencia, estructuras de motilidad y la habilidad para adherirse a los cilios del tracto respiratorio; Nakase, 1957, reportó flagelos peritricos en células lisas, Fase I y ausencia de flagelos en células rugosas, Fase IV. Bemis *et.al.* 1977 observaron lo contrario, bacterias no flageladas en Fase I y flageladas en Fase IV. Eso nos muestra que el carácter liso-virulento y rugoso-avirulento no siempre corresponde a los hallazgos de laboratorio para designar si la cepa de *B. bronchiseptica* es o no virulenta. Se ha

demostrado que colonias lisas y rugosas presentan virulencia similar en infecciones respiratorias en cerdos y perros (Goodnow, 1980).

Estudios clínicos (Elliot, 1991; Willoughby *et.al.*, 1991; McArdle *et.al.*, 1994; Speakman *et.al.*, 1997) y experimentales (Jacobs *et.al.*,1993; Coutts *et.al.*, 1996) han reportado a *B. bronchiseptica* como un patógeno primario en gatos, así mismo se han realizado estudios similares en Estados Unidos; sin embargo, éstos han sido limitados (Welsh, 1996)

B. bronchiseptica tiene predilección por tejidos ciliados del tracto respiratorio y es capaz de unirse a ellos. Bemis y Kennedy (1981) observaron que sólo las cepas virulentas pueden unirse a cilios no así las cepas rugosas avirulentas; sin embargo, la capacidad de adherencia ha sido demostrada tanto por la presencia de fimbrias como de hemoaglutinina. Los factores de adherencia están presentes en las cepas virulentas en forma más activa, mientras que en las cepas avirulentas lo hacen en forma más débil (Yokomizo y Shimizu, 1979). La afinidad de esta bacteria por el epitelio nasal se ha observado en el cerdo así como en otras especies animales, entre ellos el conejo y el perro (Bemis y Appel, 1977; Matsumaya y Takino, 1980) . Esta propiedad de adherencia se ha correlacionado con la capacidad de aglutinar eritrocitos (Semjen y Magyar, 1985).

En 1939 Evans y Maitland dieron la primera descripción detallada de una toxina intracelular de *B. bronchiseptica*. Esta toxina (dermonecrotoxina) termolábil preparada de un extracto de *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* fue tóxica para cuyes y ratones inoculados por vía intravenosa, también produce necrosis dérmica al aplicarse por vía

subcutánea en conejos. La toxina fue sensible a la formalina y no presentó propiedades antigénicas (Oddy y Evans, 1940). En contraste, Evans (1940) encontró que la toxina formalizada fue antigénica y que la antitoxina contra la toxina de *B. bronchiseptica* neutralizaba a las toxinas de las tres especies de *Bordetella*. Nakase, 1957, citado por Bárcenas 1998, observó que sólo cepas virulentas de *B. bronchiseptica* producían la toxina, mientras que las cepas avirulentas eran poco tóxicas. La capacidad de producir la dermonecrotoxina está altamente correlacionada con el grado de virulencia de las cepas. Esta toxina se caracteriza por producir eritema, edema, induración y necrosis cuando es inyectada en forma intradérmica en el cuye (Collings y Rutter, 1985; Hanada *et.al.*, 1979; Roop II *et.al.*, 1987). Por otra parte, Kume *et.al.* (1986) mencionan que el peso molecular de la toxina es de 190 Kd compuesta por dos subunidades de 75 y 118 Kd cada una, su punto isoeléctrico es de 6.5 a 6.6, la dosis mínima necrosante para cuyes es de 2 ng de proteína por 0.1 ml, la DL 50% para ratón de 0.3 µg y la dosis mínima citotóxica para células embrionarias de pulmón de bovino de 2 ng/ml.

La adenil ciclasa es otro factor de virulencia, esta cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Esta enzima se describió originalmente en cultivos de *B. pertussis* en donde se le designó un peso molecular de 70,000 daltons y la propiedad de ser termolábil (Hewlet y Wolf, 1976). Posteriormente la enzima se encontró en cultivos de cepas virulentas de los tres miembros del género *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; pero no en cultivos de cepas avirulentas (Endoh *et.al.*, 1980; May *et.al.*, 1982); en el caso de *B. pertussis* existen estudios que asocian a la enzima con su virulencia (Confer y Eaton, 1982; Weiss *et.al.* 1984).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Montaraz *et.al.* (1985) prepararon un anticuerpo monoclonal contra *B. bronchiseptica* que confiere inmunidad artificial pasiva a ratones desafiados subsecuentemente con un aerosol del microorganismo. Este anticuerpo reacciona con un antígeno proteico (pertactina) de 68,000 daltons de peso molecular presente en la membrana externa del microorganismo y su actividad aun no ha sido del todo dilucidada (Novotny et al., 1985b), aunque en el caso de *B. pertussis* se reconoce su importancia en la inmunización contra tosferina, Fine y Clarkson 1987; Canthaboo, C. *et.al.* 2001.

1.3 Factores antigénicos

Los diferentes géneros de *Bordetella* poseen características antigénicas similares, aunque *B. pertussis* no es móvil y *B. parapertussis* carece de antígeno "H" (flagelar), las tres especies poseen antígeno "O" similar (termoestable) y toxinas termolábiles (Eldering y Kendrick, 1938); presentando mayor diferencia en el antígeno "K" (termolábil) (Andersen, 1953; Pittman, 1974) .

Las propiedades antigénicas de *Bordetella* son afectadas por el tipo de nutrientes utilizados para su crecimiento y por el número de pases realizados en el laboratorio en medios artificiales. Tanto *B. pertussis* como *B. bronchiseptica* muestran antígenos de respuesta serológica modificados cuando se cultivan en medios con $MgSO_4$ en lugar de NaCl (Lacey, 1953a; Lacey, 1953b). Flosdorf et al. (1941) verificaron las diferencias antigénicas en relación con la habilidad aglutinante de aislamientos frescos y de cepas

de laboratorio de *B. bronchiseptica*, observando que las cepas de laboratorio pierden la capacidad de ser aglutinadas por suero preparado contra aislamientos frescos.

1.4 Aislamiento

El aislamiento primario se realiza usualmente en placas de medio selectivo, Mac Conkey (Füzi, 1973; Farrington y Switzer, 1977). Las placas son incubadas a 35-37 °C por 48 a 72 horas, y las colonias resultantes presentan un color cremoso brillante y borde liso. A las colonias presuntivas se les realiza una tinción de Gram, prueba de gota y pruebas bioquímicas para el género y especie específico. *B. bronchiseptica* puede crecer en agar o medio líquido conteniendo un mínimo de proteína. Para un crecimiento máximo en medio líquido requiere de aireación, temperatura de 35 a 37 °C y controlar el pH con un amortiguador de sales. Cuando crece en agar sangre las colonias son generalmente hemolíticas y brillantes.

1.5 Trastornos respiratorios en gatos

Las enfermedades del tracto respiratorio en gatos son frecuentes en la práctica clínica. Dentro de los agentes reconocidos como agentes primarios y responsables de la mayoría de las patologías respiratorias se encuentra principalmente a calicivirus felino, virus herpes felino y, ocasionalmente, *Chlamydia psittaci* (Gaskell *et.al.* 1997).

El tracto respiratorio anterior es colonizado por un conjunto de bacterias de diferentes especies; las bacterias tanto aerobias como anaerobias que habitan

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

normalmente el tracto, confieren un cierto grado de protección en contra del desarrollo de infección, mediante un complejo mecanismo de competencia llamado interferencia bacteriana. Paradójicamente, los mismos organismos que sirven como protección pueden llegar a ocasionar infecciones o daños primarios (neoplasias o infecciones virales) rompiendo esta delicada relación entre el huésped y la flora respiratoria. Es de esperarse que la población de bacterias comensales en el tracto respiratorio sea el principal reservorio de donde surgen serios problemas por bacterias oportunistas. Dentro de estas bacterias que se llegan a aislar del tracto respiratorio cuando existe enfermedad se encuentra *B. bronchiseptica* entre otras como lo son *Pasteurella multocida*, *Streptococos*, *Escherichia coli*, *Moraxella*, *Proteus* y *Mycoplasma*.

Las infecciones del tracto respiratorio, particularmente aquellas que involucran las vías aéreas, se desarrollan generalmente como consecuencia de un padecimiento primario que compromete la integridad del medio de protección del tracto respiratorio anterior y del aparato mucociliar de la tráquea y vías aéreas posteriores. Las infecciones bacterianas secundarias que comprometen la vida de los gatos pueden surgir ya sea por contaminación oral o respiratoria, así como por vía hematogéna.

La rinitis bacteriana secundaria es una secuela común en gatos con patología respiratoria, particularmente aquellas asociadas a cuerpos extraños en las vías anteriores así como infecciones virales. Aunque, el hecho de que las infecciones bacterianas sean generalmente secundarias no les resta importancia, Ford, 1997 .

SECCION CON
FALLA DE ORIGEN

El papel de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio alto de los gatos no está bien comprendida. En algunos reportes, *B. bronchiseptica* ha sido asociada principalmente en brotes de enfermedad respiratoria en colonias de laboratorio, aunque se han reportado ocasionalmente en forma aislada de otros gatos, Switzer *et.al.*, 1966; Roudebush; Fales, 1987.

Reportes más recientes sugieren que *B. bronchiseptica* también puede actuar como agente primario en enfermedades respiratorias en gatos y no solo como bacteria oportunista. Trastornos respiratorios asociados a *B. bronchiseptica* han sido reportados en gatos de laboratorio de donde se sabe que están libres de otros patógenos, Elliot, 1991.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Justificación

En pequeñas especies las patologías del aparato respiratorio son los desórdenes que son detectados más frecuentemente; sin embargo, son los que generalmente son tratados sin previo diagnóstico de laboratorio clínico. El síndrome respiratorio felino cada día se diagnostica clínicamente con más frecuencia en pacientes con traqueobronquitis, rinitis, sinusitis y septicemia.

Las etiologías de las infecciones respiratorias anteriores (IRA) felinas incluyen bacterias hongos y virus. Existen evidencias que indican que la *B. bronchiseptica*, causante de tos de las perreras (traqueobronquitis infecciosa canina), también puede ser una etiología significativa en las IRA felinas, que produce y expresa diferentes factores de virulencia que no en todas las cepas aisladas presentan el mismo patrón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Hipótesis

Existe *Bordetella bronchiseptica* en la población felina del D.F. y área conurbada de Tlalnepantla y Cuautitlán y puede ser que presente factores de virulencia (hemoaglutinación, hemólisis, detección de la dermonecrotina, detección de la pertactina) parecidos a los conocidos en cerdos y perros, en donde el hecho de aislarla no necesariamente implica que esté asociada a enfermedad en gatos.

4. Objetivo General

Aislar y caracterizar cepas de *Bordetella bronchiseptica* a partir de gatos e identificar factores de virulencia como hemólisis, hemoaglutinación, detección de dermonecrotina y detección de la pertactina.

4.1 Objetivos Particulares

4.1.1 Aislar cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen felino a partir de gatos clínicamente sanos y de gatos con signos respiratorios.

4.1.2 Identificar las cepas aisladas empleando las pruebas bioquímicas establecidas.

4.1.3 Caracterizar *in vitro* e *in vivo* los factores de virulencia (hemólisis, hemoaglutinación, detección de la dermonecrotina, detección de la pertactina) de las cepas aisladas.

4.1.4 Reproducir la enfermedad en gatos de 2 a 3 meses de edad sin anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Desarrollo Experimental

5.1 Material

5.1.1 Material Biológico

Gatos: Se trabajó con 86 gatos de los cuales 36 de ellos de vida controlada y 50 procedentes de gateras (Ralston Purina México), seleccionados al azar.

Para hacer un estudio comprobatorio de patogenicidad: se emplearon 9 gatos de 2 meses de edad a los cuales se les realizó previamente pruebas de seroaglutinación para verificar que no presentaban anticuerpos (Ac) contra *B. bronchiseptica*.

Se emplearon 4 cuyes de 350 gramos de peso, para la realización de la prueba *in vivo* de expresión de la dermonecrotoxina(DNT).

La cepa LBF de *B. bronchiseptica* se empleo como cepa de referencia y fue donada por el Wellcome Research Laboratories, Inglaterra. La cepa SERO 68 (cepa de referencia en Fase III) fue donada por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

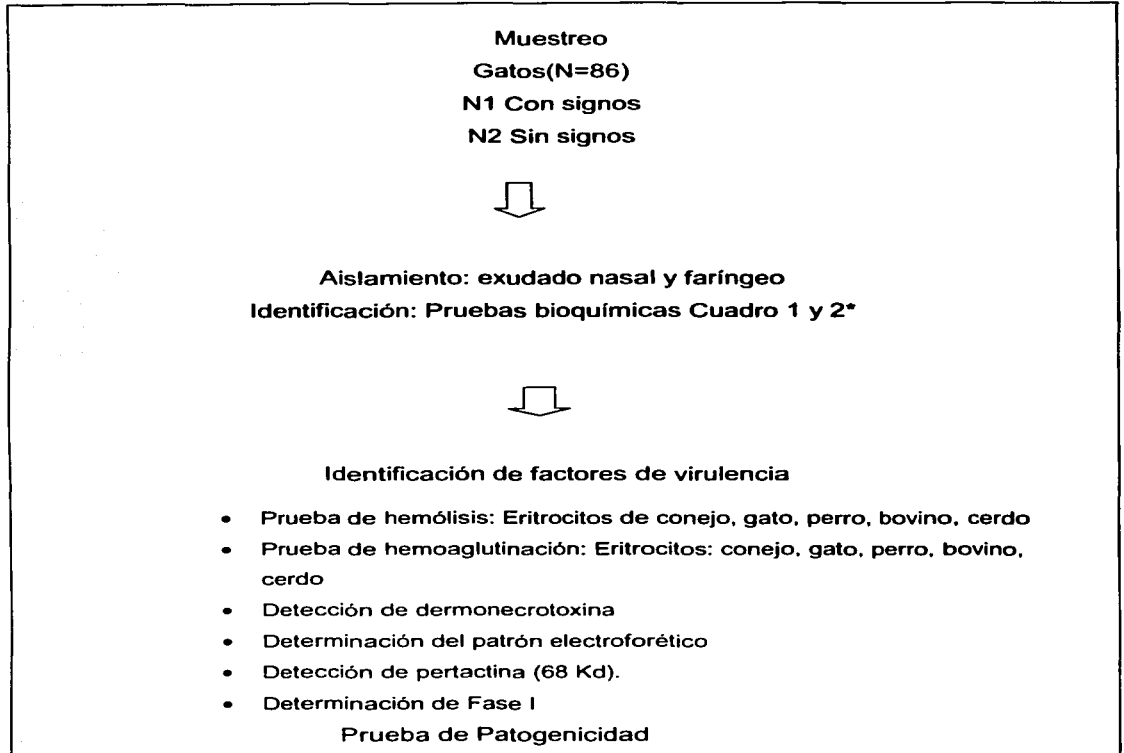
Para realizar el estudio de seroaglutinación se empleó suero hiperinmune elaborado en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán U.N.A.M. donado por éste para el estudio correspondiente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 Metodología

El trabajo se llevó a cabo en dos fases (como se muestra en la Figura 1):

Figura 1 Diagrama de muestreo, identificación y caracterización de cepas



N1 = población de gatos con signos respiratorios; N2 = población de gatos sin signos respiratorios

5.2.1 Muestreo de los gatos y aislamiento e identificación de cepas.

5.2.1.1 Muestreo e identificación de cepas:

Se colectaron exudados nasales y faríngeos a 86 gatos, 36 de vida controlada (de casas particulares) del D.F. y área conurbada Tlalnepantla y Cuautitlán y 50 de gateras (facilitados por RALSTON PURINA México).

Las muestras de exudados se obtuvieron con hisopos estériles, humedecidos con caldo infusión cerebro corazón (BHI; Bioxon), con todas las precauciones debidas para evitar su contaminación y fueron transportados al laboratorio, para procesar las muestras.

Las muestras se sembraron en agar Mac Conkey (Bioxon), incubándose a 37°C durante 48 horas. Posteriormente a las colonias sospechosas se les realizaron tanto las pruebas bioquímicas primarias como las secundarias (cuadros 1 y 2). Las cepas identificadas como *B. bronchiseptica* fueron sembradas en forma masiva para posterior al periodo de incubación cosecharlas y conservarlas en nitrógeno líquido para su uso posterior.

*Cuadro 1. Pruebas primarias de identificación

Prueba	Gram	Motilidad	Catalasa	Oxidasa
	Negativo(-)	Positivo(+)	Positivo(+)	Positivo(+)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Pruebas secundarias de identificación

Citrato	NO ₃	Gelat.	Gluc.	Urea	Rafin.	Rham.	SIM	Manit	Lact	Mano	Sorb.
(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

NO₃ =Nitratos, Gelat.= gelatina, Gluc.= glucosa, Rafin.= rafinosa, Rham.= rhamnosa, SIM= azufre, indol motilidad, Manit.= manitol, Lact.= lactosa, Mano.= manosa, Sorb.= sorbitol

Conservación de las cepas: Una vez identificadas, se crecieron masivamente en cajas con agar Mac Conkey, incubándolas a 37 °C durante 48 horas, después se cosecharon con solución salina fisiológica estéril (SSF), esta suspensión se centrifugó a 2,500 RPM /15min. La pastilla obtenida se colocó en tubos a los que se les añadió suero fetal bovino (SFB; Gibco) y caldo de infusión cerebro corazón (BHI; Bioxon) estéril, se mezclaron y se les colocaron en crioviales a - 4 °C durante 48 horas para colocarse posteriormente en nitrógeno líquido, donde se mantuvieron hasta su utilización, Bárcenas, 1998.

5.2.2 Identificación *in vitro* e *in vivo* de los factores de virulencia de las cepas aisladas mediante diversas técnicas.

5.2.2.1 Prueba de Hemólisis

Las cepas aisladas se sembraron en placas de agar sangre al 5% empleándose eritrocitos de diversas especies animales (gato, perro, cerdo, bovino y ovino), las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas; y finalmente se observó la hemólisis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2.2 Prueba de Hemoaglutinación

Las cepas crecidas en agar Mac Conkey durante 48 horas a 37°C, se cosecharon con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 y se ajustó a una D.O. 1 a 650 nm de longitud de onda. Por otro lado, en microplacas de aglutinación, se realizaron diluciones dobles de eritrocitos de las especies animales, mencionadas en el punto 5.2.2.1 en un volumen de 50 µl; a cada dilución se le adicionó 50 µl de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 5° C durante 24 – 48 horas y el título de la hemoaglutinación se tomó como la más alta dilución en la que se observó aglutinación (Bemis y Plotkin,1982).

5.2.2.3 Determinación de la Dermonecrotoxina (DNT)

La bacteria crecida en forma masiva en agar Mac Conkey se cosechó con solución salina fisiológica estéril (SSF) y se lavó a 2,500 rpm/15 minutos, la suspensión bacteriana se ajustó a una D.O. de 1 con una longitud de onda de 650nm; y se sometió a sonicación por 3 minutos (Cole-Palmer 4710 serie) a 90 Hertz, a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm/15 minutos, y de cada sobrenadante se inoculó intradérmicamente 0.1 ml en el dorso, previamente rasurado, de cuyos jóvenes; por otro lado, se separó una alícuota que se sometió a baño María a 60° C 30 minutos para inactivar a la proteína y asegurar que las lesiones producidas se debieran a la dermonecrotoxina y no al lipopolisacárido, la cual fue empleada como control negativo inoculada bajo las mismas condiciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2.4 Determinación del Patrón Electroforético en geles SDS-PAGE

Se determinó el patrón electroforético de las cepas aisladas mediante el sistema de geles de SDS-PAGE (geles de acrilamida duodecilsulfato de sodio) al 12%. Para ello se obtuvo una suspensión bacteriana posterior a la incubación, se centrifugó a 5,000 rpm /15 min; la pastilla se resuspendió en 5 ml de SSF y se sometió a sonicación durante 3 minutos en cámara de hielo (4°C aprox). El sonicado se centrifugó a 5,000 rpm /15 min, al sobrenadante obtenido se le adicionó 5 volúmenes de acetona en frío, esto para precipitar las proteínas. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 5,000 rpm / 15 minutos y el sedimento se resuspendió en el mínimo volumen necesario de SSF y se guardó en refrigeración hasta su uso.

A las muestras se les determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford,(1976).

Las muestras se corrieron a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml de extracto proteico y en condiciones de reducción usando 2-mercapto-etanol. Al final de la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Comassie.

5.2.2.5 Detección de la pertactina

Establecido el patrón electroforético de cada extracto se determinó la presencia o ausencia de la proteína de 68 Kd mediante la técnica de Inmunoelotransferencia, la cual se realizó transfiriendo las proteínas del gel de poliacrilamida a papel de

nitrocelulosa, posteriormente se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS toda la noche en refrigeración. A continuación el papel se lavó de 4 a 5 veces con PBS-Tween 20 (Sigma), y se enfrentó a anticuerpos monoclonales contra pertactina, Bb07, (proporcionados por el Dr. J.A. Montaraz C. Laboratorio de Inmunología FES-C U.N.A.M.) durante 1 hora a temperatura ambiente manteniéndose en agitación ligera. Después del lavado, se puso en contacto con un conjugado de proteína A peroxidada (Sigma) durante 1 hora adicionando para su revelado, peróxido de hidrógeno y α -cloronaftol, para observar la aparición de bandas de color violeta como positivo.

5.2.2.6 Determinación de la Fase I

La detección de las diferentes fases por las que pasa la bacteria se relaciona con la incorporación de cristal violeta a ésta; en donde la fase I se le considera cuando existe incorporación, sin embargo es muy inestable y rápidamente se transforma en Fase II o III, en las cuales no incorpora el colorante y se considera en Fase no I (Hitoshi, Yasuru, 1997).

A las colonias crecidas en agar BHI (Bioxon) durante 24 horas a 37 °C se les adiciona solución de cristal violeta 1:10,000 en agua destilada y se observa al microscopio la incorporación o no del colorante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3 Prueba de Patogenicidad

Para esta prueba se emplearon 9 gatos de 8 semanas de edad, sin signos clínicos de enfermedad, mantenidos con alimento comercial desde el momento mismo de su selección; los animales se desparasitaron previo examen coproparasitológico aplicándoles el tratamiento específico en cada caso. A estos gatos se les verificó que fueran negativos a *B. bronchiseptica* por seroaglutinación antes de llevar a cabo la prueba.

Los animales se colocaron en jaulas independientes en forma aleatoria, en 3 grupos de 3 gatitos cada uno; al primer grupo de gatos (A, B y C) se les inoculó por punción intratraqueal una dosis de 10^7 UFC/ml de extracto bacteriano de la cepa G47n; la cual fue aislada de un gato sin signos clínicos y no se detectó la presencia de la pertactina ni de la DNT; al segundo grupo (D, E y F) con la cepa G68n que fue aislada a partir de un gato que presentó signos respiratorios y la cual expresó la pertactina y la DNT y el tercer grupo de gatos (G, H e I) se utilizó como control inoculándole solución salina fisiológica. A las 48 horas post inoculación se tomó una muestra vía nasal y faríngea para aislamiento e identificación de las cepas; así mismo a estas cepas se les realizó las pruebas para determinar o detectar los factores de virulencia. Los animales se mantuvieron en observación durante 15 días registrándose su condición clínica diariamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4 Análisis Estadístico

La comparación de proporciones de animales positivos a *Bordetella bronchiseptica* en los diferentes grupos estudiados se realizó mediante la prueba exacta de Fisher (Dawson-Saunders y Trapp, 1993) .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Resultados

6.1 Aislamiento e identificación de *B. bronchiseptica*

Como resultado del muestreo de una población felina de 86 gatos durante un periodo de 6 meses. Se aislaron 19 cepas de *B. bronchiseptica* correspondiendo a un 22 % del total de las muestras. En la tabla 1 se describen los resultados obtenidos mediante las pruebas bioquímicas. Estas cepas aisladas también fueron confirmadas por seroaglutinación.

Tabla 1. Pruebas Bioquímicas de las cepas aisladas

Cepa	Gram	Motilidad	Catalasa	Oxidasa	Citrato	NO ₃	Gelatina	Urea	SIM	CHO's
G20n	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G23n/f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G43f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G47n	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G52f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G62f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G65f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G68n	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G71f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G72f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G76f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G78n	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G79n/f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G80f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G81f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G83f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G84f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G84n	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
G85f	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-

NO₃ = Nitratos; SIM = Azufre, indol, motilidad; CHO's = Carbohidratos; n = Nasal; f = Faríngeo.

CON
FALLA DE ORIGEN

Los muestreos se realizaron en forma aleatoria de gatos con y sin signos clínicos los cuales se describen en las tablas 2 y 2A.

Tabla 2. Número de muestreos en gatos con y sin signos respiratorios

GRUPO	No. MUESTRAS	CON SIGNOS CLINICOS	SIN SIGNOS CLINICOS
PACIENTES CONTROLADOS	36	6	30
PROCEDENTES DE GATERAS	50	9	41
TOTAL	86	15	71

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2A. Aislamientos de *B. bronchiseptica* a partir de gatos con presencia o ausencia de signos clínicos

GRUPO	No. MUESTRAS	CON SIGNOS CLÍNICOS		SIN SIGNOS CLÍNICOS		No. DE AISLAMIENTOS
		+	-	+	-	
PACIENTES CONTROLADOS	36	2	4	0	30	2
GATERAS	50	4	5	13	28	17
TOTAL	86	6	9	13	58	19

(+) = positivos; (-) = negativos.

Los gatos de vida controlada se identificaron inicialmente por nombre y nombre del propietario; mientras que los gatos de gateras se identificaron por número de jaula y sección a la que pertenecían; así mismo se designó una sigla que denota el tipo de exudado de donde fue obtenida la cepa; esto es, n en el caso de nasal, f en faríngeo y n/f en los casos en los que se obtuvo por las dos vías; la tabla 3 describe lo anteriormente mencionado.

El método estadístico empleado en es estudio fue la prueba exacta de Fisher: en la cual los resultados obtenidos muestran que la proporción de aislamientos en las gateras fue significativamente mayor que los aislamientos de gatos de vida controlada $p = 0.0015$ ($p < 0.05$ significativo); mientras que la proporción de positivos entre los que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

no presentan signos clínicos y los que presentan signos clínicos no existió diferencia significativa $p = 0.0877$

Tabla 3. Relación total de los aislamientos de *B. bronchiseptica* a partir de una población de gatos.

CEPA	SEXO	ORIGEN	AISLAMIENTO	OBSERVACIONES
G20n	H	CLÍNICA	N	CS
G 23n/f	H	CLÍNICA	N/F	CS
G43f	M	GATERA	F	SS
G47n	H	GATERA	N	SS
G52f	H	GATERA	F	SS
G62f	H	GATERA	F	SS
G65f	H	GATERA	F	Est
G68n	H	GATERA	N	MO, Est
G71f	H	GATERA	F	SS
G72f	H	GATERA	F	MO FARINGEO
G76f	H	GATERA	F	SS
G78n	H	GATERA	N	MO
G79n/f	H	GATERA	N/F	SS
G80f	M	GATERA	F	SS
G81f	H	GATERA	F	SS
G83f	H	GATERA	F	SS
G84f	H	GATERA	F	SS
G84n	H	GATERA	N	SS
G85f	M	GATERA	F	CQ, MO

H= hembra, M= macho, n= exudado nasal, f= exudado faríngeo, n/f= exudado nasal y faríngeo, CS= con signos, SS= sin signos, Est= estornudos, MO= moco, CQ=caquexia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se realizó la prueba de seroaglutinación como una técnica más de identificación de cepas de *B. bronchiseptica*; en la cual se emplearon sueros hiperinmunes. La tabla 4 muestra los resultados obtenidos del enfrentamiento de las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* con suero hiperinmune vs. *B. bronchiseptica*.

Tabla 4. Resultados de la prueba de sero aglutinación de las cepas aisladas

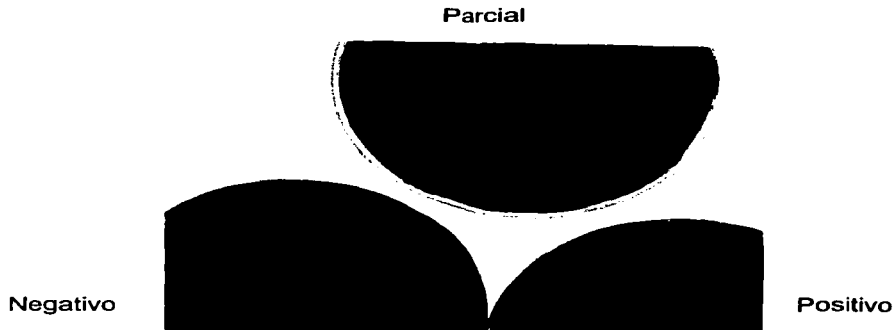
Cepa	1:5	1:50
G20n	-	-
G23n/f	-	-
G43f	+	+
G47n	+	+
G52f	+	+
G62f	+	+
G65f	-	-
G68n	+	+
G71f	+	+
G72f	-	-
G76f	-	-
G78n	+	+
G79n/f	+	+
G80f	+	+
G81f	+	+
G83f	-	-
G84n	+	+
G84f	+	+
G85f	+	+
LBF	+	+

(+) = positivo; (-) negativo

6.2 Prueba de Hemólisis

Las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas no produjeron hemólisis en eritrocitos de gato a excepción de G76f; las cepas G23n/f, G43f, G62f, G65f, G71f, G72f, G76f, G79n/f, G80f, G81f, G83f presentaron hemólisis de eritrocitos de ovino. La cepas G65f, G76f, G20n y G78n presentaron hemólisis con eritrocitos de cerdo y las cepas G23n/f, G62f, G72f, G76f y G79n/f en eritrocitos de bovino mientras que el resto de las cepas presentaron una hemólisis parcial o fueron negativas (Figura 2).

Figura 2. Clasificación de hemólisis producidas por las cepas aisladas de *B. bronchiseptica*



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado casi todas las cepas aisladas presentaron hemólisis en eritrocitos de perro a excepción de las cepas G65f, G76f, G83f y G84n que fueron negativas. Estos resultados se muestran en la Tabla 5

Tabla 5. Prueba de hemólisis de las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* de origen felino.

Cepa	TIPO	DE	ERITROCITOS		
	Ovino	Cerdo	Bovino	Perro	Gato
G20n	+/-	+	-	+	+/-
G23n/f	+	-	+	+	-
G43f	+	-	-	+	-
G47n	-	-	-	+	-
G52f	-	-	-	+	-
G62f	+	-	+	+	-
G65f	+	+	+/-	-	-
G68n	+/-	-	-	+	-
G71f	+	-	-	+	-
G72f	+	-	+	+	+/-
G76f	+	+	+	+/-	+
G78n	-	+	-	+	-
G79n/f	+	-	+	+	-
G80f	+	-	+/-	+	-
G81f	+	-	+/-	+	-
G83f	+	-	-	-	-
G84n	+/-	-	+/-	+/-	-
G84f	-	-	+/-	+	-
G85f	-	-	-	+	-

+ Hemólisis, - No Hemólisis, +/- Hemólisis Parcial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3 Prueba de detección de la Dermonecrotoxina.

La reacción de la Dermonecrotoxina se observó durante las 72 horas posteriores a la inoculación en la piel del cuye; esta se observó como un edema e induración de por lo menos 5 mm de diámetro en el sitio de inoculación como se ilustra en la Figura 3. La expresión de la dermonecrotoxina se observó únicamente con las cepas G43f, G68n, G80f y G85f la cepa LBF se empleó como control positivo y la cepa SERO 68 como control negativo.

Figura 3. Lesión provocada por la dermonecrotoxina de *B. bronchiseptica* en piel de cuye



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.4 Prueba de Hemoaglutinación

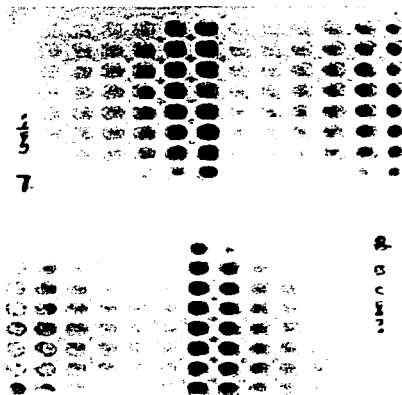
La capacidad de aglutinar glóbulos rojos de varias especies animales entre ellos los de ovino, cerdo, bovino, perro y gato, es considerado como una característica relacionada con la virulencia de cepas de *B. bronchiseptica*. En la Figura 4 se puede observar los resultados de esta prueba. En la Tabla 6 se muestran resultados obtenidos de actividad hemoaglutinante que presentaron las cepas aisladas.

Tabla 6. Títulos hemoaglutinantes de cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de gatos

Cepa	TIPO DE ERITROCITOS				
	Ovino (1:)	Cerdo (1:)	Bovino (1:)	Perro (1:)	Gato (1:)
20n	-	16	8	4	-
23n/f	-	16	-	8	-
43f	16	8	16	4	16
47n	4	2	16	8	8
52f	4	4	16	4	8
62f	4	4	8	4	8
65f	-	8	-	16	-
68n	16	-	16	4	16
71f	4	4	16	4	8
72f	-	4	8	4	16
76f	-	4	-	16	-
78n	4	16	32	4	8
79n/f	4	2	16	4	16
80f	16	8	16	16	16
81f	4	8	16	16	16
83f	-	-	16	8	16
84n	16	8	4	4	16
84f	-	8	-	16	16
85f	4	4	16	4	8
LBF	2	8	16	8	16
Sero68	-	8	-	-	8

Los resultados se expresan como el inverso de la dilución de glóbulos rojos que produjo hemoaglutinación. (-) negativo.

Figura 4. Prueba de hemoaglutinación de cepas aisladas de *B. bronchiseptica*



6.5 Prueba de detección de Fase I

Los resultados de la detección de la Fase I de las bacterias aisladas se muestra en la tabla 7, en esta prueba se pudo observar que la única cepa que incorporó colorante fue la cepa G76f, mientras que algunas otras cepas se encontraban en Fase de transición ya que la incorporación del colorante fue parcial, y el resto de las cepas se encontraron en Fase no I, ya que no incorporaron el colorante. En la figura 5 se puede observar la incorporación del colorante y la no incorporación de este .

Tabla 7. Detección de la Fase I (Hitoshi, Yasuru,1997) en las cepas aisladas de *B. bronchiseptica*

Cepa	Incorporación del colorante
G20n	+/-
G23n/f	+/-
G43f	-
G47n	-
G52f	+/-
G62f	-
G65f	-
G68n	-
G71f	+/-
G72f	-
G76f	+
G78n	-
G79n/f	+/-
G80f	-
G81f	-
G83f	-
G84f	-
G84n	-
G85f	-
LBF	+
Sero1	-

Fase I (+), Transición (+/-), No Fase I (-)

Figura 5. Incorporación del colorante Cristal Violeta para determinar la Fase I en las colonias de las cepas aisladas de *B. bronchiseptica*.

INCORPORACION DE
COLORANTE

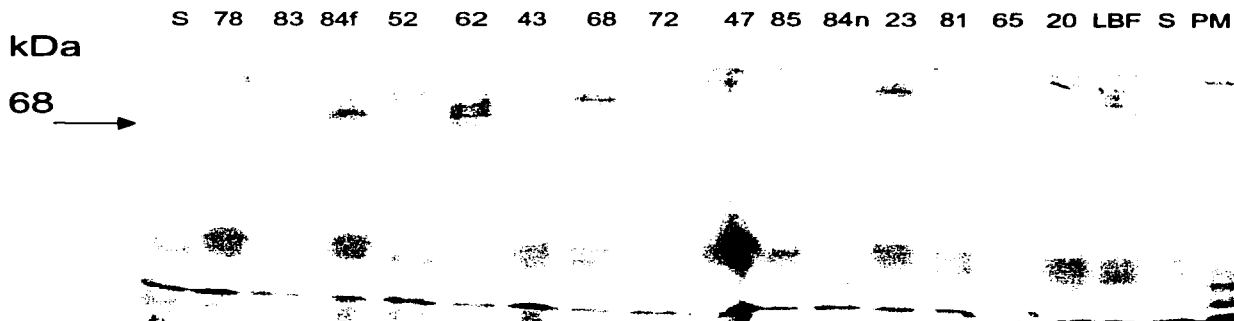


NO INCORPORACION DE
COLORANTE

6.6 Determinación del Patrón Electroforético en geles SDS-PAGE

El patrón electroforético de las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* fue muy similar entre ellas así como de las cepas control LBF y SERO 68. Estos resultados se muestran en la figura 6.

Figura 6. Patrón Electroforético de las cepas aisladas de *B. Bronchiseptica*



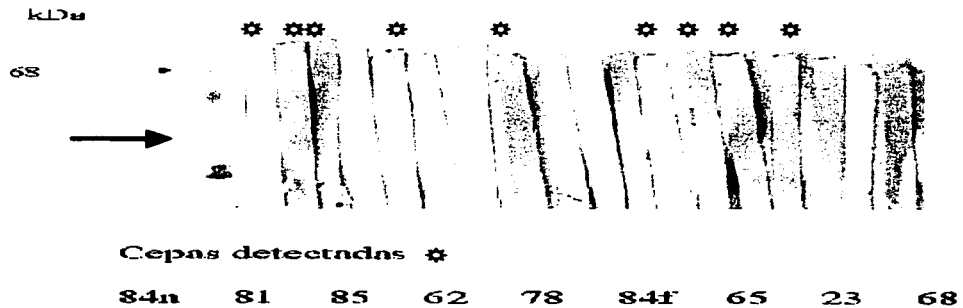
6.7 Detección de la pertactina por Inmunolectrotransferencia

Para evidenciar la presencia de la proteína de 68 kDa se utilizó un anticuerpo monoclonal BB07(Cortesía de J.A. Montaraz), se corrió un control negativo que fue la cepa SERO 68 y un control positivo cepa LBF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las cepas G78n, G23n/f, G85f, G81f, G62f, G68n, G84n, G84f y G65f, se detectó la presencia de la pertactina, lo cual se muestra en la figura 7.

Figura 7. Detección de la pertactina en las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* mediante la técnica de Inmunolectrotransferencia.



6.8 Prueba de Patogenicidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gato D murió a las 24 horas post inoculación, con presencia de moco, estornudos y tos a las 8 horas post inoculación y el gato F al día 12 murió, presentando decaimiento progresivo, fiebre, diarrea, conjuntivitis, linfadenopatía submandibular, el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

gato C falleció al noveno día, con signología de tos, fiebre y decaimiento; el resto de los gatitos fueron sacrificados a los 15 días post inoculación. La Tabla 8 indica la signología presentada por cada uno de los gatitos empleados en esta prueba de patogenicidad.

Tabla 8. Signología de los gatos de prueba de patogenicidad y el tiempo (en horas) de aparición de los mismos

SIGNOS	CEPA 47n (1)			CEPA 68n(2)			CONTROL negativo		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
TOS	96*	72	72	8	48	96	-	-	-
CONJUNTIVITIS	48	-	48	8	24	24	-	-	-
SECRECIÓN OCULAR	72	-	-	-	-	24	-	-	-
ESTORNUDOS	24	72	-	4	24	-	-	-	
FIEBRE	24	48	72	6	24	48	-	-	-
SECRECIÓN NASAL	96	-	-	-	-	96	-	-	-
DECAIMIENTO	48	-	-	-	96	48	-	-	-
ANOREXIA	-	-	-	-	-	96	-	-	-
MUERTE	-	-	216	24	-	288	-	-	-

* los números indican horas post inoculación, (1) cepa aislada de gato sin signos clínicos respiratorios y no se detectó pertactina ni DNT.; (2) cepa aislada de gato con signos clínicos respiratorios y expreso pertactina y DNT, control negativo; inoculado con SSF

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

7. DISCUSIÓN

Las enfermedades respiratorias en gatos han sido asociadas generalmente a infecciones ocasionadas en primer instancia a herpesvirus felino o calicivirus felino (Gaskell y Dawson, 1994). Sin embargo, el papel de *B. bronchiseptica* no ha sido establecido ni como agente primario, ni secundario ni como co-patógeno de las enfermedades respiratorias de gatos, esta problemática también se observa en México; por ende el objetivo principal del presente trabajo fue reportar el aislamiento y caracterización parcial de los factores de patogenicidad de *B. bronchiseptica* a partir de exudados nasales y faríngeos de gatos localizados en el área norte de la Cd. de México y los municipios conurbados de Tlalnepantla y Cuautitlán Izcalli.

Los primeros reportes de enfermedades respiratorias asociadas a *Bordetella bronchiseptica* en gatos fueron realizados en U.K. por Willoughby *et.al.* (1991); posteriormente fue aislada de otros brotes de enfermedad respiratoria en criaderos de raza pura por Elliot (1991); y en 1993, Jacobs *et.al.* aislaron *B. bronchiseptica* de gatos libres tanto de calicivirus como de herpesvirus y que presentaron signos clínicos respiratorios; a partir de esta fecha se le ha otorgado a *B. bronchiseptica* el papel de patógeno primario de enfermedad respiratoria en gatos en Estados Unidos. Estudios de prevalencia de *B. bronchiseptica* en gatos en nuestro país no han sido realizados hasta ahora; sin embargo, nuestros resultados indican una frecuencia muy alta, la cual fue de un 22.09 % (19/86), en total. Comparando los resultados obtenidos por McArdle *et.al.* (1994) y por Hoskins *et.al.* (1998), quienes obtuvieron un 4.9 % (26/527) un 3.1 % (25/614) respectivamente..

Por otra parte, en la mayoría de los trabajos realizados, los aislamientos de *B. bronchiseptica* han sido a partir de lavados traqueobronquiales, como uno de los mejores métodos de aislamiento de éste microorganismo (Jacobs *et.al.* 1993; Hoskins 1998); sin embargo, en este trabajo se muestra que los métodos tanto de exudado nasal como faríngeo pueden ser empleados como métodos rutinarios y eficientes para el aislamiento de *B. bronchiseptica* a partir de gatos con o sin signos clínicos respiratorios.

Roop II, *et.al.* en 1987, mostraron que cepas de *B. bronchiseptica* en primo-aislamiento podían encontrarse tanto en Fase I como en Fase II, III; esto dependiendo de la expresión de los distintos factores de virulencia que las cepas exhibieran. Las cepas de *B. bronchiseptica* que se encuentran en Fase I son consideradas como las más virulentas ya que estas bacterias expresan la mayoría de adhesinas y toxinas como son fitohemaglutinina, dermonecrotoxina, pertactina, entre otras; mientras que las cepas que no se encuentran en Fase I no son tan patógenas. Actualmente ha cambiado la nomenclatura para denominar a las distintas Fases en que se encuentran las cepas de *B. bronchiseptica*, esto es, las cepas que se encuentran en Fase I han sido denominadas como cepas en Modo X; mientras que las cepas que no están en Fase I (incluyéndose cepas en Fase II III y/o IV) han sido designadas en modo C (Hitoshi, Yasuru 1997).

Empleando la metodología diseñada por Hitoshi, Yasuru en 1997 (la cual tiene como base la incorporación del colorante cristal violeta sólo en aquellas cepas que mantienen íntegra su membrana celular) para clasificar a cada una de las cepas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

aisladas, ya sea en modo C o en modo X, los resultados obtenidos mostraron que de las 19 cepas de *B. bronchiseptica* aisladas sólo una cepa (G76 f) mostró estar en modo C, mientras que 5 cepas (G20n, G23 n/f, G71f, G79n/f y G52 f) pueden estar en fase de transición; esto es, de modo C a modo X ya que incorporaron parcialmente el colorante cristal violeta. Los resultados obtenidos mediante esta prueba nos sugieren que sólo la cepa G76f es la cepa más virulenta de todas las cepas aisladas de *B. bronchiseptica*.

Por otra parte y en relación a patogenicidad de las cepas de *B. bronchiseptica*, se sabe que los factores de virulencia están regulados por un gen denominado *bvg* (*Bordetella* virulence genes); hasta la fecha no se conoce el mecanismo o factores que influyen para que este gen se active, por lo que varios investigadores le han llamado gen de autorregulación. Con base en la expresión o no expresión de los factores de virulencia han clasificado al gen en *bvg*⁺ y en *bvg*⁻, respectivamente; sin embargo, otros investigadores han encontrado al gen en expresión parcial, esto es, *bvg*¹ (intermedio) en cepas de *Bordetella* que llegan a expresar sólo algunos factores de virulencia (Katharin E. *et.al.* . 2001). Con base en lo anterior, podemos decir que las cepas G20n, G23n/f, G52f, G71f, G76f, y G79n/f de *B. bronchiseptica* se encuentran en *bvg*¹; ya que mostraron algunos factores de virulencia, entre ellos hemólisis en eritrocitos, expresión de la pertactina así como de la dermonecrotina; estos resultados son fundamentados con los obtenidos con la técnica de cristal violeta.

Por otra parte, en estudios experimentales, se infectó vía aerosol a cachorros de gato SPF con cepas de *B. bronchiseptica*, en los cuales se logró desarrollar la enfermedad a los 5 días post exposición (Jacobs *et.al.*, 1993). En otros estudios se

realizó el desafío vía intranasal, reproduciendo la enfermedad encontrando signología como estornudos, descarga nasal, descarga ocular, tos espontánea o inducida, incremento de sonidos pulmonares, fiebre, aumento de ganglios regionales (Coutts *et.al.*, 1996; Hoskins *et.al.*, 1998). En nuestro experimento el desafío vía intratraqueal a gatitos libres de la enfermedad y de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, también se logró reproducir el cuadro de signología obtenido por los investigadores antes mencionados; incluyendo en nuestro caso la muerte de uno de ellos a las 24 horas post-inoculación. En el presente trabajo se logró reaislar la bacteria de los gatos infectados, la cual fue identificada y caracterizada mediante las mismas técnicas descritas en la metodología, incluyendo los factores de virulencia, en donde se vio la expresión de la pertactina y de la dermonecrotoxina.

Se ha señalado que *B. bronchiseptica* forma parte de la microbiota del tracto respiratorio del perro, no así del gato(Clapper,Mende, 1963; McKieman, *et.al.*, 1984); sin embargo, estudios de la transmisión natural de éste microorganismo en una gatera endémicamente infectada con *B. bronchiseptica*, dos gatas preñadas que presentaron títulos de anticuerpos, fueron aisladas y separadas al momento del parto observándose la eliminación de la bacteria posterior al parto, sin embargo sus crías no fueron infectadas (Coutts *et.al.*, 1996;. Binns *et.al.*, 1999). En otros estudios han aislado al microorganismo en un 11% de gatos muestreados de diferentes procedencias encontrando relación de su hallazgo con enfermedad respiratoria. La posibilidad de que exista una transmisión inter-especie de *B. bronchiseptica* ha sido sugerida por Elliot, (1991). Basándonos en reportes de distribución de la bacteria entre animales de laboratorio, en nuestro estudio la presencia de la bacteria es definitivamente de mayor

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

consideración en los animales provenientes de gateras sobre los que están en vida controlada (gatos controlados 2/36 y gatos de gateras 17/50) lo que concuerda con los resultados obtenidos por Elliot (1991).

La hemólisis producida en eritrocitos de perro por las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de gatos fue franca a diferencia de los resultados obtenidos del estudio hecho por Molina (2001); en el estudio de Molina (2001) no se observó lisis de eritrocitos de ninguna especie animal empleados, sin embargo cabe mencionar que las cepas de *B. bronchiseptica* empleadas en ese trabajo fueron aisladas de perros. En el presente trabajo se produjo hemólisis de eritrocitos de perro con casi todas las cepas aisladas a excepción de la G65f y G83f; como se sabe la actividad hemolítica de *B. bronchiseptica* reside en la adenilato ciclasa-hemolisina, la cual también depende o esta regulada por la expresión del gen *bvg*⁺.

Diversas bacterias patógenas que colonizan superficies epiteliales poseen antígenos asociados a su superficie a los que se les conoce como factores de colonización que facilitan la multiplicación en los tejidos del huésped. Estos se producen *in vitro* bajo condiciones adecuadas de crecimiento y frecuentemente se identifican como hemoaglutininas, (Brook *et.al.*, 1987; Roth, 1988). La capacidad de *B. bronchiseptica* de aglutinar eritrocitos se conoce desde hace mucho tiempo; *B. bronchiseptica* puede aglutinar una gran gama de células de distintas especies como se han reportado en distintos trabajos, en los cuales se ha observado que aislados de *B. bronchiseptica* de origen equino aglutinaron eritrocitos de humano, caballo y ovino (Gallager, 2001; Molina, 2001). Así mismo Joubert *et.al.* 1960 observaron que un

aislamiento proveniente de cerdo aglutinó eritrocitos de humano tipo "O" y de ovino pero no de equino. Otros investigadores observaron que el 65 % de 17 aislamientos de *B. bronchiseptica* a partir de humanos, perro, gato, cerdo, conejo y cobayo aglutinaron eritrocitos de humano, mono, cobayo, cerdo, carnero, pollo y caballo, (Gallager, 1965; Joubert, *et.al.* 1960 and Thibualt, *et.al.* 1955). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* aglutinaron en un alto porcentaje a los eritrocitos de las distintas especies animales probadas. Al igual que en el estudio de Molina, (2001) todas las cepas aisladas aglutinaron los eritrocitos de perro, no así a los eritrocitos de gato en donde solo aglutinaron el 79 %. Al igual que la actividad de lisar glóbulos rojos, la actividad aglutinante de *Bordetella* esta regulada por el sistema sensor transductor BvgAS (Bemis y Plotkin ,1982).

En el presente trabajo al realizar los ensayos *in vivo* de actividad dermonecrótica de los extractos de lisados bacterianos en piel de cuyos se observó que únicamente presentaron esta actividad cuatro cepas, en el transcurso de 72 horas; aún cuando el género *B. bronchiseptica* produce la toxina dermonecrótica y produce las lesiones 13 horas después de su inoculación intradérmica de 50 µl de lisados celulares crudos, Walker y Weiss (1994).

Montaraz *et.al.*, (1985) identificaron la proteína de 68 kDa en la membrana de *B. bronchiseptica* empleando para ello dos anticuerpos monoclonales BB07 y BB05 obtenidos en el mismo estudio; ambos anticuerpos monoclonales presentan la capacidad de proteger a ratones contra la bacteria. Novotny *et.al.* en 1985 observaron que cepas no patógenas de *B. bronchiseptica* no expresaban la proteína de 68 kDa

pero las cepas patógenas si la presentaban, sugiriendo que tal vez fuera un factor de virulencia, presentando resultados similares Barcenas *et.al.* (1996). En este estudio se reconoce que esta proteína es la que actualmente recibe el nombre de pertactina y es un antígeno importante en la inmunización contra la tosferina, producida por *B. pertussis*, Fine y Clarkson, 1987; Canthaboo, C. *et.al.* 2001. En el presente trabajo se empleó el anticuerpo monoclonal Bb07 con el que se pudo observar la presencia de la pertactina en nueve de las cepas aisladas,.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos considerar a *B. bronchiseptica* como un microorganismo que se encuentra en el tracto respiratorio de la población felina en el D.F. y área conurbada de Tlalnepantla y Cuautitlán.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos nos indican la prevalencia de *B. bronchiseptica* en un 22% de la población felina estudiada, el cual es un dato bastante alto, considerando el tamaño poblacional y la frecuencia de muestreo.
- La toma de muestras a partir de exudados nasales y faríngeos pueden ser considerados como métodos buenos para el aislamiento de cepas de *Bordetella bronchiseptica*.
- El aislamiento de *B. bronchiseptica* de gatos de vida controlada sólo se realizó en dos que presentaban signos respiratorios; mientras que en los gatos de gateras se aisló *B. bronchiseptica* tanto de gatos con signología como sin signología de enfermedad respiratoria.
- Las cepas aisladas de gatos expresaron factores de virulencia similares a los reportados para aislamientos en otras especies animales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. Bibliografía

Angus, J.C., Jans, S.S. and Hirsh, D.C. 1997. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease. 264 cases(1995). JAVMA 210(1):55-58.

Bárceñas, G., 1998. Comparación de la respuesta inmune humoral de cerdos inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* y la desarrollada en casos clínicos de Rinitis Atrófica. Tesis de Maestría en ciencias (área Microbiológica). F.E.S.Cuautitlán U.N.A.M.

Bárceñas, G., Rosales, M.E., Montaraz, J.A. 1996. Comparison of the humoral immune responses of pigs with atrophic rhinitis and pigs vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*. Indian. Vet. J. 73:818-821.

Belford Chris Bronchias wash & broncho alveolar lavage sampling procedures. <http://www.priory.com/bronwash.htm>.

Bedford P.G.C. 1989. Diseases of the nose and throat, Textbook of Veterinary Internal Medicine, Stephen Ettinger. W.B. Saunders Company. 67; 778

Bemis, D.A. and Appel, J.G. 1977. Aerosol, parenteral and oral antibiotic treatment of *Bordetella bronchiseptica* infection in dogs. JAVMA 170(10):1082-1086.

Bemis, D.A., Carmichael, L.E. and Appel, J.G. 1977. Natural occurring respiratory disease in kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. Cornell Vet. 67:282-293

Bemis, D.A. and Kennedy, J.R. 1981. An improved system for studying the effect of *Bordetella bronchiseptica* on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cell. J. Infect. Dis. 144:349-357.

Bemis, D.A. and Plotkin, B.J. 1982. Hemagglutination by *Bordetella bronchiseptica*. J.Cli.Microbiol. 15(6):1120-1127.

Binns S.H., Speakman A.J., Dawson S., Bennett M., Gaskell R.M., y Hart C.A. 1998. The use of pulsed-field gel electrophoresis to examine the epidemiology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from cats and other species. Epidemiol Infect. 120, 201-208. Printed in the United Kingdom, Cambridge University Press.

Binns S.H., Dawson S., Speakman A.J., Cuevas L.E., Gaskell C.J., Hart C.A., Morgan K.L., Gaskell R.M. 1999. Prevalence and risk factors for feline *Bordetella bronchiseptica* infection. The Veterinary Record 144: 575-580.

Boursaux C., Guiso N., 2000. Polymorphism of Repeated Regions of Pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. Infection and Immunity 68(8), 4815-4817

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microrquantities of protein. *Anal. Biochen.* 72:248-254.

Brokmeier S., Register K., 2000. Effect of temperature modulation and *bvg* mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival an cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 73, 1-12.

Canthaboo C., Williams, L., Xing, D.K.L., Corbel M.J. 2001. Investigation of cellular and humoral immune responses to whole cell and acellular pertussis vaccines. *Vaccine* 19:637-643.

Carter G.R., Chengappa, M.M. 1994. *Bacteriología y Micología Veterinarias, Aspectos esenciales.* Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.

Clapper W.E. and Made G.H.,1963. Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dogs. *Journal of Bacteriology.* 85:643-648.

Collings, L.A. and Rutter, J.M., 1985. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract *J. Med. Microbiol.* 19: 247-258.

Confer, D.L. and Eaton, J.W., 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science.* 217: 948-950.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Coutts A.J., Dawson S., Binns S., Hart C.A., Gaskell C.J., Gaskell R.M. 1996. Studies on natural transmission of *Bordetella bronchiseptica* in cats. *Veterinary Microbiology* 48:19-27.

Dawson-Saunders E., Trapp R.G. 1993. *Bioestadística Medica*. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 174-176.

Dawson S., Jones D., McCracken C.M., Gaskell R.M., Hart C.A., Gaskell C.J. 2000. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. *The Veterinary Record*.

Elliott H. 1991. *Bordetella bronchiseptica* in a closed cat colony. *The Veterinary Record*, 29, 474-475.

Farrington, D.D. and Switzer, N.P. 1977. Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. *JAVMA* 170: 34-35.

Ferry, N.S., 1910. A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. *Am Vet. Rev.* 37: 499-504.

Ferry, N.S., 1912. *Bacillus bronchisepticus (bronicanis)*: the cause of distemper in dogs and similar disease in other animals. *Vet.* 68: 376-391.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fine P.E.M., Clarkson J.A. 1987. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev. Infect. Dis.*, 9:866-883.

Ford RB. 1997. Common Therapeutic mistakes in the management of feline upper respiratory infections. Supplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 19 (3) 28-31.

Ford RB., Walshaw R. 1980. Feline upper respiratory disease. *Current Veterinary Therapy VII, Small Animal Practice*. W.B. Saunders Company 224

Garrod T.I., Ward P.N., Lax A.J. 1994. Partial purification and characterization of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Zentralblatt für Bakteriologie Supplement*, 24: 86-87 <http://www.iah-bbsrc.ac.uk./reports/1994/3wbord.htm>.

Gaskell, R.M., Dawson, S., Jacobs, A.A.C. and Seawell, B.W. 1997. The role of *Bordetella* in feline respiratory disease. *Consultations in Feline Internal Medicine* 3. W.B. Saunders Co.

Goodnow, A.R. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* 44(4):722-738.

Gueirard, P. and Guiso, N. 1993. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: Role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 61(10):4072-4078.

Hanada, M., Shimoda, M., Tomita, S., Nakase, Y. Ande Nishiyama, Y., 1979. Production of lesions similar to naturally occurring swine atrophic rhinitis by cell-free sonicated extract of *Bordetella bronchiseptica*. Jpn. J. Vet. Sci. 41: 1-8.

Heiss, L.N., Lancaster, J.R., Carbett, J.A., Goldman, W.E. 1994. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. Proc. Natl. Acad.Sc.USA91:267-270.

Hewlet, E. And Wolf. J., 1976. soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. J. Bacteriol. 127: 890-898.

Hitoshi, I., Yasuro, I. 1997. Cristal violet staining of *Bordetella bronchiseptica* colonies for the differentiation of phase-I strains from variant strains in degraded phases. Can. J. Vet. 61;232-234.

Hoskins J.D., Williams J., Roy A.F., Peters J.C. McDonough P. 1998. Veterinary Immunology and Immunopathology 65; 173-176.

Jacobs A.A.C., Chalmers W.S.K., Pasman J., vanVugt F., Cuenen L.H., 1993. Feline bordetellosis; Challenge and vaccine studies. The Veterinary Record 133, 260-263 Sep.

Joubert, L., Courtieau, A.I. and Ouder, J. 1960 Pneumonie enzootique du porc a *Bordetella bronchiseptica*. Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon. 63:329-344

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Keil J.D. and Fenwick B. 1999. Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and ribotyping. *Vet. Microbiology*. 66:41-51.

Katharyn E., Bryna Fuchslocher, Jeff F. Miller and Peggy A Cotter. 2001. Identification And characterization of Bip A, a *Bordetella Bvg*-intermediate phase protein. *Molecular Microbiology* 39 (1), 65–78.

Katsumi K., Toyotsugu N., Yuji S., Chihiro S. 1986. Properties of Demonecrotic Toxin Prepared from Sonic Extracts of *Bordetella bronchiseptica*: Infection and Immunity 52(4) 370-377.

Labaw, L.W. and Mosley, V.M., 1955. Peridic structure in the flagella of *Brucella bronchiseptica*. *Biochem Biophys. Acta*. 17: 322-324.

Lacey, B.W., 1953. The influence of growth conditions on the antigenic structure of *Haemophilus pertussis*, *parapertussis* and *bronchisepticus*. In sixth International Congress of Microbiology. Rome, Italy. 1: 357.

Lacey, B.W. 1960. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg. Camb*. 58: 57-93.

Leslie, P.H. and Gardner, A.D., 1931. The phases of *Haemophilus pertusis*. *J. Hyg*. 31: 423-434.

Matsumaya, T. and Takino, T., 1980. Scanning electron microscopic studies of *Bordetella bronchiseptica* on the rabbit tracheal mucosa. J. Med. Microbiol. 13: 159-161.

McArdle H.C., Dawson S., Coutts A.J., Bennett M., Hart C.A., Ryvar R., Gaskell R.H., , 1994. Seroprevalence and isolation rate of *Bordetella bronchiseptica* in cats in the UK. The Veterinary Record 135, 506-573

McKierman B.C., Smith A.R., Kissil M., 1984. Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 20:139-142.

Molina M.G. 2001. Aislamiento y Caracterización de *Bordetella bronchiseptica* de origen Canino. Tesis de Maestría en Ciencias (Area Microbiología) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Montaraz, J.A., Novotny, P. And Yuanyi, J. 1985. Identification of 68-kilodalton protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun 66: 670-675.

Nakase, Y., 1957. Studies on *Haemophilus bronchisepticus* I. The antigenic structures of *H. bronchisepticus* from guinea pig. Kitasat Arch. Exp. Med. 30: 57-72.

Nakase, Y., 1957. Studies on *Haemophilus bronchisepticus*. II. Phase variation of *H. bronchisepticus*. Kitasato Arch. Exp. Med. 30: 73-77

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Novotny,P., Kobish, M., Cownley, K. and Montaraz, J.A. 1985. Adenylate cyclase activity of a 68,000-molecular-weight protein isolated from the outer membrane for *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 50:199-206.

Oddy, J.G., and Evans, D.G., 190. The effects produced by toxic and nontoxic extracts of *H. pertussis* and *B. bronchiseptica* on the blood sugar of rabbits. *J. Pathol.* 56: 11-16.

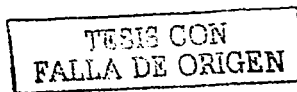
PascaleG., Nicole G., 1993. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin. *Infection and Immunity* 61(10) 4072-4078.

Passerini de Rossi B.N., Friedman L.E., Darnaud S., de Torres R.A., Franco M.A. Flagellin, a major protein present in SDS-PAGE profiles of Sakosyl-OMP-enriched fractions from *Bordetella bronchiseptica* Bvg- or modulated Bvg + strains. *Veterinary Microbiology* 56 (1997) 65-77.

Pittman, M., 1974. Genus *Bordetella* Moreno-López 1952, p 282-283 In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Richter, G.W. and Krees, Y., 1967. Electron microscopy of a strain of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 94: 1216-1224.

Roitt Ivan M., Brostoff J., Male D.K. 1993. *Inmunología* tercera edición. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Salvat Medicina



Roop II, M.R., Veit, H.P., Sinsky, R.J., Hewlett E.L. Kornegay, E. 1987. Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Infect. Immun.* 55:217-222.

Roth, A.J. 1988. Overview of bacterial infection mechanisms in: Virulence mechanism of bacterial pathogens. Ed. American Secretary for microbiology. Washington.

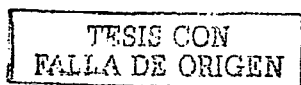
Roudebush P, Fales WH. 1987. Antibacterial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from small companion animals with respiratory disease. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17: 793,

Sacco R. E., Register K. B., Nordholm G.E. 2000. Restriction Endonuclease Analysis Discriminates *Bordetella bronchiseptica* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38(12): 4387-4393.

Semjen, G. and Magyar, T., 1985. A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* responsible for adherence. *Acta. Vet. Hungarica.* 33: 129-136.

Smith I.M. and Baskerville. 1979. A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs *Res. Vet. Sci.* 27:187-192.

Smith, T., 1913. Some bacteriological and environmental factors in the pneumonias of lower animals with special reference to the guinea pig. *J. Med. Res.* 29: 291-323.



BY A TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Speakman A.J., Binns SH; Osborn AM; Corkill JE; Kariuki S; Saunders JR, Dawson S; Gaskell RM; Hart CA. 1997. Characterization of antibiotic resistance plasmids from *Bordetella bronchiseptica*. J. Antimicrob Chemother, 40(6): 811-6

Speakman AJ; Binns SH; Dawson S; Hart CA; Gaskel RM. 1997. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. Veterinary Microbiology 54 ; 63-72.

Speakman AJ., Dawson S., Corkill JE., Binns SH., Hart CA., Gaskell. 2000. Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. Veterinary Microbiology 71, 193-200.

Switzer WP, Maré CJ, Hubbard ED. 1966. Incidence of *Bordetella bronchiseptica* in wildlife and man in Iowa. Am J Vet Res 27: 1134,

Thibault, P., Szturm-Rubinstein, S. and Piechaud-Bourbon. 1955 *Haemophilus bronchisepticus* et *Alcaligenes fecalis*. I. De quelque caracteres differentials. Ann. Inst. Pasteur. 88:246.

Walker, K.E. and Weiss, A.A. 1994. Characterization of dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. Infect. Immun. 62(9):3817-3828.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Weiss, A.A., Hewlet, E.L., Myers, G.A. and Kalkow, S., 1984. *Pertussis* toxin and extracellular adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. J. Infect. Dis. 50: 219-222.

Welsh Ronald D. 1996. *Bordetella bronchiseptica* infections in cats. Journal of the American Animal Association. March/April, Vol 32.

Willoughby K; Dawson S; Jones RC; Symons M; Daykin J; Payne-Johnson C; Gaskell RM; Bennett M; Gaskell CJ. 1991. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from kittens with pneumonia in a breeding cattery. The Veterinary Record. November 2.

Yokomizo, Y. And Shimizu, T., 1979. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res. Vet. Sci. 27: 15-21.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN