



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de  
*Bordetella bronchiseptica* de origen bovino y humano.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTAN:

**MARIA DEL CARMEN FRANCISCO CORONADO**

**DALILA MARTINEZ MENDOZA**

ASESORA:

**DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES  
 ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de Bordetella bronchiseptica de origen bovino y humano.

que presenta la pasante: Dalila Martínez Mendoza  
 con número de cuenta: 30026469-0 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Abril de 2009.

|                  |  |  |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE       | <u>Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo</u>  |  |
| VOCAL            | <u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>       |  |
| SECRETARIO       | <u>Dra. Gabriela Barcenás Morales</u>    |  |
| PRIMER SUPLENTE  | <u>M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa</u> |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>Q.F.B. David Oliva Martínez</u>       |  |



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de Bordetella  
bronchiseptica de origen bovino y humano.

que presentala pasante: Maria del Carmen Francisco Coronado  
con número de cuenta: 30027010-7 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de ABRIL de 2009.

PRESIDENTE DR. Juan Antonio Montaraz Crespo

VOCAL M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

SECRETARIO Dra. Gabriela Bárcenas Morales

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. David Oliva Martínez

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo para Cátedras de Investigación, Vinculación y Educación (PACIVE) con clave CONS-104, por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con la clave del proyecto: IN207908, y por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social con el Proyecto CONACYT con clave: SALUD-2007-C01-69001.

### ***Dalila:***

A **Dios** porque en silencio tu siempre me has acompañado a lo largo de mi vida y sin pedirme nada a cambio, hoy me regalas la alegría de ver realizado uno de mis más grandes sueños, guarda mi corazón cerca de ti y guíame día con día en el camino que lleva hacia a ti.

A mis **Papás** por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de todo este tiempo, por su paciencia, por sus consejos, por sus llamadas de atención, por su compañía en los buenos y malos momentos. No tengo como pagarles todo lo que me han dado, pero si les puedo decir que los Amo y que Dios los bendiga mucho.

A mis hermanos: **Eri, Sam** y **Rubi** por todo el amor y el apoyo que me han dado, porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado. Los quiero no lo olviden nunca.

A **Car** por haber compartido conmigo este lindo proyecto que hoy por fin vemos terminado.

A **Maru** por tu amistad y por todo el tiempo, dedicación y paciencia que invertiste durante mi estancia en el laboratorio.

---

A la **Dra. Gaby**, por sus palabras de aliento, por sus enseñanzas, por su apoyo y dedicación durante la elaboración de este trabajo.

A **Jacobo** por todo el apoyo que nos brindaste en la realización de este proyecto.

A **Hugo Hernández, Miguel** y al **Dr. Pablo Labat Martínez** por la sangre de gato proporcionada para poder concluir con este trabajo.

A **Ofelia, Edgar, Ana Inés, Erick, Jesse, Isaías, Ana Elda, Eli, Edith, Betsa y Dani**, por todo su apoyo, amistad y sobre todo por compartir conmigo momentos inolvidables.

A **Mary, Pam, Jenn, Marduck, Jose, Itzmel, Marco, Alex, Angie, Lety, Miguel, Hugo, Heber, Paco, Jimmy, Juan** y a la **manada**, por que siempre han estado ahí para escucharme, platicar o simplemente para disfrutar de la vida.

A todos los **Profesores** que directa o indirectamente han contribuido a mi formación como persona y profesionista.

Y claro, Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, la máxima casa de estudios, y a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por abrirme las puertas al conocimiento.

---

***Carmen:***

***A MIS PADRES***

Gracias por no juzgar, por escuchar sin opinar, por hacerme saber que siempre estarán a mi lado, gracias por su paciencia y apoyo durante todo este tiempo, gracias por sus consejos y el haberme brindado lo que necesitaba para lograr esta meta, gracias por todo, los quiero mucho.

***A MI HERMANA***

Gracias a Dios por colocarla en mi camino, es el mejor regalo que me ha dado, gracias a ella encuentro el valor para seguir adelante, por que ella siempre esta a mi lado, por que me regala la alegría de ver su mirada, sus sonrisas, sus besos, y me escucha cuando nadie quiere y no son necesarias las palabras para saber que me comprende y todo sin pedirme nada a cambio T. Q. M.

***A MIS AMIGOS***

Mil gracias por todo lo que me han dado, Eva, Angélica, Nallely por estar siempre conmigo en los peores momentos y en los mejores, por haberme permitido entrar en sus vidas, por que gracias a ustedes se que puedo creer en mi.

Gracias a Gaby, Naty, Sivia, Miguel Juan por que se que en ustedes puedo confiar y se que siempre estarán a mi lado, por los mejores momentos que me han hecho pasar.

Gracias por los amigos y compañeros que encontré durante esta etapa de mi vida, a Anabel, Tamara, Lucy., Itzmel, Mireya, Pilar, Bety, Judith, Diana, Laura, Angie Jorge, Marduck, Jacobo, José, Marco, Hugo, Alejandro y al resto de mis compañeros gracias por todo y espero que en un futuro aún los siga viendo.

***DALILA***

Solo quiero que sepas que estoy muy agradecida por tenerte como amiga y compañera por el gran apoyo y esfuerzo que realizaste para que este trabajo se llevara acabo mil gracias.

***MARU***

Gracias por confiar en mi y por todo lo que me enseñaste, por ser más que una tutora, una amiga en la que puedo confiar.

***DRA. GABY***

Gracias por su paciencia durante todo este tiempo, por su apoyo y confianza y espero haber correspondido como usted deseaba.

---

---

---

**Índice**

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| I. RESUMEN.....  | I           |
| II. LISTA DE ABREVIATURAS.....                                     | III         |
| III. LISTA DE TABLAS.....  | V           |
| IV. LISTA DE FIGURAS.....  | VIII        |
| <br>   |             |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1           |
| 1.1 Antecedentes.....  | 1           |
| 1.2 Género <i>Bordetella</i> .....                                 | 2           |
| 1.2.1 Taxonomía.....   | 2           |
| 1.2.2 Características generales del género <i>Bordetella</i> ..... | 2           |
| 1.3 <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....                         | 5           |
| 1.3.1 Morfología.....  | 5           |
| 1.3.2 Características de cultivo.....                              | 6           |
| 1.3.3 Hábitat.....   | 7           |
| 1.3.4 Transmisión.....   | 7           |
| 1.3.5 Epidemiología.....   | 8           |
| 1.3.6 Resistencia.....   | 9           |
| 1.3.7 Estudios de susceptibilidad a agentes antimicrobianos.....   | 9           |
| 1.3.8 Factores de virulencia.....                                  | 11          |
| 1.3.9 Mecanismos de patogenicidad.....                             | 16          |
| 1.3.10 Enfermedades.....   | 16          |
| 1.3.11 Importancia médica.....                                     | 18          |
| 1.3.12 Tratamiento.....  | 19          |
| 1.3.13 Prevención.....   | 19          |
| 1.3.14 Inmunidad.....  | 20          |
| 1.4 Fiebre de embarque.....  | 22          |
| <br>   |             |
| 2. OBJETIVOS.....  | 25          |
| 2.1 Objetivo general.....  | 25          |
| 2.2 Objetivos particulares.....                                    | 25          |

---

---



---

|   |    |
|---|----|
| 3. HIPÓTESIS.....   | 27 |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....   | 28 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 29 |
| 5.1 Diagrama de flujo general.....  | 29 |
| 5.2 Muestreo y aislamiento.....   | 30 |
| 5.3 Pruebas bioquímicas primarias.....  | 31 |
| 5.4 Pruebas bioquímicas secundarias.....  | 32 |
| 5.5 Conservación de cepas en nitrógeno líquido.....   | 34 |
| 5.6 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....   | 35 |
| 5.7 Preparación de suspensiones bacterianas.....  | 36 |
| 5.8 Obtención de los extractos proteicos bacterianos.....   | 36 |
| 5.9 Determinación de la concentración de proteínas presente en los extractos proteicos bacterianos.....                                       | 37 |
| 5.10 Determinación de la Fase I por medio de la técnica de tinción de cristal violeta.....  | 37 |
| 5.11 Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE.....   | 38 |
| 5.11.1 Preparación y corrimiento de las muestras.....   | 40 |
| 5.11.2 Tinción de geles de poliacrilamida.....  | 40 |
| 5.11.3 Curva patrón de la movilidad relativa de proteínas.....  | 40 |
| 5.11.4 Cálculo del coeficiente de movilidad relativa de las proteínas...  | 41 |
| 5.12 Prueba de aglutinación de las cepas bacterianas empleando sueros hiperinmunes contra <i>B. bronchiseptica</i> y <i>B. pertusis</i> ..... | 41 |
| 5.13 Caracterización de los factores de virulencia de las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> .....   | 42 |
| 5.13.1 Prueba de hemólisis.....   | 42 |
| 5.13.2 Prueba de hemaglutinación.....   | 43 |
| 5.13.3 Prueba de la DNT.....  | 44 |
| 6. RESULTADOS.....  | 45 |
| 6.1 Muestreo y aislamiento.....   | 45 |

---

---

|  |    |
|--|----|
| 6.2 Pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación del microorganismo.....                                     | 45 |
| 6.3 Susceptibilidad antimicrobiana.....  | 49 |
| 6.4 Determinación de la Fase I en las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> por medio de la técnica de tinción de cristal violeta..... | 50 |
| 6.5 Obtención de los extractos proteicos bacterianos.....  | 51 |
| 6.5.1 Lisado de las bacterias por sonicación.....  | 51 |
| 6.5.2 Análisis de los extractos proteicos bacterianos.....   | 51 |
| 6.5.3 Electroforesis de los extractos proteicos bacterianos.....   | 53 |
| 6.6 Caracterización de los factores de virulencia de las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> .....                                   | 57 |
| 6.6.1 Producción de hemólisis en agar sangre.....  | 57 |
| 6.6.2 Prueba de aglutinación.....  | 59 |
| 6.6.3 Prueba de hemaglutinación.....   | 60 |
| 6.6.4 Prueba de la DNT.....  | 63 |
| 7. DISCUSIÓN.....  | 64 |
| 8. CONCLUSIONES.....   | 75 |
| 9. ANEXOS.....   | 76 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA.....  | 82 |

---

---

**II. LISTA DE ABREVIATURAS**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <i>ASB</i>               | <i>Albumina Sérica Bovina</i>           |
| <i>BHI</i>               | <i>Infusión Cerebro-Corazón</i>         |
| <i>B. bronchiseptica</i> | <i>Bordetella bronchiseptica</i>        |
| <i>cm</i>                | <i>Centímetros</i>                      |
| <i>d</i>                 | <i>Daltons</i>                          |
| <i>seg</i>               | <i>Segundos</i>                         |
| <i>DNT</i>               | <i>Dermonecrotoxina</i>                 |
| <i>D.O</i>               | <i>Densidad Optica</i>                  |
| <i>g</i>                 | <i>Gramos</i>                           |
| <i>h</i>                 | <i>Horas</i>                            |
| <i>Kd</i>                | <i>Kilodaltons</i>                      |
| <i>Log</i>               | <i>Logaritmo</i>                        |
| <i>min</i>               | <i>Minutos</i>                          |
| <i>mL</i>                | <i>Mililitros</i>                       |
| <i>nm</i>                | <i>Nanómetros</i>                       |
| <i>P.M</i>               | <i>Peso Molecular</i>                   |
| <i>RAP</i>               | <i>Rinitis Atrófica Porcina</i>         |
| <i>Rf</i>                | <i>Coficiente de Movilidad Relativa</i> |
| <i>rpm</i>               | <i>Revoluciones Por Minuto</i>          |
| <i>SSF</i>               | <i>Solución Salina Fisiológica</i>      |
| <i>SDS</i>               | <i>Dodecil Sulfato de Sodio</i>         |
| $\mu\text{g}$            | <i>Microgramos</i>                      |
| $\mu\text{L}$            | <i>Microlitros</i>                      |

|             |                           |
|-------------|---------------------------|
| $\mu m$     | <i>Micrómetros</i>        |
| $mm$        | <i>Milímetros</i>         |
| $^{\circ}C$ | <i>Grados centígrados</i> |
| $\lambda$   | <i>Longitud de onda</i>   |

---

### III. LISTA DE TABLAS.

|  | <i>Pág.</i> |
|--|-------------|
| <b>Tabla 1.1.</b> Propiedades biológicas y bioquímicas de las especies de <i>Bordetella</i> .....  | <b>4</b>    |
| <b>Tabla 5.1.</b> Lista de antibióticos y concentraciones utilizados en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....   | <b>35</b>   |
| <b>Tabla 5.2.</b> Curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (ASB) al 0.01% como proteína patrón.....  | <b>37</b>   |
| <b>Tabla 5.3.</b> Presenta el tipo código para llevar a cabo la identificación del tipo de hemólisis producida en agar sangre.....   | <b>43</b>   |
| <b>Tabla 6.1.</b> Pruebas bioquímicas primarias y secundarias realizadas a las cepas aisladas de humanos, utilizando como control positivo a la cepa LBF aislada de un cerdo con signos clínicos de RAP..... | <b>47</b>   |
| <b>Tabla 6.2.</b> Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de origen bovino utilizando el sistema Api20E.....  | <b>48</b>   |
| <b>Tabla 6.3.</b> Interpretación de los halos de inhibición de crecimiento de las cepas bacterianas de acuerdo a la Norma CLSI – NCCLS año 2005.....   | <b>49</b>   |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 6.4.</b> Interpretación de la técnica de tinción de cristal violeta.....   | <b>50</b> |
| <b>Tabla 6.5.</b> Valores de densidad óptica (595 nm) obtenidos utilizando el método de Bradford para la curva patrón de proteínas empleando albúmina sérica bovina (ASB) como proteína de referencia.....  | <b>52</b> |
| <b>Tabla 6.6.</b> Contenido proteico de los extractos obtenidos de las diferentes cepas de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas en este trabajo, cuantificación realizada por el método de Bradford.....   | <b>53</b> |
| <b>Tabla 6.7.</b> Marcadores de peso molecular utilizados como referencia para la electroforesis de los extractos de las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> , indicando los valores de tamaño molecular, logarítmicos y de su coeficiente de movilidad relativa..... | <b>54</b> |
| <b>Tabla 6.8.</b> Valores de los pesos moleculares (Kilodaltones, Kd) de cada una de las bandas presentes en los extractos proteicos de las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> , obtenidas después del corrimiento electroforético.....                              | <b>56</b> |
| <b>Tabla 6.9.</b> Producción y tipos de hemólisis presentadas por las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas, empleando agar sangre con glóbulos rojos de diferentes especies.....  | <b>58</b> |
| <b>Tabla 6.10.</b> Título de corte que presentó cada una de las cepas trabajadas en la prueba de aglutinación.....  | <b>60</b> |

---

**Tabla 6.11.** Hemaglutinación de las suspensiones bacterianas inactivadas (sin inactivar), empleando glóbulos rojos de diferentes especies.....**62**

**Tabla 6.12.** Efecto dermonecrótico de los extractos proteicos de las cepas de *B. bronchiseptica* al ser administrados intradérmicamente en piel de cuyes.....**63**

---



---

#### IV. LISTA DE FIGURAS.

|   | <i>Pág.</i> |
|---|-------------|
| <b>Figura 5.1.</b> Estructura del gel y la forma de colocación de las muestras para llevar a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....   | 39          |
| <b>Figura 6.1.</b> Ejemplos de algunas colonias de <i>B. bronchiseptica</i> , que no incorporaron el colorante de cristal violeta, indicando Fase I (A), colonias que incorporaron débilmente el colorante, Fase I dudosa (B) y aquellas que incorporaron completamente el cristal violeta, Fase no I (C).....  | 50          |
| <b>Figura 6.2.</b> Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y empleando como proteína de referencia la ASB.....   | 52          |
| <b>Figura 6.3.</b> Curva Patrón del logaritmo de los Pesos Moleculares contra su coeficiente de movilidad relativa.....   | 54          |
| <b>Figura 6.4.</b> Patrones electroforéticos de los geles de poliacrilamida de las diferentes cepas de <i>B. bronchiseptica</i> en el presente estudio. Carril: 1) LBF, 2) VIC, 3) Esp <sup>II</sup> , 4) GBv03, 5) GBv04, 6) GBv05, 7) GBv07, 8) GBv08 y MP es el marcador de pesos moleculares.....   | 55          |
| <b>Figura 6.5.</b> Ejemplos de los diferentes tipos de hemólisis producidos por las cepas de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas. Panel: A) hemólisis tipo beta o completa desarrollada por la cepa GBv07 en agar sangre de perro, B) hemólisis tipo alfa o parcial desarrollada por la cepa GBv04 en agar sangre de gato, C) solo se aprecia el crecimiento bacteriana pero sin producción de hemólisis..... | 58          |



---

## I. RESUMEN.

*Bordetella bronchiseptica* es una bacteria con forma de cocobacilo, es Gram negativa, no produce esporas y presenta motilidad por flagelos peritricos. Este patógeno está asociado a enfermedades respiratorias de diversos mamíferos como: el cerdo, el perro, el gato, el caballo, el pavo, la rata, el ratón, el zorro, las aves, el cobayo, el conejo, el koala, entre otros; infectando el tracto respiratorio ya sea por vía endógena o exógena, la manera principal de entrada de este microorganismo es la inhalación y se puede propagar por contacto directo e indirecto, así como por fómites.

Se han reportado infecciones relacionadas con *B. bronchiseptica* en humanos, en los últimos años se han presentado casos de aislamiento de esta bacteria en pacientes que tienen como característica en común ser individuos inmunosuprimidos, existiendo también algunos estudios en donde se ha aislado a *B. bronchiseptica* de individuos clínicamente sanos. Sin embargo, no existen informes de la existencia de *B. bronchiseptica* en bovinos; por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar, purificar e identificar a *B. bronchiseptica* por medio de exudados nasofaríngeos y faríngeos en bovinos y humanos respectivamente.

La identificación de las cepas bacterianas se llevo a cabo empleando pruebas bioquímicas primarias y secundarias, posteriormente a cada una de las cepas se les realizó la prueba de aglutinación en microplaca utilizando sueros hiperinmunes específicos para *B. bronchiseptica* y *B. pertusis*. Una vez identificadas las cepas se procedió a realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* (DNT en piel de cuye, hemólisis y hemaglutinación) para determinar algunos de los factores de virulencia presentados por esta bacteria. Con respecto a las pruebas de hemólisis y de hemaglutinación se emplearon glóbulos rojos de: bovino, ovino, humano, gato y perro. Así mismo, se llevo a cabo la determinación de la Fase I (virulenta), empleando la técnica de tinción de cristal violeta. Finalmente se monto la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando extractos proteicos, los cuales fueron cuantificados mediante el ensayo de Bradford, para comparar los patrones electroforéticos que presentó cada una de las cepas aisladas.

Con respecto a los resultados se obtuvieron seis cepas bacterianas, una de ellas fue aislada de un humano (VIC), cabe mencionar que también se trabajó con una cepa aislada de humano (ESP<sup>II</sup>), la cual fue donada por el laboratorio donde se realizó el presente trabajo. Cinco de las seis cepas aisladas fueron de bovino (GBv03, GBv04, GBv05, GBv07, GBv08); las cuales resultaron ser negativas a la prueba de urea, las cepas restantes coincidieron bioquímicamente en su totalidad con lo reportado en la literatura. Así mismo, los resultados de la identificación serológica indicaron que el 100% de las cepas aisladas presentaron un título de aglutinación considerablemente mayor con el suero hiperinmune específico para *B. bronchiseptica* que para *B. pertusis*.

De acuerdo a la tinción de cristal violeta cinco cepas se encontraban en Fase I (LBF, VIC, ESP<sup>II</sup>, GBv03, GBv08), mientras que la cepa GBv04 mostró ser dudosa a esta Fase. También se comprobó la producción de la proteína dermonecrótica, para lo cual se prepararon extractos proteicos de las cepas y se inocularon en el lomo de los cuyes, los resultados mostraron que solo las cepas GBV03, GBv04 y GBv08 provocaron una lesión en la piel del cuye indicando la presencia de la DNT.

La actividad hemolítica de las cepas fue variable dependiendo del agar sangre, solamente la cepa GBv08 fue capaz de producir hemólisis tipo beta de todos los eritrocitos de las diferentes especies analizadas. De la misma manera en la prueba de hemaglutinación, las cepas aisladas presentaron una actividad hemaglutinante variable, pero mostraron una mayor actividad con los eritrocitos de borrego, bovino y perro.

La comparación de los patrones electroforéticos muestra que las cepas no presentan una gran semejanza entre sí, y que solo existió una similitud en los patrones de proteínas entre las cepas GBv03, GBv04 y GBv08 aisladas de bovinos.

Se concluye que las seis cepas aisladas de humano y bovino corresponden a *Bordetella bronchiseptica*; donde 3 cepas bovinas presentaron similitud en el grado de virulencia, mientras que las cepas restantes mostraron variabilidad entre los factores de virulencia. Con las cinco cepas aisladas de bovinos se obtuvo un resultado negativo a la prueba de la ureasa, para confirmar la identificación bioquímica se sugiere un análisis filogenético de cada una de las cepas empleando la técnica 16S RNA.

## 1. INTRODUCCION.

### 1.1. Antecedentes.

*B. bronchiseptica* fue originalmente aislada del tracto respiratorio de perros e identificada como *Bacillus bronchicanis* por Ferry en 1910, desde entonces ha sido reconocida como un patógeno del tracto respiratorio en mamíferos. Durante 1912 y 1913 microorganismos con características idénticas a las mencionadas anteriormente descritas por Ferry fueron aislados de cueros, simios y humanos; por lo que el microorganismo fue renombrado *Bacterium bronchisepticus*, más tarde, 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* (Wilson y Miles, 1946).

Posteriormente fue ubicada dentro del género *Alcaligenes*, *Brucella* y *Haemophilus* debido a las características morfológicas y bioquímicas las cuales son muy similares a las presentadas por estos géneros. Finalmente esta bacteria lleva el actual nombre debido a que Moreno López describió el género *Bordetella* (en honor a Jules Bordet) y la especie *Bordetella bronchiseptica*. En 1940 Thorp y Tanner aislaron por primera vez a *B. bronchiseptica* de pulmones neumónicos de cerdos y aunque este microorganismo es patógeno ocasional en las bronconeumonías primarias de cerdos jóvenes puede también actuar como un patógeno del tracto respiratorio inferior en animales viejos (Pitman, 1974).

En 1956 Switzer logró aislar a *B. bronchiseptica* de la cavidad nasal, demostrando la habilidad de este microorganismo para inducir atrofia en los cornetes nasales, por lo que a partir de este momento se le consideró como patógeno primario de la rinitis atrófica porcina (RAP).

## **1.2. Género *Bordetella*.**

### **1.2.1. Taxonomía.**

La clasificación taxonómica de las bacterias del género *Bordetella* es la siguiente:

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Alcaligenaceae

Género: *Bordetella*

Especies: *bronchiseptica*, *pertusis*, *parapertusis*, *avium*, *hinzii*, *holmesii*, *petrii*, *trematum*

### **1.2.2. Características Generales del Género *Bordetella*.**

Los microorganismos pertenecientes al género *Bordetella* están asociados con enfermedades respiratorias contagiosas; taxonómicamente están clasificados en la familia *Alcaligenacea*, dentro de la  $\beta$ -*proteobacteria* y más relacionados a los géneros *Achromobacter* y *Alcaligenes* (Songer y Post, 2005). Son bacilos pleomórficos, Gram negativos, entre cocoides y ovalados, y en algunas ocasiones con formas filamentosas. Son aerobios estrictos, poseen una oxidasa, una catalasa y no desarrollan actividad fermentativa (Valencia, 2004).

Se han identificado hasta el momento ocho especies de *Bordetella* con las especies recientemente nombradas *Bordetella hinzii*, *Bordetella holmesii*, *Bordetella trematum* y *Bordetella petrii*. Ninguna de estas especies ha sido asociada con enfermedades en animales, sin embargo, *Bordetella hinzii* es comúnmente aislada del tracto respiratorio de aves de corral; *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum* están asociadas

con infecciones oportunistas de varios sitios del cuerpo en humanos; *B. holmesii* ha sido aislada de infecciones respiratorias semejantes a *B. pertusis* (Gyles, *et al.* 1994).

Los miembros del género *Bordetella* metabolizan como fuente principal de carbono y energía a los aminoácidos y ácidos carboxílicos (pero no a los carbohidratos). Las reacciones alcalinas producidas por el metabolismo son con frecuencia aplicadas en medios diferenciales y pruebas bioquímicas para la posterior caracterización de las cepas de *Bordetella* aisladas (Gyles *et al.* 1994).

Dentro del género *Bordetella* existe un grupo homogéneo, en el que se distinguen tres especies (*B. pertusis*, *B. parapertusis* y *B. bronchiseptica*). A estas especies se les han realizado ensayos genéticos de hibridación los cuales han demostrado que existen muchas coincidencias en la secuencia de su genoma entre estas especies, por lo que se han utilizado algunas características bioquímicas que permiten su diferenciación (por ejemplo, reducción de los nitratos, ureasa, utilización de los citratos y su motilidad), ya que dentro de este grupo homogéneo *B. bronchiseptica* es la única especie móvil.

Parkhill y colaboradores, reportaron la secuencia del genoma de *B. bronchiseptica*, *B. pertusis* y *B. parapertusis* al hacer el análisis filogenético de las tres especies, demostrando que tanto *B. pertusis* como *B. parapertusis* derivan de manera independiente de un ancestro de *B. bronchiseptica* – like (Parkhill, *et al.*, 2003).

Dentro de algunas de las especies con importancia veterinaria se encuentran *B. bronchiseptica* y *B. avium*, la primera especie mencionada ha sido implicada en la rinitis atrófica del cerdo, en la traqueobronquitis infecciosa canina, y en la bronconeumonía de algunas especies animales. Por otro lado *B. avium* está implicada en la producción de la rinotraqueítis de los pavos.

En la **Tabla 1.1** se muestran las principales características biológicas, genéticas y bioquímicas del género *Bordetella*.

Tabla 1.1. Propiedades biológicas y bioquímicas de las especies de *Bordetella* (Songer, y Post, 2005).

| Característica                      | <i>B. pertusis</i>  | <i>B. parapertusis</i> , | <i>B. bronchiseptica</i> ,                             | <i>B. holmesii</i>                  | <i>B. hinzii</i>            | <i>B. avium</i>     | <i>B. trematum</i>           | <i>B. petrii</i> ,               |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------------|----------------------------------|
| <b>Hospedero</b>                    | Humanos             | Humanos y ovinos         | Mamíferos  | Humanos                             | Aves y Humanos              | Aves y Reptiles     | Humanos                      | Medio ambiente                   |
| <b>Enfermedad</b>                   | Tos ferina          | Tos ferina benigna       | Rinitis atrófica, tos de las perreras, bronco-neumonía | Septicemia, enfermedad respiratoria | Septicemia, asintomático    | Coriza de los pavos | Desconocido                  | Desconocido                      |
| <b>Sitio de aislamiento</b>         | Tracto respiratorio | Tracto respiratorio      | Tracto respiratorio, sangre                            | Tracto respiratorio, sangre         | Tracto respiratorio, sangre | ND                  | Héridas, infecciones de oído | Residuos o sedimentos biológicos |
| <b>Tamaño del genoma (kpb)</b>      | 3880-4060           | > 4 400                  | > 4 400  | ND                                  | ND                          | ND                  | ND                           | ND                               |
| <b>Crecimiento de agar sangre</b>   | Negativo            | Positivo                 | Positivo   | Positivo                            | Positivo                    | Positivo            | Positivo                     | Positivo                         |
| <b>Crecimiento de agar McConkey</b> | Negativo            | Variable                 | Positivo   | Positivo                            | Positivo                    | Positivo            | Positivo                     | Positivo                         |
| <b>Catalasa</b>                     | Positivo            | Positivo                 | Positivo   | Positivo                            | Positivo                    | Positivo            | Positivo                     | Positivo                         |
| <b>Oxidasa</b>                      | Positivo            | Negativo                 | Positivo   | Positivo                            | Positivo                    | Negativo            | Negativo                     | Positivo                         |
| <b>Asimilación de Citrato</b>       | Negativo            | Positivo                 | Positivo   | Positivo                            | Positivo                    | Positivo            | Positivo                     | ND                               |
| <b>Reducción de Nitratos</b>        | Negativo            | Negativo                 | Positivo   | Negativo                            | Negativo                    | Negativo            | Variable                     | Negativo                         |
| <b>Motilidad</b>                    | Negativo            | Negativo                 | Positivo   | Positivo                            | Positivo                    | Negativo            | Positivo                     | Negativo                         |
| <b>Ureasa</b>                       | Negativo            | Positivo                 | Positivo   | Negativo                            | Negativo                    | Negativo            | Negativo                     | Negativo                         |

ND= No documentado

### **1.3. *Bordetella bronchiseptica.***

#### **1.3.1. Morfología.**

*B. bronchiseptica* es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como un cocobacilo Gram negativo, no produce esporas y presenta motilidad por flagelos peritricos. Estudios de microscopía electrónica, han mostrado flagelos en forma de triple hélice con dirección a la izquierda, de aproximadamente 13.9 nm de diámetro. Richter y Kress (1967), fotografiaron el flagelo de esta bacteria el cual midió de 18 – 22 nm de grosor compuesto de estructuras entrelazadas de 5 a 6 filamentos. En medio sólido crece principalmente en forma cocoide, de un tamaño de 3.0 por 0.5 µm a 5.0 por 0.4 µm; algunas formas filamentosas tienen un tamaño de 0.4 por 8.0 µm (Goodnow, 1980; Labaw y Mosley, 1955; Richter y Kress, 1967).

Con respecto, a las pruebas bioquímicas principales que se realizan para la identificación de esta bacteria son:, tiene un crecimiento positivo en agar Mc Conkey, resulta ser positiva a las características bioquímicas de la Catalasa, Oxidasa, Ureasa, Motilidad y Citrato, es negativa al Indol y la producción de Ácido Sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), y no fermenta carbohidratos (López, 1993).

Investigaciones realizadas en torno a *B. bronchiseptica* sobresalen los estudios en relación a sus factores de virulencia y las diferencias que en este sentido se presentan entre cepas patógenas y no patógenas. Cuando esta bacteria fue crecida en agar, se observaron colonias lisas (Fase I, como virulentas) y rugosas, (Fase IV, como avirulentas) (Leslie y Gardner, 1931).

Otras investigaciones con resultados contradictorios revelaron que existen diversos tipos de fases intermedias (Fase II y Fase III). Se encontró que la Fase I es extremadamente inestable la cual se transforma rápidamente a la Fase II, III y IV después de varios pases en medio artificial (Nakase, 1957b). Evidencias de la inestabilidad de las fases fueron reportadas por Lacey y colaboradores, quienes observaron más colonias en Fase I cuando fue sembrada la bacteria en agar Bordet - Gengou y agar sangre que en un medio nutritivo. Esto sugiere que la composición de los

medios de crecimiento puede afectar el tipo de fase colonial. Diferencias dentro de la Fase III (Fase III- 1 y Fase III- 2) se encontraron asociadas con antígenos capsulares específicos, antígenos somáticos o ambos. La Fase IV ha sido considerada un equivalente a la Fase II con ausencia de antígenos flagelares (Nakase, 1957b; Lacey 1953).

El carácter liso - virulento y rugoso - no virulento, no siempre corresponde con los hallazgos de laboratorio para designar si son o no virulentas las cepas de *B. bronchiseptica*. Se ha demostrado que colonias lisas y rugosas presentan virulencia similar en infecciones respiratorias en cerdos y perros (Goodnow, 1980). En contraste, *B. bronchiseptica* en Fase I ha mostrado afinidad por el epitelio respiratorio del cerdo tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que esto no se observa con cepas en Fase III (Yokomizo y Shimizu, 1979).

Diversos estudios relacionados con la variación fenotípica y la capacidad de infectar animales en el laboratorio han indicado que las cepas de *B. bronchiseptica* con colonias en Fase I tienen una alta capacidad para infectar y desarrollar lesiones en animales experimentales, aglutinar eritrocitos de diversas especies animales y unirse al epitelio ciliado del tracto respiratorio canino *in vitro* produciendo ciliostasis (Magyar, *et al.*, 1985; Bemis y Wilson, 1985).

### **1.3.2. Características de cultivo.**

*B. bronchiseptica* no es muy exigente en los cultivos, pues crece en los medios usuales. Las colonias son apenas visibles a las 24 h de incubación; a las 48 h son relativamente pequeñas, redondeadas, lisas y brillantes. La forma lisa (S, del inglés *smooth*) es inestable en los medios de cultivo artificiales, sobre todo después de la resiembra y se disocia fácilmente a la forma rugosa (R, del inglés *rough*); está disociación es atribuible a la pérdida de los polisacáridos de la pared celular (Nicolet, 1986).



*B. bronchiseptica* es una bacteria aerobia estricta que obtiene su energía de la oxidación de los aminoácidos y puede presentar una actividad hemolítica variable en agar sangre (Biberstein y Chung., 1994).

Esta bacteria puede ser aislada del tracto respiratorio de diversas especies animales por medio de exudado nasal o traqueal. Los aislamientos primarios son inoculados usualmente sobre medios selectivos conteniendo penicilina, estreptomicina y nistatina (Füzi, 1973; Farrigton y Switzer, 1977). Generalmente las placas son incubadas a 35-37 °C por 40 a 72 h y las colonias resultantes presentan un color cremoso brillante y borde liso. A las colonias presuntivas se les realiza una tinción de Gram, y las reacciones bioquímicas para el género y especie específicas.

*B. bronchiseptica* puede crecer en agar o medio líquido conteniendo un mínimo de proteína, para un crecimiento máximo en medio líquido necesita aireación, temperatura de 35 a 37 °C y controlar el pH con un amortiguador de sales. Cuando crece en un medio de agar sangre las colonias son generalmente hemolíticas y brillantes, de un diámetro de 1.0 a 2.0 mm (Goodnow, 1980).

### **1.3.3. Hábitat.**

*B. bronchiseptica* se encuentra en animales silvestres y domésticos, en roedores silvestres y de laboratorio, en cerdos, en conejos y, a veces, en caballos, en otros animales herbívoros y en primates. Aunque probablemente no forme parte de su flora normal se encuentra en la nasofaringe de los animales sanos (Biberstein y Chung, 1994).

### **1.3.4. Transmisión.**

Las infecciones pueden ser endógenas o exógenas, la inhalación es la manera principal de entrada de este microorganismo y se puede propagar por contacto directo e indirecto, así como por fómites (Carter, 1994).

La principal forma de la enfermedad es por contacto directo a través de aerosoles infectados, los cerdos expuestos pueden desarrollar rinitis catarral, faringitis y otras alteraciones antes de manifestar la RAP (Harris y Switzer, 1968; Martineau, *et al.*, 1982).

*B. bronchiseptica* se adhiere firmemente al epitelio ciliado del tracto respiratorio y este es seguido por una rápida proliferación del microorganismo, parálisis ciliar y una respuesta inflamatoria. Las cepas virulentas expresan pili y una enzima extracelular, adenilato ciclasa. El pili le ayuda a la adherencia y la adenilato ciclasa tiene actividad antifagocítica, la bacteria se protege de la destrucción intracelular y causa inmovilidad de los cilios respiratorios (Quinn y Carter, 1994).

### **1.3.5. Epidemiología.**

El espectro de hospederos para *B. bronchiseptica* es relativamente amplio ya que se incluyen animales tanto domésticos como silvestres, y esto es en todo el mundo. Entre los animales domésticos susceptibles se encuentran, el cerdo, el perro, el gato y el caballo, etc. Dentro de las especies silvestres y animales de laboratorio están: la rata, el ratón, el zorro, el cobayo, el conejo, los potros y el koala; esta bacteria puede causar incluso epidemias en los animales de experimentación. (Gerlacha, *et al.*, 2001; Letcher, *et al.*, 1993).

El contagio suele producirse por el aire, después de una infección clínicamente manifiesta, la bacteria persiste mucho tiempo en las vías respiratorias superiores y perpetúa el estado endémico. Aunque parece que existe cierta especificidad, de huésped (por ejemplo, presencia de un serotipo determinado en el cerdo), se han comprobado también cepas de gato, rata y conejo en infecciones porcinas.

La importancia que tienen las infecciones causadas por *B. bronchiseptica*, desde el punto de vista veterinario y económico, está relacionada con la porcicultura y la crianza de animales (perreras, animales de experimentación, cría de conejos). Las grandes pérdidas efectivas se han encontrado en lugares que tienen una densidad

excesiva de animales y malas condiciones climáticas, las cuales son ideales para la propagación de *B. bronchiseptica* y la explosión de la infección (Nicolet, 1986).

### **1.3.6. Resistencia.**

*B. bronchiseptica* es capaz de resistir en un medio ambiente con más de un 60% de humedad relativa, incluso, puede sobrevivir en agua simple hasta por 1 año (Brad Fenwick, comunicación personal), mientras que *B. pertusis* y *B. parapertusis* no pueden permanecer viables por largos periodos fuera de un hospedero.

### **1.3.7. Estudios de susceptibilidad a agentes antimicrobianos.**

*B. bronchiseptica* es susceptible a varios agentes antimicrobianos *in vivo* e *in vitro* (Azechi, *et al.*, 1973; Frost, *et al.*, 1976; Switzer y Farrigton, 1975). En 1975 se reportó que *B. bronchiseptica* fue susceptible a las drogas sulfonamidas, en particular a la sulfametazina y sulfonatiazol, estas drogas fueron efectivas en el control de infecciones con *Bordetella* en hatos de cerdos (Switzer y Farrigton, 1975); sin embargo, investigaciones posteriores probaron que se desarrollaron cepas resistentes.

Wilkins y Helland establecieron que aislamientos de *B. bronchiseptica* recuperadas de perros con traqueobronquitis fueron resistentes a lincomicina, penicilina, estreptomina, nitrofurantoina y tilosina. En contraste, muchas de estas cepas bacterianas de perros fueron susceptibles a novobiocina, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina y kanamicina (Wilkins y Helland, 1973).

Las concentraciones mínimas de inhibición no son conocidas para todos los quimioterápicos. *B. bronchiseptica* es sensible a las polimixinas (hasta un límite demostrable de 0.2 µg/ml, a las tetraciclinas (CMI: 0.5µg/ml), al cloranfenicol, las sulfonamidas (CMI: 8-32 µg/ml), las asociaciones de trimetoprim-sulfamidas (cotrimoxazol), así como los antibióticos aminoglucósidos (gentamicina) y macrólidos

(eritromicina). Sin embargo, cabe mencionar que la resistencia por plásmidos se ha desarrollado notablemente a lo largo de los años (Nicolet, 1986).

Investigaciones realizadas por Welsh reportan el aislamiento de ocho cepas de *B. bronchiseptica* obtenidas de gatos con enfermedades respiratorias clínicamente significativas, estas cepas mostraron una susceptibilidad *in vitro* para algunos agentes antibacteriales como: la tetraciclina, trimetoprim-sulfadiazina y clavulanato-amoxicilina, así como una resistencia de todas las cepas a la ampicilina (Welsh, 1996).

En un estudio realizado en Estados Unidos de América se reportó el aislamiento de 11 cepas de *B. bronchiseptica* de origen canino, las cuales mostraron una susceptibilidad total a la tetraciclina y amoxicilina combinada con ácido clavulánico y sólo algunas cepas fueron sensibles a la ampicilina (45% susceptible) y enrofloxacin (57% susceptible) (Angus *et al.*, 1997).

Así mismo, Speakman y colaboradores realizaron un estudio de susceptibilidad antimicrobiana con cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de gatos, donde el 84.2% de estas cepas mostraron una resistencia al trimetoprim; de la misma manera el grupo de Mengelers reportó una resistencia al trimetoprim del 100% de sus cepas probadas. Mientras que en otro estudio Prescott y su equipo, mencionan que las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* mostraron una sensibilidad del 75% al trimetoprim (Speakman, *et al.*, 1997; Mengelers, *et al.*, 1990 y Prescott, *et al.*, 1984).

Estudios más actuales muestran que cepas de *B. bronchiseptica* fueron sensibles a la tetraciclina, doxiciclina, enrofloxacin, y amoxicilina combinada con ácido clavulánico; la mayoría de las cepas analizadas mostraron una susceptibilidad a la ampicilina (63/78; 81%), trimetoprim (57/78; 73%), y sulfadiazina (63/78; 81%). Sin embargo, este estudio también muestra que fueron detectados plásmidos de resistencia en 14 de los 24 aislamientos probados (Speakman, *et al.*, 2000).

En un reciente estudio se encontró una diferencia *in vitro* de acuerdo a la susceptibilidad de las cepas de *B. bronchiseptica* a una serie de antibióticos de fluoroquinolonas entre los cuales se encontraba: marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, y ciprofloxacina. Entre las fluoroquinolonas probadas se observó una

mayor susceptibilidad con la marbofloxacina, enrofloxacina y ciprofloxacina, las cuales pueden ser utilizadas para el tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio causado por cepas de *B. bronchiseptica* (Carbone, *et al.*, 2001).

En cuanto a las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de humanos se ha reportado una sensibilidad hacia el trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina, y a los aminoglucósidos y una resistencia hacia las cefalosporinas estos resultados están basados en pruebas de susceptibilidad realizadas a cada cepa aislada (Dworkin, *et al.*, 1999).

### **1.3.8. Factores de virulencia.**

Las bacterias del género *Bordetella* utilizan diversos factores de virulencia para interaccionar con las células del hospedero. Estos factores son codificables por genes de virulencia, que pueden ser regulados por otros genes de virulencia, pero que también pueden ser regulados por otros genes o expresarse de manera independiente. Los factores de virulencia se pueden encontrar como productos de secreción o moléculas de superficie.

Los factores que han sido identificados como moléculas de adhesión son la hemaglutinina filamentosa, la fimbria, la pertactina (Prn) y el lipopolisacárido (LPS). Entre las toxinas que producen algunas especies de *Bordetella* están la citotoxina traqueal, la hemolisina- adenilato ciclasa, la dermonecrotina (DNT) y la toxina de pertusis, esta última sólo es producida por *B. pertusis*, todos estos factores de virulencia, con excepción de la citotoxina traqueal, son regulados positivamente por el sistema BvgAS (*Bordetella virulence gene A, S*), este sistema se compone de dos proteínas una es la BvgS y la BvgA, las que son codificadas por el gen *bvgAS*. La proteína BvgS es una molécula de 135 Kd que se encuentra en la membrana citoplasmática, utiliza un mecanismo cinasa-sensor y tiene tres dominios de transferencia de fósforo mientras que BvgA es una proteína citoplasmática que posee 4 dominios de transferencia de fósforo (Mattoo, *et al.*, 2001; Gerlacha, *et al.*, 2001).

En condiciones de cultivo a 37 °C en ausencia de MgSO<sub>4</sub> o ácido nicotínico el sistema BvgAS libera el fósforo de sus dominios y *Bordetella* pasa a la fase *bvg*<sup>+</sup>, con esto, el extremo carboxilo terminal de la proteína BvgA interacciona con la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de los factores de virulencia. Durante la fase *bvg*<sup>+</sup> ocurre la represión de otros genes como los asociados a la motilidad, la producción de sideróforo, enzimas respiratorias y de metabolismo biosintético. La represión de estos genes es controlada por el sistema BvgR, el cual se encuentra río abajo del locus *bvgAS*. La fase *bvg*<sup>-</sup> se expresa cuando *Bordetella* crece bajo mecanismos de modulación como la adición de  $\geq 40$  mM MgSO<sub>4</sub>,  $\geq 10$  mM de ácido nicotínico o incubación a 25 °C, durante esta fase ocurren la expresión de otras proteínas, especialmente aquellas destinadas al metabolismo bacteriano y a la motilidad (Bock, 2001; Brickman, 2002).

Existe una fase entre la *bvgAS*<sup>+</sup> y la *bvgAS*<sup>-</sup> que es identificada como la fase intermedia. Durante esta fase se produce otro tipo de proteínas como BipA (Bvg<sup>-</sup> *intermediate phase protein A*), a la cual se le han detectado funciones de adhesinas, así mismo se le ha relacionado con la autoagregación de *Bordetella* en cultivo (Fuchslocher, 2003; Stockbauer, 2001).

El sistema de secreción tipo V se localiza en la membrana externa, este sistema se caracteriza por presentar proteínas autotransportadoras; las cuales presentan en general las siguientes características: 1) poseen un péptido líder con el cual se favorece la secreción de la molécula a través de la membrana interna, 2) la proteína madura se caracteriza por tener un pasaje de secreción, y 3) un dominio carboxilo terminal con el cual se forma un poro en la membrana externa; asimismo se considera que el paso de las moléculas es independiente del gasto de energía. La secreción de toxinas se puede dar por el sistema de secreción tipo V (Prn) o por el sistema de secreción tipo III (SST3) (Henderson, 2001).

El sistema de secreción tipo III (SST3) ha sido detectado en diversas bacterias Gram negativas, este sistema está compuesto, en la mayoría de los casos, por 12 proteínas; sin embargo, en *B. bronchiseptica* se han identificado a la fecha 9 polipéptidos y 22 genes. Su función es el equivalente al de una aguja de jeringa que permite a *Bordetella* translocar las toxinas directamente en el medio, membrana

citoplásmica o en el citosol de la célula blanco (Mattoo, *et al.*, 2000; Winstanley, *et al.*, 2000).

El lipopolisacárido (LPS) ha demostrado tener diversas funciones dependiendo de la especie de *Bordetella* que se trate. En *B. pertusis* es fundamental para la colonización de la mucosa nasal, en *B. parapertusis* es necesario para la colonización de los pulmones, mientras que en *B. bronchiseptica* participa en la permanencia intracelular en macrófagos alveolares (Harvill, 2000).

La DNT posee dos dominios, el dominio A que corresponde a la porción enzimática y el dominio B que identifica al receptor con el cual se une a las células blanco. La DNT es la responsable de la destrucción de los cornetes nasales en los cerdos que padecen rinitis atrófica. La atrofia de los cornetes se da cuando la DNT produce una deficiencia en la diferenciación de los osteoblastos. Por otro lado la DNT tiene una función de la transglutaminasa y produce malformaciones por una reorganización anómala de la tensión de la actina en las células al alterar la función de una pequeña GTPasa Rho mediante la desaminación y la poliaminación en la Gln 63 de esta enzima (Matsuzawa, *et al.*, 2002). La DNT causa lesiones patológicas, estas alteraciones se caracterizan en el cerdo por una inflamación catarral en la fase inicial y, más tarde, por la atrofia de los cornetes nasales, así como por procesos degenerativos y proliferativos del tejido óseo (Nicolet, 1986).

Existe una correlación correcta entre la dermonecrotina y las lesiones nasales y pulmonares, en animales jóvenes *B. bronchiseptica* es el patógeno primario, un extracto de *B. bronchiseptica* inoculado por vía intravenosa daña áreas preferentemente de tejido linfático. Se piensa que el posible mecanismo por el cual actúa la toxina es básicamente induciendo vasoconstricción irreversible, debida quizá a la acción directa sobre músculos y no sobre el sistema nervioso central, no induce agregación plaquetaria, resultando una isquemia y posible anoxia con necrosis y hemorragia (Castillo, 1992).

La pertactina es una proteína de membrana con un peso molecular de 68, 69 y 70 Kd en *B. bronchiseptica*, *B. pertusis* y *B. parapertusis*, respectivamente. Entre sus funciones biológicas han sido descritas la de autotransportador para los sistemas de secreción tipo V así como la adhesión a células epiteliales. Posee dos regiones de aminoácidos, las cuales, pueden presentar variaciones en el número de repeticiones según sea la especie de *Bordetella*. La pertactina de las tres especies bacterianas mencionadas anteriormente posee un dominio RGD que participa en la adhesión a células epiteliales, posee también la región II la cual tiene propiedades antigénicas para inducir inmunidad protectora; inmediatamente después del dominio RGD se encuentra la región I (Register, 2001; Bassinet, *et al* 2000).

Se ha reportado que la fimbria es altamente inmunogénica e induce la síntesis de anticuerpos. Se han detectado cuatro serotipos de fimbria en el género *Bordetella* y son Fim2, Fim3, FimX y FimA; estos se producen durante la fase de variación bvgAS (Mattoo, *et al.*, 2000).

Otro factor de virulencia para el género *Bordetella* es la enzima adenilato ciclasa la cual cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (Novotny, *et al.*, 1985). La adenilato ciclasa puede jugar un papel tal como evasión de la respuesta inmune del hospedador.

La hemolisina-adenil ciclasa o adenilato ciclasa es, junto con la toxina de *pertusis*, la toxina más potente del género *Bordetella*. Es esencial para el establecimiento y permanencia de *B. bronchiseptica* y *B. pertusis* en los pulmones. También puede intoxicar a una gran variedad de células de diversos orígenes; sin embargo, la unión a macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se da con la asociación de la toxina a las integrinas CD11b/CD18; esta unión toxina-receptor es dependiente de calcio. La toxina unida al receptor se transloca al citosol y activa a la calmodulina, lo que cataliza la conversión de ATP a AMPC. La acumulación intracelular de AMPC inhibe la quimiotaxis, fagocitosis y la producción de superóxidos. Se ha reportado que la adenilato-ciclasa induce apoptosis de macrófagos (El-Azami-El-Idrissi, *et al.*, 2003).



Con respecto a los factores de adherencia, estudios *in vitro* revelaron que sólo cepas virulentas de esta bacteria se adhieren a células epiteliales de la mucosa nasal del cerdo, mientras que cepas no virulentas lo hacían en una forma débil, es decir que la adherencia de la bacteria no era preferentemente a las células del epitelio ciliado de la cavidad nasal. Se ha observado que cepas patógenas de este microorganismo aglutinan eritrocitos de bovino mientras que cepas no patógenas no aglutina, corroborando así la existencia de factores de adherencia (Yokomizo y Shimizu, 1979).

Se han descrito otros factores de virulencia; por ejemplo, un componente de la pared celular (*histamine-sensitizing factor*), que favorece la acción de la histamina sobre el tracto respiratorio (Nicolet, 1986).

Los estudios e investigaciones que se han realizado en los últimos años y los avances desarrollados en biología molecular le han dado un giro importante a la investigación, ya que muchos estudios de virulencia se han determinado en base a la existencia de algunos genes (McMillan, *et al.*, 1999). El análisis de electroforesis en campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), es el método más sensible y reproducible para la comparación genética en el género *Bordetella*; el cual consiste en obtener patrones específicos del total del DNA bacteriano previamente fraccionado por enzimas de restricción (Mooi, *et al.*, 2000).

De acuerdo a Patel (2001; citado en Janda y Abbott, 2007) el uso de las secuencias de los genes 16S RNA para estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana es adecuado por varias razones: a) el gen está presente en todas las bacterias; b) la función del gen 16S RNA no cambia en el tiempo, y los cambios en su secuencia pueden asociarse a cambios evolutivos (cronómetro molecular); c) el gen 16S rRNA es lo suficientemente grande (1,500 bp) para propósitos bioinformáticos.

En general la técnica de 16S RNA consiste en: 1) las células procedentes de un cultivo axénico se rompen; 2) se amplifica el gen mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); 3) el gen es secuenciado; 4) las secuencias obtenidas se alinean por computadora. Un programa informático realiza comparaciones por pares y genera un árbol que refleja las diferencias en la secuencia del RNA ribosómico del

organismo analizado, así como la identificación del género y especie con 99% de confiabilidad (Madigan *et al.*, 2003).

### **1.3.9. Mecanismos de patogenicidad.**

*B. bronchiseptica* ataca firmemente el epitelio ciliado del tracto respiratorio y este es seguido por una rápida proliferación del microorganismo, parálisis ciliar y una respuesta inflamatoria. Las cepas virulentas producen pili y una enzima extracelular, adenilato ciclasa. El pili le ayuda a la adherencia y la adenilato ciclasa tiene actividad antifagocítica, la bacteria se protege de la destrucción intracelular y causa inmovilidad de los cilios respiratorios (Quinn, y Carter, 1994).

En los cerdos, *B. bronchiseptica* provoca irritación nasal, sensibilizando los cornetes a la actividad dermonecrotóxica de *Pasteurella multocida* la cual se está mostrando como el agente primario de la rinitis atrófica (Biberstein y Chung., 1994).

Se ha demostrado la participación de *B. bronchiseptica* como patógeno primario en las infecciones respiratorias en animales de laboratorio. Las lesiones dermonecrotóxicas, así como las reacciones alérgicas han sido observadas en animales de laboratorio después de inyectar la toxina, lo que ha permitido inferir que la toxina está involucrada en los mecanismos patogénicos de la atrofia, inducida por *B. bronchiseptica* en los tejidos de los cornetes nasales de los cerdos (Skelly, *et al.*, 1980).

### **1.3.10. Enfermedades.**

*B. bronchiseptica* ha sido asociada a enfermedades respiratorias de diversos mamíferos. En el cerdo esta bacteria es considerada como el agente primario de la rinitis atrófica porcina (RAP). Esta enfermedad respiratoria es común de cerdos jóvenes puede provocar la destrucción de los cornetes nasales y tejidos asociados, muchas veces tiene una alta incidencia en neumonía y representa pérdidas significantes para la industria

porcina, debido al costo, al peso reducido que presentan los animales afectados y al tratamiento de los animales enfermos, y a la profilaxis (Ackermann, *et al.*, 1997).

Existen dos microorganismos involucrados en la RAP, esta se desarrolla primero por el establecimiento y colonización de *B. bronchiseptica* sobre el tracto respiratorio del cerdo lo que aumenta la susceptibilidad del hospedador para una infección secundaria con *Pasteurella multocida*, productora de dermonecrotina, esta infección mixta reproduce el cuadro clínico que se caracteriza por rinitis y atrofia de los cornetes nasales, lo que generalmente provoca deformaciones de las estructuras óseas de la trompa, y ocasionalmente retraso en el crecimiento (Chong, 1994; Rice, *et al.*, 2007; McClenahan, *et al.*, 2008).

En el cerdo también se produce la bronconeumonía de los lechones; la cual afecta a los lóbulos apical y cardiaco, a veces también al diafragmático, con alta mortalidad. La bronconeumonía se presenta esporádicamente; los animales de más edad enferman raras veces (Nicolet, 1986).

Además *B. bronchiseptica* es considerada el agente primario de la traqueobronquitis canina, enfermedad altamente contagiosa la cual afecta a perros de cualquier edad y está caracterizada por acumulación de moco excesivo, vómito, pérdida de peso y lesiones pulmonares. Aunque también ha sido considerada como un agente zoonótico (Kadlec, Kehrenberg y Schwarz, 2005).

Dentro de las enfermedades causadas por *B. bronchiseptica* se encuentran en primer lugar la traqueobronquitis y las neumonías, es posible también que las infecciones causadas por esta bacteria coincidan a menudo con otras de origen vírico, aunque experimentalmente se ha visto que el microorganismo de referencia puede producirlas también por sí solo (Speakman, *et al.*, 2000).

Esta bacteria ha sido aislada de animales de laboratorio como son conejos, cuyes, ratas, monos y otros mamíferos usados en investigación, con problemas respiratorios. También existen reportes en los cuales se menciona el aislamiento de *B.*

*bronchiseptica* en humanos sanos o inmunosuprimidos (Lorenzo-Pajuelo, 2002; Huebner, *et al.*, 2006; Rougier, *et al.*, 2006).

### **1.3.11. Importancia médica.**

*B. bronchiseptica* también es capaz de colonizar el tracto respiratorio de humanos; el primer caso fue reportado por McGowan en 1911. Desde ese entonces hasta 1990 el 52% en 25 personas a las que se les aisló la bacteria tuvieron contacto con animales y el 36% no cursaba con alguna enfermedad. Sin embargo, de esos 25 casos solo 10 presentaban suficientes datos microbiológicos para sustentar la participación de *B. bronchiseptica* (Woolfrey y Moody, 1991).

En 1926 Brown reportó un caso de infección por *Bacillus bronchisepticus* en un niño con síntomas de *pertussis*, se pensó que el niño estuvo en contacto con el microorganismo por un animal rabioso sufriendo de catarro nasal contagioso.

En 1975 se reportó que *B. bronchiseptica* fue responsable de una meningitis purulenta post traumática en un niño de nueve años de edad quien fue pateado en la cara por un caballo (Chang, *et al.*, 1975).

En los últimos años se han presentado casos de aislamiento de *B. bronchiseptica* en pacientes que tienen como característica en común ser individuos inmunosuprimidos. La serie más amplia de casos con infección respiratoria por *B. bronchiseptica* en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aparece publicada por Dworkin, con 9 casos observados durante un período de 8 años (Dworkin, *et al.*, 1999).

En marzo de 2003 se diagnosticó neumonía por *B. bronchiseptica* en un varón con infección por VIH y linfoma de Hodgkin. A partir de este caso índice se hizo una revisión en el laboratorio de microbiología y se encontraron 3 casos más, todos en pacientes con infección por VIH (Valencia, 2004).

### **1.3.12. Tratamiento.**

Debido a que la RAP no se puede tratar, se utilizan medidas profilácticas que incluyen el mantenimiento de una piara de cerdas adultas con un bajo porcentaje de animales portadores, retirando a las cerdas portadoras. Esto en base a los resultados obtenidos después de haberles realizado exudados nasales a cada animal. La desinfección y limpieza cuidadosa de los corrales, así como de los locales de cría después de cada uso, otra medida utilizada es la colocación de antibióticos como las sulfonamidas en el agua de bebida. La traqueobronquitis canina responde poco a los antibióticos inyectados; la vacunación, la fumigación de las perreras, la ventilación adecuada y el aislamiento de los perros afectados constituyen medidas profilácticas de utilidad. (Biberstein y Chung., 1994).

### **1.3.13. Prevención.**

Los primeros en demostrar un efecto protector a través de la vacunación fueron Harris y Switzer quienes inmunizaron por vía intranasal con una cepa virulenta de *B. bronchiseptica* sensible a la sulfonamida; después de eliminar la cepa vacunal administrando sulfonamida en el alimento los animales quedaron inmunes a subsecuentes reinfecciones con el microorganismo; en un estudio posterior, estos investigadores inmunizaron cerdos con *B. bronchiseptica* desintegrada por sonicación y desafiaron por vía intranasal notando una eliminación acelerada de la infección de los animales vacunados (Harris y Switzer, 1972).

Estudios recientes muestran que las vacunas subcelulares (ACV por sus siglas en Inglés) se aceptaron en los Estados Unidos en 1991 y se probaron en 1996 en tres dosis para minimizar reacciones adversas (dolor e inflamación en el sitio de la inyección, fiebre y a veces problemas neurológicos) asociados con la vacuna *pertusis* preparada con células completas (WCV o DTP). Las vacunas (ACV) contienen a la toxina *pertusis* y en menor proporción otros componentes bacterianos, así como filamentos de hemaglutina, pertactina, o fimbrias. Se ha demostrado que la pertactina contribuye a la

adherencia de la bacteria a las células del hospedero (Hewlett, 1997). Cherry y colaboradores mostraron que niveles moderados de anticuerpos antipertactina son protectivos, con alguna sinergia protectora entre los niveles de anticuerpo de la pertactina y toxina *pertusis* (Cherry, *et al.*, 1998). Sin embargo a pesar de existen vacunas como WCV y ACV la incidencia de la enfermedad ha ido en aumento, al menos para Estados Unidos; entre las explicaciones que se sugieren existe la que involucra una inmunidad débil o cambios en la virulencia de las cepas. Otras investigaciones sugieren que se debe al polimorfismo en los genes de la pertactina y toxina *pertusis* de las diferentes cepas (Cassiday, *et al.*, 2000; Mooi, *et al.*, 1998 y van Loo, *et al.*, 1999).

#### **1.3.14. Inmunidad.**

En la mucosa del sistema respiratorio, de la nariz, de los cornetes nasales y de la tráquea existe el aparato mucociliar, el cual secreta moco que atrapa y envuelve a las partículas que llegan a ingresar durante el proceso de respiración, así mismo los movimientos ascendentes de los cilios facilitan la expulsión de cualquier partícula atrapada en el moco (Charles y Ruslan., 2002).

El moco es tan solo uno de los productos que se secretan en las mucosas, también se producen una gran variedad de sustancias antimicrobianas, como el complemento, que se encuentra en una concentración de hasta un 10% mayor que en el suero (Rambow, *et al.*, 1998).

La lizosima es otra molécula liberada en la secreción de la mucosa, se puede encontrar en todos los fluidos del organismo excepto en la orina, líquido cefalorraquídeo y sudor. También se encuentra en los lisosomas de las células fagocíticas; su efecto es el de una muramidasa que hidroliza los enlaces glucosídicos del ácido N- acetil-murámico de la pared celular de las bacterias Gram positivas. Otras sustancias con propiedades microbicidas incluyen a la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretoria, estas sustancias son producidas y liberadas en las células epiteliales de las mucosas, así como en los gránulos de los polimorfonucleares (Risso, 2000).

Hay otras sustancias que son secretadas y que de manera directa o indirecta afectan el desarrollo de agentes patógenos como es el caso de la lactoferrina, que es una proteína que atrapa el hierro que es esencial para las bacterias. Además de encontrarla en los leucocitos se le puede detectar en secreciones mucosas así como en la leche. Otro ejemplo es la beta-lisina que se encuentra en las secreciones mucosas de la nasofaringe y tiene actividad bactericida. Uno de los mecanismos de inmunidad innata más efectivos es la fagocitosis por células fagocíticas profesionales como los neutrófilos, macrófagos y precursores de células dendríticas. La eficiencia de los macrófagos para fagocitar se incrementa al ser activados por citocinas como el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y la interleucina (IL) 12 (Risso, 2000).

En el caso del aparato respiratorio, se ha demostrado que las células dendríticas pueden llegar, en un lapso de 1 hora, en grandes cantidades al epitelio de los bronquios. Esto como respuesta ante antígenos inhalados que producen inflamación y por la liberación de quimiocinas. Las células dendríticas responden al estímulo de citocinas como la IL-12, con la cual, se promueve la síntesis de IFN- $\gamma$  y con esto contribuyen a la activación de macrófagos (Gately, *et al.*, 1998), así mismo pueden secretar cantidades importantes de citocinas pro-inflamatorias y antivirales tales como la IL-6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el IFN- $\alpha$ . Con base a lo anterior, se muestra que las células dendríticas son esenciales, tanto para la inmunidad innata como para la adquirida (Banchereau, *et al.*, 2000).

La patogénesis molecular de *Bordetella* muestra la capacidad que tiene esta bacteria para evadir los mecanismos de inmunidad innata; sin embargo, el control de la población bacteriana y de la enfermedad en sí, se debe más a una respuesta inmunitaria adquirida por parte de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 (Th1) (Gerlacha, *et al.*, 2001).

La inmunidad que se genera contra un agente patógeno radica en la adecuada neutralización de sus factores de virulencia y en la eliminación del agente patógeno del organismo (Ryan, *et al.*, 2003).

En los estudios realizados sobre la inmunidad contra *Bordetella* marcan dos mecanismos efectivos de respuesta inmunitaria para controlar al agente infeccioso. Uno es la inmunidad humoral, tanto secretoria como sérica, con lo cual se contrarresta la acción patógena de toxinas y adhesinas; el otro mecanismo está dado por los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 (Th1), ya que éstas células liberan citocinas que activan a los macrófagos con lo cual se puede eliminar al agente infeccioso de las vías respiratorias (Molina, 2001).

Sin embargo, se desconocen las causas por las que algunos animales llegan a eliminar totalmente a la *Bordetella* del aparato respiratorio, mientras que otros individuos, quedan como portadores asintomáticos permanentes. Los estudios enfocados a tratar de dilucidar las variaciones en la efectividad de la inmunidad contra *Bordetella* indican que la participación de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 (Th 1) son esenciales para dar una respuesta protectora, por lo que el empleo de vacunas en la profilaxis de enfermedades asociadas a este género bacteriano puede contribuir a contrarrestar los efectos causados, tanto en animales como en humanos (Keil y Fenwick, 1999; Ryan, *et al.*, 2003).

#### **1.4. Fiebre de embarque.**

El término enfermedad respiratoria bovina (BRD) se utilizó por vez primera en América del Norte para describir un grupo de problemas respiratorios patológicos de etiología incierta. En la actualidad la definición suele limitarse a una alteración sinónima de la fiebre de embarque (Andrews, 2000). Este término es el más adecuado, pues cualquier cambio repentino, como destete, transportación o modificación climática, que mantenga en tensión a ganado, sobre todo a los becerros, los vuelve susceptibles al agente infeccioso; se cree que se trata de una mezcla de virus y bacterias.

La fiebre de embarque se transmite por contacto directo con gran facilidad de un animal a otro. De la misma manera, los corrales para venta, camiones, vagones para ganado y equipo de trabajo, como mangas y balanzas, son focos probables de infección (Neumann, 1989).



El estrés es el primer factor que contribuye a que se presente el complejo respiratorio de los bovinos. Los eventos estresantes pueden comprometer el sistema inmune del animal (inmunosupresión) haciéndolo susceptible a enfermedades causadas por virus y bacterias. Las enfermedades, que contribuyen al complejo respiratorio bovino (CRB) o fiebre de embarque son:

**Diarrea Viral Bovina (BVD):** Es una infección que se limita casi totalmente al conducto digestivo, y es más frecuente en becerros. Tiene mayor incidencia a fines de invierno o principios de primavera. Los síntomas principales son: fiebre, inapetencia, flujo nasal, diarrea misma que se acentúa a medida que avanza la enfermedad, hasta que las heces fecales contengan gran cantidad de sangre y mucosidad. Además es posible encontrar úlceras en las fosas nasales, hocico, labios y encías (Trigo, 1987; Neumann, 1989 y Andrews, 2000).

**Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR):** El virus herpes de la rinotraqueítis infecciosa bovina produce una infección aguda, contagiosa y febril de los bovinos, caracterizada por una inflamación intensa del aparato respiratorio superior y tráquea, acompañada de disnea, depresión, descarga nasal serosa y pérdida de condición. Sin embargo, se sabe en la actualidad que este virus puede producir además de la infección respiratoria, cuadros: reproductivo, nervioso, digestivo y abortivo. El virus IBR es capaz de infectar las células epiteliales de la tráquea del bovino y de destruir la actividad del aparato mucociliar. Además este virus infecta a los macrófagos alveolares, reduciendo su capacidad de fagocitosis y su habilidad de participar en citotoxicidad celular de pendiente de anticuerpos. También se ha observado que el virus disminuye la capacidad quimiotáctica de los neutrófilos. Por lo tanto el virus tiene la capacidad de dañar los mecanismos de defensa del pulmón, facilitando la invasión bacteriana secundaria donde *Pasteurella spp* y *Mannheimia hemolítica* juegan el papel principal (Trigo, 1987; Neumann, 1989 y Andrews, 2000).

**Parainfluenza tipo 3 (P13):** Es una enfermedad respiratoria común, la cual suprime el sistema inmune del animal, permitiendo el desarrollo de otras enfermedades como tifus y la entrada de otros patógenos particularmente *Pasteurella spp.* y *Mannheimia hemolítica*. El Virus es difundido en secreciones nasales y oculares e infecta a animales no vacunados por vía oral y a través de secreciones nasales. Sus síntomas son fiebre,

disnea, descarga nasal serosa, disnea y tos. De no existir infecciones bacterianas secundarias, el animal vuelve a la normalidad en 2 o 3 días (Trigo, 1987; Neumann, 1989 y Andrews, 2000).

**Virus Respiratorio Sincicial Bovino (BRSV):** Este virus pertenece al grupo de los paramixovirus. Este virus produce al igual que el virus PI3, una infección discreta del aparato respiratorio de los bovinos, consistente en fiebre, rinorrea serosa, conjuntivitis y una bronquiolitis y alveolitis. Estudios experimentales indican que este virus facilita el establecimiento de *Mannheimia hemolítica* en el pulmón, tanto en bovinos como en ovinos. Este virus no ha sido aislado en México, aunque un estudio serológico preliminar indico la existencia de anticuerpos contra el **BRSV** (Trigo, 1987; Neumann, 1989 y Andrews, 2000).

***Haemophilus somnus (H. somnus):*** Esta bacteria fue descubierta por primera vez en Colorado, E.U. en 1956, como agente causal de meningoencefalitis tromboembólica en bovinos. En la actualidad se sabe que produce además infecciones de diversos aparatos y sistemas entre los que se incluyen el nervioso, respiratorio, reproductor, digestivo, músculo-esquelético y renal. Comúnmente, los primeros signos de la infección por *H. somnus* son respiratorios, aunque en ocasiones el problema principia como septicemia o como un cuadro nervioso. Los signos respiratorios incluyen: disnea, descarga nasal serosa, depresión y fiebre (Trigo, 1987; Neumann, 1989 y Andrews, 2000).

***Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida:*** Estas bacterias son altamente infecciosas, son la principal causa de neumonía y el patógeno más comúnmente encontrado en ganado que muere de enfermedades respiratorias, *M. haemolytica* y *P. multocida* se multiplican rápidamente en presencia de estrés, mal clima, o infecciones virales primarias. Los signos incluyen depresión, letargia, pérdida de apetito y fiebre. Puede ocurrir muerte repentina con algunos signos de la enfermedad, o el animal puede sobrevivir solo para convertirse en un animal problema debido al daño irreversible causado en el pulmón por esta enfermedad (Trigo, 1987; Neumann, 1989 y Andrews, 2000).

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo General.

Aislar, purificar e identificar cepas de *Bordetella bronchiseptica* obtenidas de exudados nasales y faríngeos practicados a bovinos y humanos, respectivamente; así como la caracterización de algunos factores de virulencia presentes en dichas cepas.

### 2.2 Objetivos Particulares.

- Aislar a *B. bronchiseptica* de los exudados nasales y faríngeos de bovinos y humanos, respectivamente, empleando medios de cultivo selectivos.
- Identificar a *B. bronchiseptica* mediante el uso de pruebas bioquímicas primarias y secundarias, utilizando como control positivo la cepa LBF de esta bacteria.
- Llevar a cabo la identificación serológica de las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas mediante la técnica de aglutinación con el uso de sueros hiperinmunes específicos para *B. bronchiseptica* y *B. pertusis*.
- Realizar la caracterización de las cepas identificadas como *B. bronchiseptica*, empleando pruebas biológicas *in vitro* como la hemólisis y hemaglutinación empleando glóbulos rojos de diversas especies.
- Determinar si las cepas obtenidas se encuentran en Fase I empleando la técnica de tinción de cristal violeta.
- Obtener el extracto proteico de las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas, mediante la técnica de sonicación y precipitación con acetona en frío, para su posterior análisis.

- Obtener y analizar el patrón electroforético de las proteínas que se encuentran en el extracto proteico de cada una de las cepas aisladas de *B. bronchiseptica*, mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.
  
- Determinar la presencia de la dermonecrotoxina en las cepas aisladas de *B. bronchiseptica*, empleando la prueba *in vivo* de la DNT en piel de cuye.

### **3. HIPÓTESIS.**

El aislamiento de *Bordetella bronchiseptica* a partir de exudados nasales practicados en ganado bovino, aparte de indicar la presencia de esta bacteria por primera vez en esta especie, también podría dar un giro importante en la investigación hacia la posible asociación de *Bordetella* en enfermedades respiratorias que afectan a los bovinos.

El aislamiento de *Bordetella bronchiseptica* a partir de exudados faríngeos de individuos sanos e individuos que mantengan o no una convivencia cercana con animales domésticos, alentaría a realizar estudios futuros para comprobar la posible transmisión entre estas especies, y por ende resaltar la importancia de *B. bronchiseptica* como una posible zoonosis, para enfocarla al desarrollo de nuevos tratamientos contra enfermedades respiratorias, considerando además la probabilidad de que exista una asociación con otras bacterias.

## 4. JUSTIFICACIÓN.

La infección por *B. bronchiseptica* causa una patología que por lo general es de naturaleza subaguda o crónica en diversos mamíferos como es el caso de los cerdos, en los cuales causa Rinitis Atrófica Porcina (RAP); en perros causa Tranqueobronquitis Infecciosa (tos de las perrera); en conejos, cobayos y ratas, causa bronconeumonía; en gatos y caballos, está involucrada en infecciones respiratorias (Stefanelli, *et al.*, 1997; Yasuhiko y Ming., 2007).

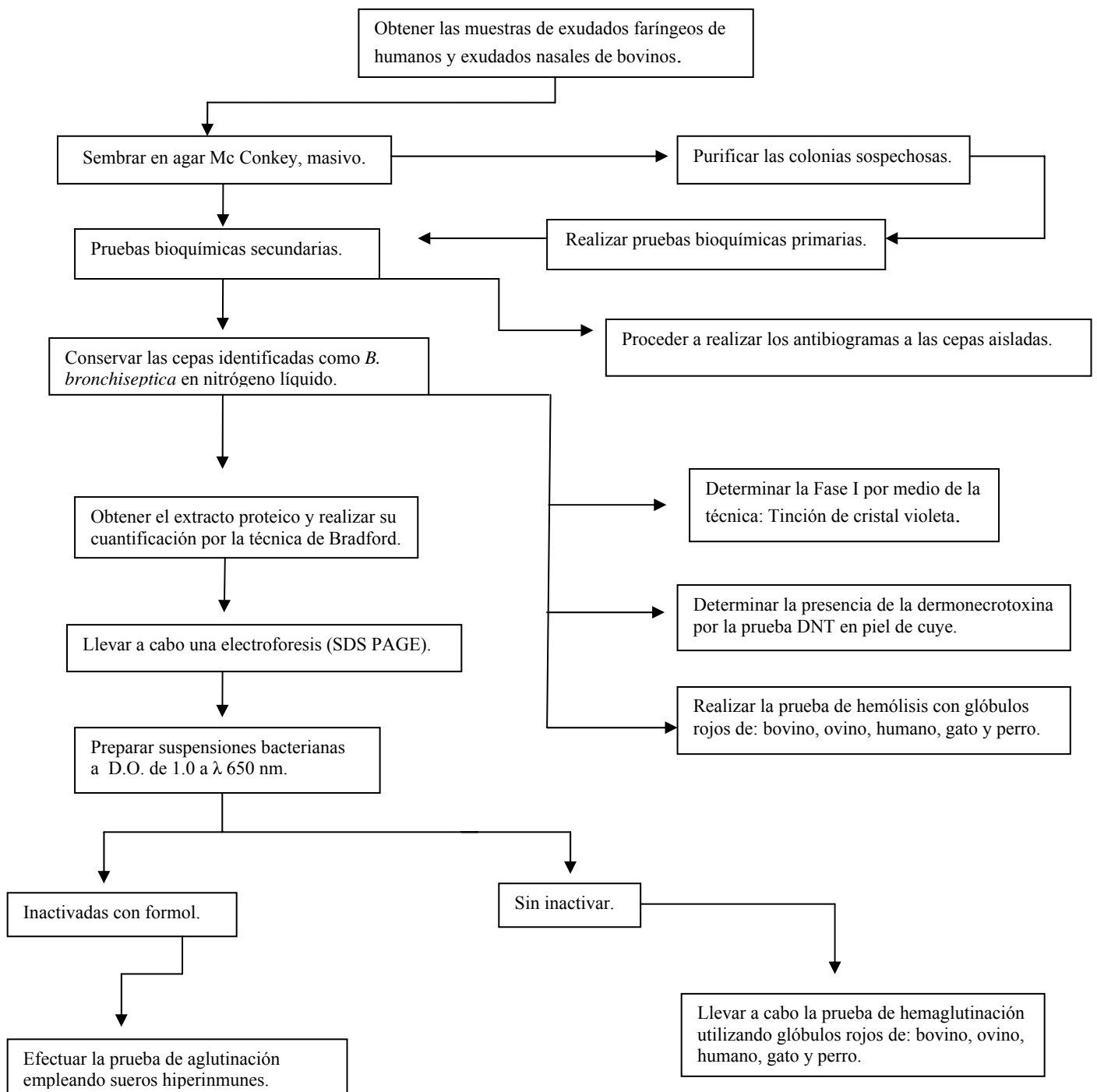
Existen reportes en los cuales *B. bronchiseptica* en individuos inmunosuprimidos llega a causar bronquitis, neumonía, peritonitis, meningitis, infecciones en heridas y septicemia terminal; en dichos reportes también se menciona la convivencia o trato de estos individuos con animales domésticos, portadores de la bacteria (Carter, *et al.*, 1994; Huebner, *et al.*, 2006). No obstante, hasta el momento existen pocos reportes en los cuales se ha demostrado que dicha bacteria está presente en el tracto respiratorio de humanos clínicamente sanos sin causar daño (Woolfrey y Moody, 1991).

En la rinitis atrófica porcina, *B. bronchiseptica* se encuentra asociada a *Pasteurella multocida*, de hecho se reporta que es necesaria la presencia de *Bordetella bronchiseptica* en el tracto respiratorio del cerdo para que el segundo microorganismo pueda ocasionar daño. De la misma manera existen reportes en los cuales se mencionan que el ganado bovino es afectado por *Mannheimia hemolítica*, ocasionando neumonía severa (González, 2007). Sin embargo, no existe ningún estudio hasta el momento en el cual se haya tratado de detectar la presencia de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio de esta especie animal; no obstante, se desconoce la importancia de su posible participación en esta enfermedad y en otros problemas respiratorios existentes en los bovinos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1. Diagrama de flujo general.

Cada una de las etapas realizadas para llevar a cabo el presente trabajo de tesis se describe con detalle en los siguientes subcapítulos, las cuales se resumen en el diagrama de flujo que se presenta a continuación:



## **5.2. Muestreo y aislamiento.**

Inicialmente las muestras obtenidas fueron recolectadas de humanos, mediante un exudado faríngeo, a cada persona se le solicitó que se presentara sin aseo bucal, sin enjuagarse la boca y sin comer ni beber nada, esto para evitar arrastrar la bacteria y obtener una mejor muestra. Con un hisopo de algodón se realizó un raspado en la parte posterior de la faringe y se sembró en agar Mac Conkey, posteriormente se incubó durante 24-48 h a 37 °C. El exudado faríngeo fue realizado a 8 personas en total clínicamente sanas, las cuales tenían en común la cercana convivencia con animales domésticos.

Así mismo se realizó el sembrado de una cepa aislada de humano denominada ESP<sup>II</sup>, la cual fue aislada anteriormente y donada por el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Posteriormente, las otras muestras trabajadas fueron tomadas de bovinos empleados en las prácticas de los alumnos de la licenciatura de medicina veterinaria y zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México; la obtención de este tipo de muestras se llevo a cabo mediante un exudado nasofaríngeo, introduciendo un hisopo previamente humedecido con agua estéril por las fosas nasales hasta la nasofaringe, sin tocar los cornetes; conservando el hisopo en caldo infusión cerebro corazón (BHI) durante su transportación y hasta su utilización en el laboratorio. En total se muestrearon 9 bovinos, de los cuales 7 eran becerros y 2 fueron bovinos adultos. Las muestras se sembraron en agar Mc Conkey, en forma masiva y se incubaron a 37 °C durante 24-48 h.



### 5.3. Pruebas bioquímicas primarias.

Una vez que el agar presentó crecimiento se seleccionó una colonia que cumpliera con las características de *B. bronchiseptica*, la cual se sembró en forma masiva en el mismo tipo de agar, y de dicho crecimiento se prosiguió a realizar las pruebas bioquímicas primarias para verificar su taxonomía.

Esta identificación se inició con la tinción de **Gram**, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera, se realizó un frotis de la bacteria, cubriéndolo con cristal violeta por 1 min, se enjuagó y se le colocó lugol por 1 min, pasado este tiempo se decantó el lugol y se le colocó alcohol-acetona de 5-15 seg, se enjuagó y por último fue colocada la safranina durante 1 min, realizando un último lavado y dejando secar, para posteriormente observar al microscopio. El cristal violeta actúa como colorante primario, que se une a la pared bacteriana luego de un tratamiento con una solución de lugol. Las bacterias Gram negativas no son capaces de retener el cristal violeta después de la coloración debido a un mayor contenido lipídico en su pared, y se contracolorean de rojo con la safranina.

Posteriormente fue realizada la prueba de **catalasa** la cual determina la capacidad de una bacteria para desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, por medio de la enzima catalasa. Para su realización se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30%, haciendo contacto con una módica cantidad de bacteria; un burbujeo indica una prueba positiva a la presencia de la enzima.

También fue realizada la prueba de **oxidasa**, esta prueba determina la presencia de la enzima citocromo oxidasa, la cual transfiere electrones al oxígeno en la cadena respiratoria y en presencia de oxígeno atmosférico oxida la tetrametil-*p*-fenilendiamina (incolora) formando azul de indofenol (azul intenso) para llevarla a cabo se preparó una solución al 1% de *p*-fenilendiamina, en un cuadro de papel Whatman con un aplicador de madera estéril se colocó una pequeña cantidad de bacteria, posteriormente se le agregó una gota de la solución de de *p*-fenilendiamina. Una coloración azul intensa indica una prueba positiva.

Por otra parte, fue realizada la prueba de **motilidad** la cual indica la capacidad de una bacteria de poder desplazarse gracias a la presencia de flagelos. Para su determinación se utilizó la técnica de gota suspendida, que consiste en lo siguiente: en un cubreobjetos limpio se colocaron 4 bolitas de plastilina de 2 mm de diámetro, una en cada esquina; en el centro se depositaron de 3–4 asadas de agua destilada estéril; después fue adicionada una ligera asada de bacterias, sobre la plastilina se le colocó un portaobjetos limpio, se volteó la preparación cuidadosamente, finalmente la laminilla fue puesta en el microscopio y observada en los objetivos 10 y 40X. Una motilidad positiva es reportada si se percibe el movimiento bacteriano en múltiples direcciones y generalmente de manera muy rápida en todo el campo microscópico.

Así mismo, también se utilizó un medio semisólido como lo es el Medium Motility Gi<sub>ANALYTAB</sub> m, la consistencia de dicho medio permite que las bacterias que poseen flagelos puedan desplazarse a través de él. Este medio fue inoculado por picadura y posteriormente incubado a 37 °C. Un crecimiento difuso en el medio resultó indicativo de una motilidad positiva.

#### **5.4. Pruebas bioquímicas secundarias.**

La identificación secundaria de bacterias está basada en la realización de diversas pruebas que vienen incluidas en las tablas de identificación de especie (Cowan, 1974).

Las cepas aisladas que coincidieron con los datos reportados en la literatura para la identificación de *B. bronchiseptica* fueron sembradas masivamente, prosiguiendo a realizarles las pruebas bioquímicas secundarias. La preparación de cada una de las pruebas utilizadas, se llevo a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante especificadas en el envase correspondiente. Entre las pruebas que se realizaron se encuentran las siguientes:

La **urea**, es una prueba que determina la capacidad de una bacteria para hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con una alcalinidad resultante. La prueba se da como positiva si presenta un color rosa mexicano en todo el medio.

También se utilizó la prueba de **Fermentación de Carbohidratos** (manosa, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, lactosa, glucosa, arabinosa). Esta prueba fue utilizada para determinar la fermentación de diversos carbohidratos en forma individual al detectar la formación de ácidos con la correspondiente disminución del pH. Un viraje del color naranja a amarillo en el medio, indica la fermentación del carbohidrato. La Urea al igual que la prueba de Fermentación de carbohidratos fueron inoculadas colocando una asada de la bacteria en el medio, posteriormente fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

La prueba de **Nitratos** determina la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre por la acción de diversas reductasas, (nitrato reductasas, nitrito reductasas, óxido nítrico reductasas, óxido nitroso reductasas). La interpretación consiste en la adición de 2 o 3 gotas de cada uno de los siguientes reactivos: ácido sulfanílico y alfa naftilamina. La presencia de nitritos en el medio y la adición de ácido sulfanílico diazotizado, que al combinarse con la alfa naftilamina (incolora) forma  $p$ -sulfobenceno azo- $\alpha$ -naftilamina, que es un colorante azo de color rojo. El desarrollo del color rojo (o café rojizo) de 1 a 2 min después de adicionar los reactivos indica la presencia de nitritos y por lo tanto una prueba positiva.

También se realizó la prueba de **Sulfhídrico Indol Motilidad (SIM)**:

**S= Sulfhídrico**, determina si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) partir de los aminoácidos azufrados o del tiosulfato de sodio, para producir una reacción coloreada visible negra en presencia de un sistema indicador de ácido sulfhídrico  $H_2S$ .

**I= Indol**, determina la capacidad de una bacteria para producir indol a partir del triptófano por acción de la enzima triptofanasa.

**M= Motilidad**, determina si una bacteria es capaz de desplazarse por la presencia de flagelos.

La lectura del indol se realizó utilizando el reactivo de Kovac o reactivo de Ehrlich, de 1 a 3 gotas sobre la superficie del medio. La prueba se toma como positivo cuando en segundos aparece sobre el medio un anillo de color rojo violeta, en la interfase del medio con la porción inferior de la base alcohólica.

Otra prueba que fue utilizada es la **Gelatinasa**: la cual determina la capacidad de la bacteria para hidrolizar a la gelatina por acción de la enzima gelatinasa. Las pruebas mencionadas anteriormente son medios semisólidos por lo cual fueron inoculadas por picadura, incubadas a 37 °C durante 24 h.

Así mismo, la identificación de las cepas aisladas de bovinos se llevó a cabo mediante la utilización del sistema API 20E BIOMERIEUX, el cual está compuesto de 20 microtubos que contienen diversos substratos deshidratados. Los microtubos fueron inoculados con una suspensión bacteriana que sirve para reconstituir los medios. Las reacciones bioquímicas que se producen durante el período de incubación de 24 h se traducen en virajes espontáneos de colores o bien son revelados mediante la adición de reactivos específicos. La interpretación de dichas reacciones se realizó con apoyo de una tabla de lectura, para ciertas pruebas fue necesario la utilización de reactivos: para Indol se adicionó una gota de reactivo de Kovac; para Voges Proskauer una gota de hidróxido de potasio (KOH) al 40% y una gota de alfa naftol; a la prueba de nitratos se le agregó una gota de ácido sulfanílico y una gota de alfa naftilamina. Cabe mencionar que las pruebas de carbohidratos y urea fueron verificadas empleando pruebas preparadas en tubo.

### **5.5. Conservación de las cepas en nitrógeno líquido.**

Una vez pura la cepa se prosiguió a crio-conservarla realizando un sembrado masivo en agar Mac Conkey, el cual se incubó a 37 °C por 24 h, posteriormente se cosechó el crecimiento con SSF estéril, la suspensión bacteriana se centrifugó a 5,000 rpm/15 min, decantando el sobrenadante y el paquete bacteriano se resuspendió en 2 mL

de una solución crioprotectora previamente preparada (1 mL de caldo BHI estéril y 1 mL de suero fetal bovino); esta suspensión se colocó en un tubo criovial estéril, etiquetándolo correctamente para colocarlo posteriormente en el congelador por 24 h, pasado éste tiempo, el criovial fue conservado en nitrógeno líquido; después de 2 días se sembraron las cepas nuevamente para confirmar su viabilidad. Este procedimiento fue realizado a cada una de las cepas aisladas.

### **5.6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.**

La identificación de una bacteria que ha sido recuperada de una muestra clínica se debe someter a una identificación y selección provisoria del tratamiento quimioterapéutico. A cuatro de los aislamientos obtenidos se les efectuó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, la cual se llevo a cabo empleando sensidiscos impregnados con ciertas concentraciones de varios antibióticos que se mencionan en la **Tabla 5.1.**

**Tabla 5.1. Lista de antibióticos y concentraciones utilizados en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.**

| <b>ANTIBIOTICO</b>     | <b>CONCENTRACIÓN</b> |
|------------------------|----------------------|
| <b>Penicilina</b>      | <i>2 U</i>           |
| <b>Vancomicina</b>     | <i>5 µg</i>          |
| <b>Kanamicina</b>      | <i>1000 µg</i>       |
| <b>Rifampicina</b>     | <i>15 µg</i>         |
| <b>Eritromicina</b>    | <i>60 µg</i>         |
| <b>Colistina</b>       | <i>10 µg</i>         |
| <b>Tetraciclina</b>    | <i>30 µg</i>         |
| <b>Nitrofurantoina</b> | <i>300 µg</i>        |
| <b>Ampicilina</b>      | <i>10 µg</i>         |
| <b>Dicloxacilina</b>   | <i>1 µg</i>          |
| <b>Amikacina</b>       | <i>30 µg</i>         |

Para realizar el antibiograma se ocuparon 3 cajas de agar BHI por cada cepa, donde cada una de ellas se sembró en forma masiva, y posteriormente se colocaron 4 sensidiscos en cada caja, las cuales se incubaron durante 24 h a 37 °C; consecutivamente se llevó a cabo la lectura, midiendo el diámetro del halo de inhibición que se formó al existir la interacción entre el antibiótico y la bacteria. La interpretación de la lectura se llevo a cabo de acuerdo a la Norma CLSI – NCCLS 2005.

### **5.7. Preparación de suspensiones bacterianas.**

Se prepararon dos diferentes suspensiones bacterianas, una suspensión activada (fresca) y otra inactivada con formaldehído, ambas suspensiones se ajustaron a una densidad óptica (D.O) de 1.0 a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 650 nm. Para lo cual se sembró cada cepa de *B. bronchiseptica* a lo largo de toda la caja de agar Mac Conkey en forma masiva y se incubaron durante 24-48 h a 37 °C. Posteriormente el crecimiento se cosechó con SSF estéril, el espectrofotómetro (Spectronic 20 D) se calibró a un valor de D.O de 0.0 a 650 nm, cada una de las cepas fue ajustada a una D.O de 1.0 a 650 nm trabajándose aproximadamente 5 mL. Para preparar la suspensión bacteriana inactivada fue necesario agregar formaldehído al 0.03% (v/v).

### **5.8. Obtención de los extractos proteicos bacterianos.**

Para obtener los extractos proteicos bacterianos de *B. bronchiseptica*, las cepas fueron sembradas en forma masiva en agar Mac Conkey, incubando por 24 h a 37 °C. Pasado el período de incubación fueron cosechadas con SSF estéril. Se realizó un lavado, centrifugando a 4,000 rpm durante 15 min y el paquete bacteriano obtenido fue resuspendido en 5 mL de SSF estéril. La suspensión bacteriana fue sometida a sonicación a 90 Hertz durante 5 ciclos de 1 minuto con intervalos de 1 min, la suspensión se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm/15 min, el sobrenadante se depositó en un tubo limpio y se le adicionaron 5 volúmenes de acetona fría y se refrigeró durante 15 min. Después de volver a centrifugar a 10,000 rpm/15 min, el precipitado se

resuspendió en 1 mL de agua MiliQ. Los extractos obtenidos fueron etiquetados correctamente y refrigerados hasta su uso.

### 5.9. Determinación de la concentración de proteínas presente en los extractos proteicos bacterianos.

Para conocer la cantidad de proteínas que se obtuvieron de las extracciones proteicas de las cepas de *B. bronchiseptica* se llevo a cabo la cuantificación de proteínas por medio de la técnica de Bradford para la cual se preparó una solución de albúmina al 0.01 % siendo utilizada en el desarrollo de la curva patrón, la cual se muestra en la **Tabla 5.2**. En el **Anexo 9.1** se muestra el procedimiento de la preparación del reactivo de Bradford, con el cual se calibró el espectrofotómetro a un valor de D.O. de cero a 595 nm (Bradford, 1976).

**Tabla 5.2. Curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (ASB) al 0.01% como proteína patrón.**

| TUBOS  | Blanco. | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6    |
|--|---------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Albumina(mL)<br>0.01%                                | ----    | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0  |
| Agua<br>Destilada(mL)                                | 1.0     | 0.9 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | ---- |
| Agitar suavemente                                    |         |     |     |     |     |     |      |
| Adicionar 5 mL del reactivo de Bradford en cada tubo |         |     |     |     |     |     |      |
| Agitar suavemente                                    |         |     |     |     |     |     |      |
| Leer en el espectrofotómetro a 595 nm.               |         |     |     |     |     |     |      |

### 5.10. Determinación de la fase I por medio de la técnica tinción de cristal violeta.

La tinción de cristal violeta fue utilizada para identificar si las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas se encontraban en fase I (Hitoshi, *et al.*, 1997). Se trabajó una

solución stock (5 g de cristal violeta en 100 mL etanol), de la cual justo antes de emplearla se preparó una dilución de 1:1000 en agua destilada.

Por otra parte, las cepas de *B. bronchiseptica* fueron sembradas en agar BHI por la técnica de dilución y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, a cada caja se le agregaron de 5 a 7 mL de la solución stock de cristal violeta diluida 1:1000 en agua destilada, se dejó reposar por 5 min después se decantó el colorante y posteriormente las cajas fueron observadas en el microscopio con el objetivo 10X, con el fin de determinar si la cepa fue capaz de incorporar el colorante.

Las cepas que se encuentran en fase I no absorben el colorante, esto debido a que su membrana es lisa e impermeable; mientras que las cepas que no se encuentran en esta fase si absorben el cristal violeta ya que su membrana sufre modificaciones en su estructura lo que las hace permeables y por lo tanto las colonias se observan coloridas.

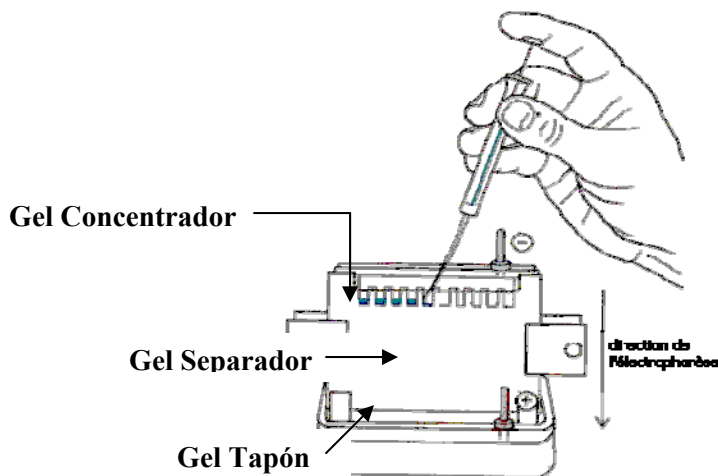
### **5.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio SDS–PAGE.**

La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevo a cabo utilizando soluciones buffer que poseen sustancias disociantes en especial detergentes no iónicos, uno de los utilizados es el dodecil sulfato de sodio (SDS del inglés Sodium Dodecyl Sulfate). Las proteínas analizadas fueron hervidas a 91 °C en presencia de un exceso de SDS y 2-mercaptoetanol (algunos reactivos presentes en la solución digestora), el SDS actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa, de la misma manera el 2-mercaptoetanol separa proteínas polipeptídicas mediante la ruptura de puentes disulfuro (Nelson, *et al.*, 2005; Lehninger, 1993).

Para realizar la electroforesis hay que preparar la cámara y los geles los cuales se organizan de la siguiente manera: gel tapón, gel separador y gel concentrador; la metodología seguida para la elaboración de cada uno de uno de los reactivos utilizados para la preparación del gel se encuentra en el **Anexo 9.2**.



Los pasos llevados a cabo para la preparación de la cámara electroforética se mencionan a continuación: primeramente se ensambló la cámara de electroforesis con los separadores correspondientes para el grosor del gel, enseguida fue preparado el gel tapón (ver **Anexo 9.2.6**), con el cual se selló la parte inferior de la cámara; posteriormente se colocó el gel separador **Anexo 9.2.7**, este gel cubrió un 75% de la cámara; vertido este gel se cubrió con alcohol isopropílico ya polimerizado se lavó 3 veces el gel con agua destilada y finalmente se agregó el gel concentrador (ver **Anexo 9.2.8**) en la cámara y se colocó el peine de 10 carriles. Para colocar las muestras en el gel fue necesario ocupar una cantidad de 50  $\mu\text{g}$  de proteínas de cada una de las muestras, las cuales fueron tratadas como se menciona posteriormente con solución digestora, para ser colocadas en los pozos del gel, en donde también se colocó un carril de albúmina como control. La estructura del gel y la forma de colocación de las muestras se observan en la **Figura 5.1**.



**Figura 5.1.** Estructura del gel y la forma de colocación de las muestras para llevar a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### **5.11.1. Preparación y corrimiento de las muestras.**

Se colocaron los microlitos ( $\mu\text{l}$ ) necesarios de cada una de las muestras de los diferentes extractos proteicos que contuvieran aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  de proteína en viales de 1.5 mL debidamente etiquetados, les fue agregado un volumen igual de solución digestora (**Anexo 9.4**) se mezclaron y se colocaron en un Baño María a ebullición durante 3 min. Posteriormente con la ayuda de una jeringa Hamilton se colocaron los volúmenes preparados de cada muestra en los carriles del gel de concentración, junto con las muestras problemas se corrieron en carriles adyacentes marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94 Kd; Albúmina sérica bovina, 67 Kd; Ovoalbúmina, 43 Kd; Anhidrasa carbónica, 30 Kd; Inhibidor de tripsina de soya, 20.1 Kd; Alfa lactoalbúmina, 14.4 Kd), con el fin de tomarlos como referencia y poder realizar el cálculo de los pesos moleculares de las proteínas desconocidas presentes en las muestras problema. La cámara fue llenada con una solución de corrida (**Anexo 9.3**) y sometida a una corriente de 60 volts por 1 h y 30 min.

### **5.11.2. Tinción de geles de poliacrilamida.**

El gel fue desensamblado cuidadosamente, se separo el gel separador, el cual fue colocado en una solución teñidora (**Anexo 9.6**) durante 24 h, pasado este tiempo el gel se sacó cuidadosamente y se colocó en agitación en la solución desteñidora I (**Anexo 9.7**) durante 1 h aproximadamente. Transcurrido el tiempo se transfirió a una solución desteñidora II (**Anexo 9.8**) hasta que el colorante en el gel se eliminó y las bandas de proteínas se distinguieron perfectamente.

### **5.11.3. Curva patrón de la movilidad relativa de proteínas.**

Se elaboró una curva patrón que mostró la relación entre el logaritmo de los pesos moleculares de los estándares (eje de las Y) y la movilidad relativa de estas proteínas en el gel de poliacrilamida (eje de las X). Por medio de una regresión lineal se determinaron los valores de los pesos moleculares de las proteínas problemas de las

diferentes muestras trabajadas, interpolando los datos de absorbancia obtenidos en la curva patrón.

#### **5.11.4. Cálculo del coeficiente de movilidad relativa de las proteínas.**

La movilidad relativa de las proteínas contenidas en las muestras consiste en el desplazamiento que tienen éstas con respecto a la distancia total que recorre la muestra, ese dato se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la banda}}{\text{Distancia total recorrida por la muestra}}$$

#### **5.12. Prueba de aglutinación de las cepas bacterianas empleando sueros hiperinmunes contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*.**

La prueba de aglutinación se realizó para llevar a cabo la caracterización serológica de las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas. La técnica se realizó utilizando la suspensión bacteriana (inactivada) de cada una de las cepas a probar, las cuales fueron preparadas con anticipación (ver punto 5.6). Así mismo, los antisueros específicos para *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* utilizados en esta prueba fueron producidos en conejos, donde el protocolo de inmunización fue realizado con anterioridad en el laboratorio de trabajo y estos sueros hiperinmunes fueron donados para la realización del presente estudio.

Para llevar a cabo la prueba se utilizaron microplacas de 96 pozos, a cada pozo se le colocaron 50 µl de SSF y posteriormente, en el primer pozo se colocaron 50 µl del suero hiperinmune, de esta dilución (1:2) se partió para realizar las demás diluciones dobles de cada uno de los sueros hiperinmunes utilizados, posteriormente se le adicionó a cada pozo 50 µl de suspensión bacteriana previamente diluida (1:5 v/v) en SSF. Cabe

mencionar que para cada cepa la prueba fue realizada por duplicado, las placas fueron incubadas en el refrigerador por 24 h para su posterior lectura; esta última se realizó a contra luz para observar la formación de una malla en el fondo de los pozos, la cual nos indica una prueba de aglutinación positiva, mientras que la presencia de un botón bacteriano en el fondo del pozo indicó una reacción negativa. Los resultados se reportaron en base al título de los sueros hiperinmunes utilizados, considerándose como tal el recíproco de la última dilución en la que se obtuvo una reacción positiva.

### **5.13. Caracterización de los factores de virulencia de las cepas de *B. bronchiseptica*.**

#### **5.13.1. Prueba de hemólisis.**

La técnica se basa en la lisis de los hematíes suspendidos en agar sangre que fue preparado al 5% utilizando glóbulos rojos de distintas especies (perro, gato, bovino, ovino y humano), las cepas de *B. bronchiseptica* fueron sembradas en placas de agar sangre de las diferentes especie, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 48 h. La lectura de esta prueba se llevo a cabo observando la presencia de una zona de hemólisis alrededor del crecimiento de la colonia bacteriana; esta lectura es más fácil de realizar siguiendo el código de la **Tabla 5.3**.

**Tabla 5.3. Código para la identificación del tipo de hemólisis producida en agar sangre.**

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b><math>\alpha</math> -Hemólisis</b> | Lisis parcial de los eritrocitos que rodean una colonia, que produce un cambio de color gris-verdoso o amarronado del medio de cultivo.  |
| <b><math>\beta</math>-Hemólisis</b>   | Lisis completa de los glóbulos rojos que rodean una colonia, que produce la eliminación total de la sangre del medio de cultivo  |
| <b><math>\gamma</math>-Hemólisis</b>  | Ausencia de hemólisis y en consecuencia ninguna alteración del color del medio que rodea a una colonia. Los microorganismos que no producen hemólisis se denominan habitualmente “no hemolíticos” en lugar de $\gamma$ -Hemolíticos.   |
| <b><math>\alpha</math>- Prime</b>     | Un pequeño halo de eritrocitos intactos inmediatamente adyacente a la colonia, con un halo de hemólisis completa que rodea el halo de eritrocitos intactos. Este tipo de hemólisis puede confundirse con la $\beta$ -Hemólisis. Se denomina también “ $\alpha$ –Hemólisis de halo amplio.” |

(Koneman, 2001).

### 5.13.2. Prueba de hemaglutinación.

La hemaglutinación se manifiesta por la capacidad de unión de sitios específicos presentes en la superficie de los microorganismos con receptores presentes en la membrana de los eritrocitos.

Para llevar a cabo la prueba se utilizaron microplacas de 96 pozos, realizando diluciones 1:2 de la sangre completa heparinizada de las diferentes especies (humano, perro, gato, ovino, bovino) con SSF, de las cuales se colocaron 50  $\mu$ L en los pozos, contra las suspensiones bacterianas activadas e inactivadas diluidas previamente 1:5 v/v. De esta suspensión se colocaron 50  $\mu$ L en cada pozo. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 h para su posterior lectura, la cual se realizó a contra luz para observar la formación de una malla en el fondo de los pozos, que nos indica una prueba de hemaglutinación positiva, mientras que la presencia de un botón de glóbulos rojos en el fondo del pozo indica una reacción negativa.

### **5.13.3. Prueba de la DNT.**

Las cepas en fase I de *B. bronchiseptica* producen la toxina dermonecrótica (DNT) que se caracteriza por producir eritema, edema, induración y necrosis cuando es inyectada en forma intradérmica en cuyes, esta toxina puede ser inactivada con formol sin perder su antigenicidad (Collings y Rutter, 1985; Roop II, *et al*, 1987).

Para determinar la capacidad de necrosis de las muestras obtenidas, se realizaron dos preparaciones de las suspensiones bacterianas de cada cepa, ajustadas a una D.O. de 1.0 a 650 nm. Una de las suspensiones utilizadas de cada cepa se trabajó de una cosecha fresca, es decir, sin inactivación y la otra fue inactivada a 60 °C por 30 min. Se inoculó 0.1 mL intradérmicamente en la región dorsal (previamente rasurada) de cuyes albinos, jóvenes, machos dividiendo el área en cuatro partes inoculando en cada área una muestra con su correspondiente muestra inactivada. Las observaciones de la reacción se realizaron a las 24 y 48 horas pos-inoculación, con el fin de evaluar la producción de eritema, edema, induración y necrosis.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Muestreo y aislamiento de cepas.

De los nueve exudados nasofaríngeos practicados a los bovino, sólo de cinco se logró el aislamiento de *B. bronchiseptica*, es decir, un 55.6 % del total de la muestras obtenidas a partir de esta especie. A estas cepas se les asignaron los códigos siguientes: GBv03, GBv04, GBv05, GBv07, GBv08.

Así mismo, de los ocho exudados faríngeos realizados a humanos sólo de uno se consiguió aislar a la bacteria, es decir, sólo un 12.5 % de las muestras colectadas en este grupo, la cepa aislada se denominó con la clave de VIC. Es importante mencionar que a la cepa ESP<sup>II</sup>, le fueron realizadas todas las pruebas para la identificación y caracterización de *Bordetella bronchiseptica*.

### 6.2. Pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación del microorganismo.

En las **Tablas 6.1 y 6.2** se muestran las diferentes cepas aisladas, a las cuales se les realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias correspondientes para su identificación. Los resultados obtenidos fueron comparados con la cepa de *B. bronchiseptica* LBF y con los datos reportados en la literatura (Cowan, 1974; Quinn, y Markey, 2003). Con todo lo mencionado anteriormente se puede decir que las cinco cepas aisladas de bovinos y las dos aisladas de humanos corresponden al género bacteriano *Bordetella* especie *bronchiseptica*. Con respecto a la morfología colonial que mostró cada cepa, podemos mencionar que el crecimiento en agar Mac Conkey a las 48 horas, para las cepas de *B. bronchiseptica*, VIC, ESP<sup>II</sup>, GBv03, GBv04, GBv05, GBv07 y GBv08 consistió en colonias pequeñas, lisas, rosadas translúcidas, puntiformes, de forma circular, de poca elevación, brillantes y de bordes regulares. Mientras que la cepa LBF mostró colonias medianas, de forma circular, con poca elevación y de bordes regulares. Cabe hacer mención de que la morfología colonial de éstas cepas aisladas

coincide con las características morfológicas que se encuentran reportadas en Cowan, 1974; Quinn, y Markey, 2003.

La cepa LBF de *B. bronchiseptica* fue usada de referencia en este proyecto, esta cepa fue aislada de un cerdo el cual estaba asociado con signos de RAP, fue proporcionada por: Wellcome Research Laboratorios Beckenham, Inglaterra (Montaraz, *et al.*, 1985, Barcenas, 1993). Se mantiene en un contenedor de nitrógeno líquido a -196 °C, para evitar los cambios morfológicos que presentan las colonias de esta bacteria cuando son mantenidas en medios de cultivo por pases seriados.

Estudios realizados en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán, mostraron que la cepa LBF de *B. bronchiseptica* se encontraba en Fase I (Chong, 1994).



**Tabla 6.1. Pruebas bioquímicas primarias y secundarias realizadas a las cepas aisladas de humanos, utilizando como control positivo a la cepa LBF aislada de un cerdo con signos clínicos de RAP.**

| <b>Cepa</b><br><b>Prueba Bioquímica</b> | <b>LBF Control positivo</b> | <b>ESP<sup>II</sup></b>     | <b>VIC</b>                  | <b>Resultado en la literatura: Cowan, 1974; Quinn, &amp; Markey, 2003.</b> |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| <b>Gram</b>                             | <i>Negativo Cocobacilos</i> | <i>Negativo Cocobacilos</i> | <i>Negativo Cocobacilos</i> | <i>Negativo Pequeños Cocobacilos</i>                                       |
| <b>Oxidasa</b>                          | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>  |
| <b>Catalasa</b>                         | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>  |
| <b>Motilidad Gota Suspendida.</b>       | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>  |
| <b>Motility Médium GI</b>               | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>NR</i>  |
| <b>Manosa</b>                           | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Inositol</b>                         | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Sorbitol</b>                         | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Ramnosa</b>                          | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Sacarosa</b>                         | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Lactosa</b>                          | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Glucosa</b>                          | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Arabinosa</b>                        | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Ácido Sulfhídrico</b>                | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Indol</b>                            | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Motilidad</b>                        | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>  |
| <b>Gelatina</b>                         | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>             | <i>Negativo</i>  |
| <b>Urea</b>                             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>  |
| <b>Nitratos</b>                         | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>             | <i>Positiva</i>  |

*NR= Prueba no realizada*

**Tabla 6.2. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de origen bovino utilizando el sistema Api20E.**

| <b>Cepa</b><br><b>Prueba Bioquímica</b> | <b>GBv03</b>                                 | <b>GBv04</b>                                 | <b>GBv05</b>                                | <b>GBv07</b>                                 | <b>GBv08</b>  |
|---|--|--|---|--|---|
| <b>Gram</b>                             | <i>Negativo<br/>Cocobacilos<br/>Pequeños</i> | <i>Negativo<br/>Cocobacilos<br/>pequeños</i> | <i>Negativo<br/>Cocobacilos<br/>Grandes</i> | <i>Negativo<br/>Pequeños<br/>Cocobacilos</i> | <i>Negativo<br/>Cocobacilos<br/>grandes,<br/>delgados</i> |
| <b>Oxidasa</b>                          | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>                             | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>   |
| <b>Catalasa</b>                         | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>                             | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>   |
| <b>Motilidad Gota<br/>Suspendida.</b>   | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>                             | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>   |
| <b>Motility<br/>Médium GI</b>           | <i>NR</i>                                    | <i>NR</i>                                    | <i>Positiva</i>                             | <i>Positiva</i>                              | <i>Positiva</i>   |
| <b>ONPG</b>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>ADH</b>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>LDH</b>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>ODC</b>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>H<sub>2</sub>S</b>                   | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Urea</b>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>TDA</b>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Indol</b>                            | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>VP</b>                               | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Gelatina</b>                         | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Glucosa</b>                          | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Manosa</b>                           | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Positivo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Inositol</b>                         | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Sorbitol</b>                         | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Ramnosa</b>                          | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Sacarosa</b>                         | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |
| <b>Melobiosa</b>                        | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Dudoso</i>                                | <i>Negativo</i>   |
| <b>Arabinosa</b>                        | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>                             | <i>Negativo</i>                              | <i>Negativo</i>   |

*NR= Prueba no realizada*

### 6.3. Susceptibilidad antimicrobiana.

En la **Tabla 6.3** se muestra la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, la cual sólo fue realizada a las cepas ESP<sup>II</sup>, VIC, GBv03 y la GBv04, debido a que el grupo de antibióticos y las concentraciones utilizadas inicialmente en el presente trabajo ya no se encontraron disponibles en el mercado. Sin embargo, podemos decir que de las 4 cepas trabajadas el 75% (3/4) fue susceptible a la kanamicina y colistina, el 50% (2/4) mostró una susceptibilidad a la tetraciclina, amikacina y nitrofurantoína y sólo el 25% (1/4), es decir, una sola cepa fue susceptible a la eritromicina y ampicilina.

**Tabla 6.3. Interpretación de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterianas de acuerdo a la Norma CLSI – NCCLS año 2005.**

| Antibiótico     | Concentración | ESP <sup>II</sup> | VIC | GBv03 | GBv04 |
|-----------------|---------------|-------------------|-----|-------|-------|
| Penicilina      | 2U            | R                 | R   | R     | R     |
| Vancomicina     | 5 µg          | R                 | R   | R     | R     |
| Kanamicina      | 1000 µg       | S                 | S   | R     | S     |
| Rifampicina     | 15 µg         | R                 | R   | R     | R     |
| Eritromicina    | 60 µg         | R                 | R   | S     | R     |
| Colistina       | 10 µg         | S                 | R   | S     | S     |
| Tetraciclina    | 30 µg         | R                 | R   | S     | S     |
| Nitrofurantoína | 300 µg        | R                 | R   | S     | S     |
| Ampicilina      | 10 µg         | R                 | R   | S     | R     |
| Dicloxacilina   | 1 µg          | R                 | R   | R     | R     |
| Amikacina       | 30 µg         | S                 | R   | R     | S     |

R= Resistente

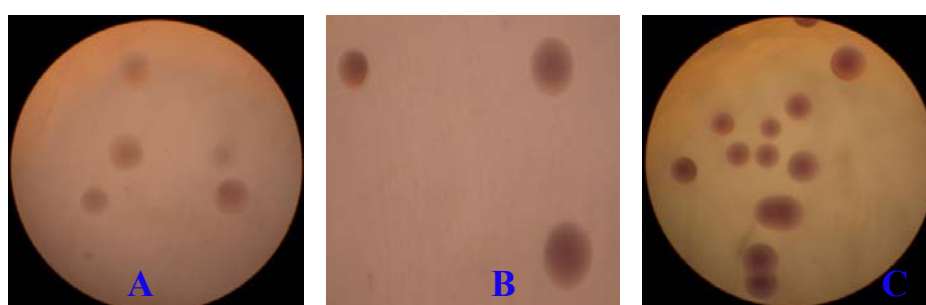
S= Sensible

#### 6.4. Determinación de la fase I en las cepas de *B. bronchiseptica* por medio de la tinción de cristal violeta.

Los resultados obtenidos de esta prueba se reportan en la **Tabla 6.4**. Las cepas LBF, VIC, ESP<sup>II</sup>, GBv03 y GBv08 se encontraron en la fase I; mientras que las cepas GBv05 y GBv07 no presentaban esta fase I; la cepa GBv04 se reportó como un resultado dudoso debido a que esta cepa mostró incorporar al colorante en una forma muy débil. En la **Figura 6.1** se muestran algunos ejemplos de colonias de cepas que resultaron positivas y negativas a la incorporación del colorante de cristal violeta.

**Tabla 6.4.** Interpretación de la técnica de tinción de cristal violeta.

| Cepa              | Incorporación del cristal violeta | Estado de la cepa |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
| LBF               | <i>Negativa</i>                   | <i>Fase I</i>     |
| VIC               | <i>Negativa</i>                   | <i>Fase I</i>     |
| ESP <sup>II</sup> | <i>Negativa</i>                   | <i>Fase I</i>     |
| GBv 03            | <i>Negativa</i>                   | <i>Fase I</i>     |
| GBv 04            | <i>Débil</i>                      | <i>Dudosa</i>     |
| GBv 05            | <i>Positiva</i>                   | <i>No Fase I</i>  |
| GBv 07            | <i>Positiva</i>                   | <i>No Fase I</i>  |
| GBv 08            | <i>Negativa</i>                   | <i>Fase I</i>     |



**Figura 6.1.** Ejemplos de algunas colonias de *B. bronchiseptica*, que no incorporaron el colorante de cristal violeta, indicando fase I (A), colonias que incorporaron débilmente el colorante, fase I dudosa (B) y aquellas que incorporaron completamente el cristal violeta, fase no I (C).

## **6.5. Obtención de los extractos proteicos bacterianos.**

### **6.5.1. Lisado de las bacterias por sonicación.**

De cada una de las cepas, después de haber sido sembradas en forma masiva en placas de agar Mac Conkey e incubadas a 37 °C durante 24 a 48 h, se obtuvo un crecimiento abundante y uniforme de colonias con las características morfológicas de la bacteria deseada. Posteriormente se cosechó cada cepa por separado y se obtuvieron los concentrados de bacterias con una consistencia viscosa de color violeta. Después de sonicar y precipitar con acetona en frío se obtuvieron precipitados amarillentos los cuales se resuspendieron con SSF, la conservación de estos extractos bacterianos se realizó manteniéndolos en refrigeración a una temperatura constante para evitar una desnaturalización.

### **6.5.2. Análisis de los extractos proteicos bacterianos.**

Para poder determinar la concentración de proteínas presentes en cada una de las muestras obtenidas, se utilizó el método de Bradford (1976). Se elaboró una curva patrón, los valores de esta curva se presentan en la **Tabla 6.5** y la correspondiente curva en la **Figura 6.2**. Para determinar la cuantificación de los extractos proteicos de las cepas se interpolaron los valores de absorbancia en la curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) y estas concentraciones se encuentran reportadas en la **Tabla 6.6**.

Tabla 6.5. Valores de densidad óptica (595 nm) obtenidos utilizando el método de Bradford para la curva patrón de proteínas empleando albúmina sérica bovina (ASB) como proteína de referencia.

| Concentración<br>$\mu\text{g/mL}$ | Absorbancia<br>(595 nm) |
|-----------------------------------|-------------------------|
| 5                                 | 0.133                   |
| 10                                | 0.176                   |
| 20                                | 0.226                   |
| 40                                | 0.285                   |
| 60                                | 0.353                   |
| 80                                | 0.404                   |
| 100                               | 0.472                   |
|                                   | $r= 0.993$              |

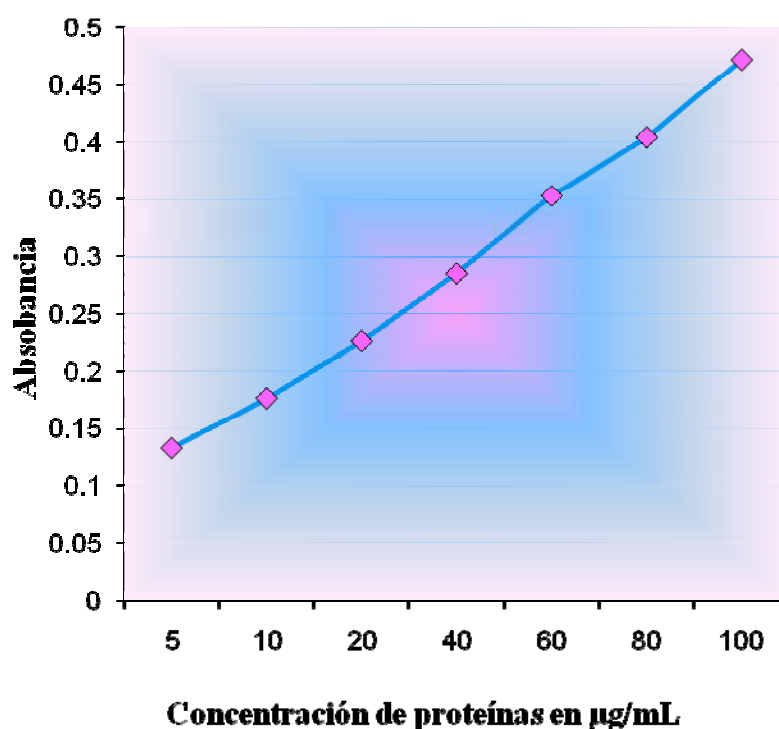


Figura 6.2. Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y empleando como proteína de referencia la ASB.

**Tabla 6.6. Contenido proteico de los extractos obtenidos de las diferentes cepas de *B. bronchiseptica* aisladas en este trabajo, cuantificación realizada por el método de Bradford.**

| <b>Cepa Problema</b>    | <b>Concentración <math>\mu\text{g/mL}</math></b> |
|-------------------------|--|
| <b>LBF</b>              | 806  |
| <b>VIC</b>              | 5367   |
| <b>ESP<sup>II</sup></b> | 526  |
| <b>GBv 03</b>           | 628  |
| <b>GBv 04</b>           | 586  |
| <b>GBv 05</b>           | 4094   |
| <b>GBv 07</b>           | 3383   |
| <b>GBv 08</b>           | 658  |

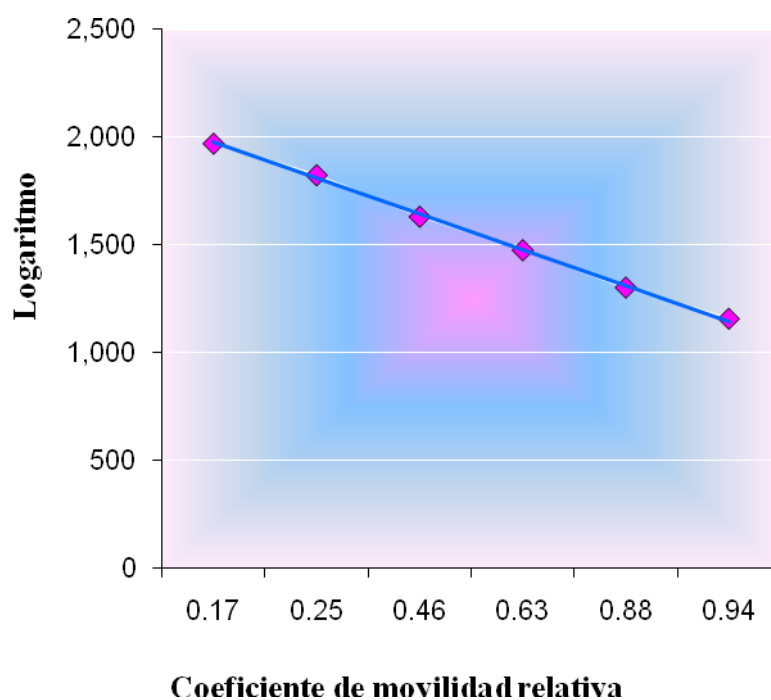
### **6.5.3. Electroforesis de los extractos proteicos bacterianos.**

En la **Tabla 6.7** se describen las proteínas que se utilizaron como marcadores de peso molecular, así como su correspondiente valor logarítmico, el cual posteriormente se graficó contra su coeficiente de movilidad relativa con el fin de obtener una curva patrón la cual se muestra en la **Figura 6.3**.

La elaboración de la curva patrón fue necesaria para poder determinar los pesos moleculares de las bandas obtenidas en la electroforesis de los extractos proteicos de las cepas de *B. bronchiseptica*.

**Tabla 6.7. Marcadores de peso molecular utilizados como referencia para la electroforesis de los extractos de las cepas de *B. bronchiseptica*, indicando los valores de tamaño molecular, logarítmicos y de su coeficiente de movilidad relativa.**

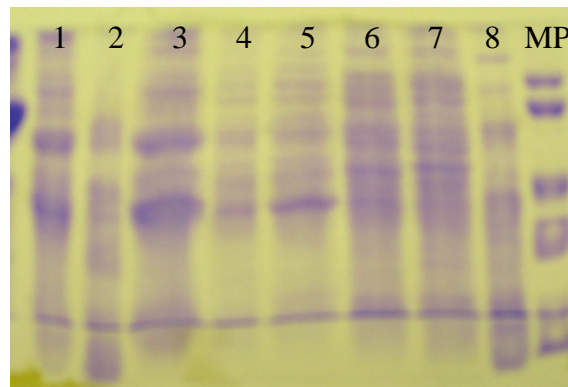
| <b>Marcador de peso molecular</b>       | <b>PM Kd</b> | <b>Log</b>     | <b>Coefficiente de movilidad relativa</b> |
|---|--------------|----------------|---|
| <b>Fosforilasa b</b>                    | <i>94.00</i> | <i>1.97312</i> | <i>0.17</i>                               |
| <b>Albúmina</b>                         | <i>67.00</i> | <i>1.82607</i> | <i>0.25</i>                               |
| <b>Ovalbúmina</b>                       | <i>43.00</i> | <i>1.63346</i> | <i>0.46</i>                               |
| <b>Anhidrasa Carbónica</b>              | <i>30.00</i> | <i>1.47712</i> | <i>0.63</i>                               |
| <b>Inhibidor de Tripsina</b>            | <i>20.10</i> | <i>1.30319</i> | <i>0.88</i>                               |
| <b><math>\alpha</math> Lactalbúmina</b> | <i>14.40</i> | <i>1.15836</i> | <i>0.94</i>                               |



**Figura 6.3. Curva patrón del logaritmo de los pesos moleculares contra su coeficiente de movilidad relativa.**



Los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida de los extractos proteicos de las diferentes cepas, se muestran en la **Figura 6.4**. En la cual se observa de manera general que los patrones electroforéticos de las 8 cepas trabajadas tienen algunas similitudes, esto debido a que existen bandas similares entre los diferentes extractos proteicos de algunas de las cepas trabajadas, por ejemplo en el patrón electroforético de la cepa LBF (carril 1) se observan bandas muy parecidas a las mostradas por la cepa ESP<sup>II</sup> (carril 3). De igual manera se observa que las bandas de la cepa GBv03 (carril 4) coinciden con algunas bandas de la cepa GBv04 (carril 5), así mismo las bandas de la cepa GBv05 (carril 6) con las bandas de la cepa GBv07 (carril 7) y las bandas de la cepa VIC (carril 2) con las bandas de la cepa GBv08 (carril 8).



**Figura 6.4.** Patrones electroforéticos de los geles de poliacrilamida de las diferentes cepas de *B. bronchiseptica* en el presente estudio. Carril: 1) LBF, 2) VIC, 3) Esp<sup>II</sup>, 4) GBv03, 5) GBv04, 6) GBv05, 7) GBv07, 8) GBv08 y MP es el marcador de pesos moleculares.

Los valores obtenidos de los pesos moleculares de las bandas presentes en los extractos proteicos de las cepas de *B. bronchiseptica* se reportan en la **Tabla 6.8**, la cual muestra que las bandas que se encuentran presentes en todas las cepas son las que corresponden a los pesos moleculares de 39.2 y 20.5 Kd. Otras de las bandas que se encuentran con mayor frecuencia en algunas de las cepas son las siguientes: 85.4 Kd, 62.5 Kd, 48.9 Kd. De la misma manera se obtuvieron bandas que se encuentran presentes por lo menos en tres cepas que corresponden a los pesos moleculares de 109.1, 104.4, 93.4, 89.3, 74.7, 71.5, 68.4, 65.4, 53.5, 46.8, 48.9 y 44.8 Kd.

**Tabla 6.8. Valores de los pesos moleculares (Kilodaltones, Kd) de cada una de las bandas presentes en los extractos proteicos de las cepas de *B. bronchisesptica*, obtenidas después del corrimiento electroforético.**

| <i>LBF</i> | <i>VIC</i> | <i>ESP II</i> | <i>GBv03</i> | <i>GBv04</i> | <i>GBv05</i> | <i>GBv07</i> | <i>GBv08</i> |
|------------|------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|            |            |               |              |              |              |              | 122.0        |
| 119.3      |            | 119.3         |              |              |              |              |              |
| 109.1      |            | 109.1         | 109.1        |              |              |              |              |
|            |            |               | 104.4        | 106.7        |              |              |              |
| 99.8       |            |               |              |              | 104.4        | 104.4        |              |
|            |            |               |              |              |              | 97.6         |              |
| 93.4       |            | 93.4          | 93.4         | 93.4         |              |              |              |
| 91.3       |            |               |              |              |              |              |              |
|            |            | 89.3          | 89.3         |              | 89.3         |              |              |
| 87.3       |            |               |              |              |              |              |              |
| 85.4       |            | 85.4          | 85.4         | 85.4         | 85.4         | 85.4         |              |
|            |            |               |              |              |              | 83.5         |              |
|            |            |               | 81.7         |              |              |              | 81.7         |
| 78.1       |            |               |              | 78.1         |              |              |              |
|            |            | 76.4          |              |              |              | 76.4         |              |
| 74.7       |            |               |              | 74.7         | 74.7         |              |              |
|            |            | 73.1          |              |              |              |              |              |
| 71.5       |            |               | 71.5         |              | 71.5         |              | 71.5         |
|            | 68.4       |               | 68.4         | 68.4         |              | 68.4         | 68.4         |
|            |            |               | 65.4         |              |              | 65.4         | 65.4         |
| 62.5       | 62.5       | 62.5          | 62.5         | 62.5         | 62.5         |              |              |
|            |            |               | 58.5         |              |              | 58.5         |              |
|            |            |               |              |              |              | 55.4         |              |
|            |            |               |              |              |              |              | 54.8         |
|            |            |               | 53.5         | 53.5         | 53.5         |              |              |
| 48.9       | 48.9       | 48.9          | 48.9         | 48.9         |              | 48.9         |              |
|            | 46.8       |               | 46.8         | 46.8         |              |              |              |
| 44.8       |            |               | 44.8         |              | 44.8         |              | 46.8         |
|            |            |               |              | 43.8         |              |              |              |
|            | 42.8       |               |              |              | 42.8         |              |              |
| 39.2       | 39.2       | 39.2          | 39.2         | 39.2         | 39.2         | 39.2         | 39.2         |
|            |            |               |              |              |              | 35.2         |              |
|            |            |               |              |              |              | 34.3         |              |
|            | 32.8       |               |              |              |              |              |              |
|            |            |               |              |              |              |              | 30.6         |
|            | 26.8       |               |              |              | 28.0         |              |              |
|            |            |               |              |              |              | 25.6         |              |
|            |            |               |              | 23.5         |              |              |              |
| 20.5       | 20.5       | 20.5          | 20.5         | 20.5         | 20.5         | 20.5         | 20.5         |
|            |            |               |              |              |              |              | 17.5         |
|            |            |               |              |              |              | 16.4         |              |

## 6.6. Caracterización de los factores de virulencia de las cepas de *Bordetella bronchiseptica*.

### 6.6.1. Producción de hemólisis en agar sangre.

Los resultados de esta prueba se encuentran reportados en la **Tabla 6.9**, en la cual se muestra que las cepas LBF y ESP<sup>II</sup> solo produjeron una hemólisis parcial de tipo alfa en agar sangre de bovino y ovino, respectivamente; pero no en los otros tipos de agar sangre preparados con sangre de diferentes especies de mamíferos.

Con respecto a la cepa de VIC se observó una hemólisis completa en la mayoría de los diferentes medios de agar sangre, exceptuando el agar sangre de ovino, en donde sólo presentó una hemólisis parcial. Las cepas bacterianas GBv03 y GBv04 mostraron el mismo comportamiento entre ellas, ya que ambas produjeron una hemólisis completa en agar sangre de perro y una hemólisis parcial en agar sangre de gato; mientras que la cepa GBv05 solamente desarrolló una hemólisis parcial en agar sangre de perro y en agar sangre de gato.

Las características hemolíticas mostradas por la cepa GBv07 fueron: una hemólisis completa en agar sangre de ovino, perro y gato, y una parcial de tipo alfa en agar sangre de bovino y humano. Así mismo, la cepa con mayor actividad hemolítica fue la GBv08 ya que mostró una hemólisis completa en todos los diferentes tipos de agar sangre. En la **Figura 6.5**, se muestran algunos ejemplos de los diferentes tipos de hemólisis producidos por las cepas aisladas.

Tabla 6.9. Producción y tipos de hemólisis presentadas por las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas, empleando agar sangre con glóbulos rojos de diferentes especies.

| Cepas de <i>B. bronchiseptica</i> | Bovino   | Ovino    | Perro    | Gato     | Humano  |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|
| LBF                               | $\alpha$ | $N$      | $N$      | $N$      | $N$     |
| VIC                               | $\beta$  | $\alpha$ | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$ |
| ESP <sup>II</sup>                 | $N$      | $\alpha$ | $N$      | $N$      | $N$     |
| GBv 03                            | $N$      | $N$      | $\beta$  | $\alpha$ | $N$     |
| GBv 04                            | $N$      | $N$      | $\beta$  | $\alpha$ | $N$     |
| GBv 05                            | $N$      | $N$      | $\alpha$ | $\alpha$ | $N$     |
| GBv 07                            | $\alpha$ | $\beta$  | $\beta$  | $\alpha$ | $\beta$ |
| GBv 08                            | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$  | $\beta$ |

$\alpha$ = Hemólisis parcial

$\beta$ = Hemólisis total

$N$ = No hubo producción de hemólisis

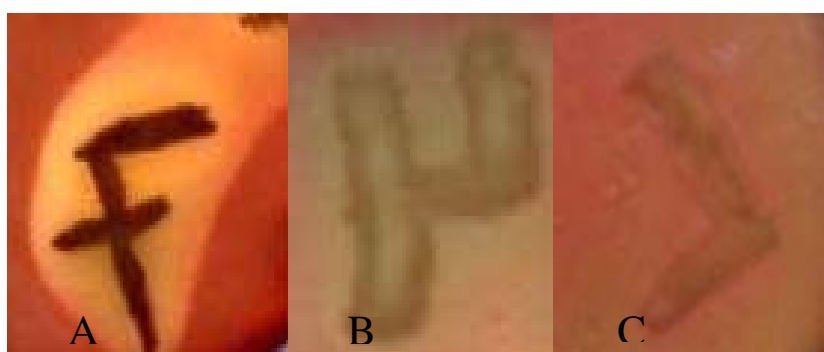


Figura 6.5. Ejemplos de los diferentes tipos de hemólisis producidos por las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas. Panel: A) hemólisis tipo beta o completa desarrollada por la cepa GBv07 en agar sangre de perro, B) hemólisis tipo alfa o parcial desarrollada por la cepa GBv04 en agar sangre de gato, C) solo se aprecia el crecimiento bacteriano pero sin producción de hemólisis.

---

### 6.6.2. Prueba de Aglutinación.

En la **Tabla 6.10**, se reportan los títulos de aglutinación de los sueros hiperinmunes producidos contra *B. bronchiseptica* (cepa LBF) y contra *B. pertusis*, al incubarse con las diferentes cepas aisladas. En base a esto podemos decir que ambos sueros hiperinmunes aglutinaron con todas las cepas.

Sin embargo, se puede apreciar que cuando el suero hiperinmune contra *B. bronchiseptica* se enfrentó con la cepa LBF aglutinó en un título mayor a 512, mientras que con el suero elaborado contra *B. pertusis* mostró un título de 16.

Por otro lado las cepas aisladas de humano, VIC y ESP<sup>II</sup>, mostraron el mismo comportamiento ya que ambas aglutinaron con el suero hiperinmune contra *B. bronchiseptica* a un título mayor (VIC, 32 y ESP<sup>II</sup>, 64) que con el suero hiperinmune contra *B. pertusis* (VIC, 8 y ESP<sup>II</sup>, 16).

En las cepas aisladas de bovinos se observa el mismo comportamiento en cuanto a que el título de corte obtenido con el suero hiperinmune contra *B. bronchiseptica* fue mucho mayor que con el suero hiperinmune contra *B. pertusis*. Debido a que el suero contra *B. bronchiseptica* mostró un título de 64 con la cepa GBv03, pero no así con el suero contra *B. pertusis* la cual mostro un título de 16.

El título obtenido del suero hiperinmune contra *B. bronchiseptica* con la cepa GBv04 fue de 32, mientras con el suero hiperinmune contra *B. pertusis* solo fue de 8. De la misma el suero contra *B. bronchiseptica* mostró el mismo comportamiento con las cepas GBv05 y GBv07 mostrando un título de 64 para ambas cepas, mientras que con el suero hiperinmune contra *B. pertusis* fue de 8. Así mismo los dos sueros hiperinmunes mostraron un título mayor a 512 con cepa GBv08.

**Tabla 6.10. Título de corte que presentó cada una de las cepas trabajadas en la prueba de aglutinación.**

| Cepas d <i>B. bronchiseptica</i> | Título de Corte                             | Título de Corte                       |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|
|                                  | <i>Hiperinmune contra B. bronchiseptica</i> | <i>Hiperinmune contra B. pertusis</i> |
| <b>LBF</b>                       | >512  | 16                                    |
| <b>VIC</b>                       | 32  | 8                                     |
| <b>ESP<sup>II</sup></b>          | 64  | 16                                    |
| <b>GBv03</b>                     | 64  | 16                                    |
| <b>GBv04</b>                     | 32  | 8                                     |
| <b>GBv05</b>                     | 64  | 8                                     |
| <b>GBv07</b>                     | 64  | 8                                     |
| <b>GBv08</b>                     | >512  | >512                                  |
| <b><i>B. pertusis</i></b>        | >512  | >512                                  |

### 6.6.3. Prueba de hemaglutinación.

Esta prueba se realizó empleando dos diferentes formas de preparación de las suspensiones bacterianas. La primera se efectuó con las suspensiones bacterianas inactivadas con formol al 0.03% (v/v); la segunda forma fue utilizando las suspensiones bacterianas inmediatamente después de haber sido cosechadas y no fueron inactivadas. Los resultados obtenidos se encuentran reportados en la **Tabla 6.11**, en donde se observa que la cepa LBF con la suspensión inactivada aglutinó los glóbulos rojos de borrego y perro, pero no los de humano, bovino y gato, mientras que con la suspensión no inactivada aglutinó con los eritrocitos de todas las especies, humano, bovino, gato, borrego y perro.

La cepa de VIC con la suspensión inactivada solo aglutinó con eritrocitos de humano y de perro, mientras que con la suspensión no inactivada mostró aglutinación con los eritrocitos de bovino, gato y borrego, pero no con los eritrocitos de humano y perro.

Las suspensiones inactivadas de las cepas GBv03 y GBv08 no aglutinaron con ninguno de los glóbulos rojos de las diferentes especies, mientras que con la suspensión no inactivada la cepa GBv03 aglutinó con los eritrocitos de todas las especies trabajadas, mientras que la cepa GBv08 solo aglutinó con los eritrocitos de bovino y borrego, mostrando un resultado negativo para los glóbulos rojos de humano, gato y perro.

De la misma forma la suspensión inactivada de la cepa GBv05 presentó aglutinación con los glóbulos rojos de borrego y de bovino, mientras que con la suspensión no inactivada solo aglutinó con las células de bovino, gato y borrego, siendo negativa con las células de humano y perro.

Esta prueba para las cepas GBv07 y ESP<sup>II</sup>, solo se realizó con el tipo de la suspensión inactivada; en donde la aglutinación resulto positiva únicamente con los eritrocitos de borrego y perro, esto para la cepa GBv07, mientras que la cepa ESP<sup>II</sup> solo aglutinó los eritrocitos de perro.

**Tabla 6.11. Hemaglutinación de las suspensiones bacterianas inactivadas y (sin inactivar), empleando glóbulos rojos de diferentes especies.**

| Cepa   | Tipo de Eritrocitos |  | Humano          | Bovino          | Gato            | Borrego         | Perro           |
|--------|---------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|        | Suspensión          |  |                 |                 |                 |                 |                 |
| LBF    | Sin inactivar       |  | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> |
| VIC    | Sin inactivar       |  | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> |
|        | Inactivada          |  | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> |
| ESP II | Sin inactivar       |  | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> |
| GBv03  | Sin inactivar       |  | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |
| GBv04  | Sin inactivar       |  | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> |
| GBv05  | Sin inactivar       |  | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> |
| GBv07  | Sin inactivar       |  | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       | <i>NR</i>       |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Positivo</i> |
| GBv08  | Sin inactivar       |  | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Positivo</i> | <i>Negativo</i> |
|        | Inactivada          |  | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> | <i>Negativo</i> |

**Inactivada: Solución bacteriana inactivada con formol al 0.03%.**

**Sin inactivar: Solución bacteriana fresca (recién cosechada).**

**NR: Prueba no realizada.**



#### 6.6.4. Prueba de la DNT.

Los resultados obtenidos de esta prueba se reportan en la **Tabla 6.12**, en la cual se muestra que las cepas GBv04 y GBv08 produjeron una lesión necrótica, este criterio se tomó después de observar durante 48 h la piel de los cuyes inoculados en el lomo con los extractos de las diferentes cepas aisladas. Las cepas VIC, ESP<sup>II</sup>, GBv03, GBv05, GBv07 presentaron un resultado negativo pues sólo se observó una reacción de inflamación similar a la producida por los controles negativos, la cual se debió al inóculo administrado.

**Tabla 6.12. Efecto dermonecrotico de los extractos proteicos de las cepas de *B. bronchiseptica* al ser administrados intradérmicamente en piel de cuyes.**

| Cepas de <i>B. bronchiseptica</i> | Necrosis en cuye |
|-----------------------------------|------------------|
| VIC                               | <i>Negativa</i>  |
| ESP <sup>II</sup>                 | <i>Negativa</i>  |
| GBv 03                            | <i>Positiva</i>  |
| GBv 04                            | <i>Positiva</i>  |
| GBv 05                            | <i>Negativa</i>  |
| GBv 07                            | <i>Negativa</i>  |
| GBv 08                            | <i>Positiva</i>  |

---

## 7. DISCUSIÓN.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente trabajo, *B. bronchiseptica* es el agente causante de enfermedades respiratorias de un amplio número de especies animales, entre los que se incluyen: ratones, ratas, cobayos, cerdos, conejos, gatos, perros, borregos, caballos y osos (M'Gowan, 1911; Good y May, 1971; Deeb *et al.*, 1990; Gerlacha, *et al.*, 2001). Sin embargo, no existe ningún reporte de que en mamíferos como los bovinos, esta bacteria se encuentra como un comensal y mucho menos de que esté involucrada en alguna enfermedad respiratoria que afecte a dicha especie.

En humanos *B. bronchiseptica* puede colonizar el tracto respiratorio, se ha reportado el aislamiento de esta bacteria a partir de personas que habían tenido contacto o no con animales (domésticos o de granja), así como de individuos que no manifestaban ningún problema respiratorio (Woolfrey, y Moody, 1991; Katzenstein, *et al.*, 1984; Papasian, *et al.*, 1987). Existen reportes más actuales donde han logrado el aislamiento de *B. bronchiseptica* en muestras, tanto de humanos sanos como de individuos inmunocomprometidos (Bauwens *et al.*, 1992; Gueirard *et al.*, 1995; Stefanelli, *et al.*, 1997; Letcher, *et al.*, 1993; Gerlacha, *et al.*, 2001; Lorenzo-Pajuelo, 2002; Huebner, *et al.*, 2006; Rath *et al.*, 2008).

Considerando los trabajos mencionados en el párrafo anterior, el propósito del presente estudio fue aislar y caracterizar a cepas de *B. bronchiseptica* a partir de exudados faríngeos y nasales realizados a humanos y bovinos, respectivamente. Lográndose el aislamiento de cinco cepas de nueve bovinos muestreados, estas cepas presentaron colonias pequeñas, lisas, rosadas, translúcidas, puntiformes, de forma circular, de poca elevación, brillantes y de bordes regulares, esta morfología coincide con las características morfológicas que se encuentran reportadas en la literatura (Cowan, 1974; Quinn, y Markey, 2003).

Con respecto a las ocho muestras tomadas de humano sólo se logró el aislamiento de una cepa, cabe hacer mención que esta cepa fue aislada de un individuo clínicamente sano, el cual hizo referencia a tener una convivencia cercana con animales domésticos. Esta cepa aislada presentó las mismas características morfológicas obtenidas por las cepas de bovino, de la misma manera la cepa ESP<sup>II</sup> la cual aislada con anterioridad de un individuo clínicamente sano y resembrada (para la realización del presente trabajo), manifestó características de crecimiento similares y por ende coinciden con los datos reportados en la bibliografía (Cowan, 1974; Quinn, y Markey, 2003).

La cepa LBF utilizada como control positivo mostró colonias medianas, de forma circular, con poca elevación y de bordes regulares, el tamaño de colonia presentado por esta cepa no coincide con lo reportado en la bibliografía, sin embargo, existen reportes en los cuales se menciona que los pasajes *in vitro* de la bacteria pueden afectar su morfología colonial (Goodnow, 1980; Nakase, 1957; Roop II *et al.*, 1987).

Cabe mencionar que en la literatura existen diversos reportes en los cuales mencionan que el ganado bovino es afectado por *Mannheimia haemolytica*, ocasionando neumonía severa. De la misma manera se encuentra reportado en la bibliografía acerca una enfermedad comúnmente llamada Fiebre de Embarque, denominada así porque cualquier cambio repentino (como destete, transportación o modificación climática) que mantenga en tensión al ganado, sobre todo a los becerros, los vuelve susceptibles al agente infeccioso. No se ha identificado al organismo causante, se cree que se trata de una mezcla de virus y bacterias, entre las cuales se puede mencionar al virus de Diarrea viral bovina (BVD), de la Rinotraquitis infecciosa bovina (IBR), de la Parainfluenza tipo 3 (PI3), al virus Respiratorio sincicial bovino; entre las bacterias se encuentra *Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*. A pesar de esto no existe ningún reporte hasta el momento de la presencia de *B. bronchiseptica* en el tracto respiratorio de estos animales y de su posible participación en alguna enfermedad de la especie bovina.

En cuanto a las características bioquímicas que presentaron cada una de las cepas aisladas, se puede decir que las de origen humano coinciden totalmente con los datos reportados en la literatura (Cowan, 1974; Quinn, y Markey, 2003). Sin embargo, las cepas de origen bovino presentaron resultados similares en todas las pruebas bioquímicas realizadas, exceptuando la prueba de la urea. Con respecto a esta incompatibilidad, cabe hacer mención que la reacción de la ureasa determina la capacidad de la bacteria para hidrolizar la urea en dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa, elevando así el pH del medio. Así mismo, se sabe que la ureasa bacteriana está implicada en la patogénesis de muchas condiciones clínicas como el estar directamente asociada en la formación de infecciones en huesos y contribuir en la patogénesis de la pielonefritis, encefalopatía por amonio, coma hepático, incrustación en catéteres urinarios y ulceraciones pépticas. También se ha mencionado que la ureasa puede estar relacionada en la activación del complemento. De igual forma se sabe que en los rumiantes el 35% de la flora bacteriana presente en el rumen posee una actividad ureolítica (Mobley y Hausinger., 1989).

Con respecto a los aislamientos bovinos logrados en el presente trabajo y debido a que no se encontró ningún antecedente sobre la posible existencia de *B. bronchiseptica* en esta especie, se puede especular que el metabolismo de este ganado es el que le proporcione a la bacteria los sustratos necesarios para su sobrevivencia, sin que gaste su energía, evitando la síntesis de algunas enzimas como la ureasa, lo cual se podría ver reflejado en el resultado negativo a la prueba bioquímica de la urea, característica presentada por todas las cepas aisladas de bovinos. Por lo tanto se puede mencionar que estas cepas podrían tratarse de un nuevo biotipo de *B. bronchiseptica*, para confirmar esto, tendría que realizarse un análisis de Biología Molecular a cada una de las cepas aisladas empleando la técnica de 16S rRNA, la cual es usada para estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana (Janda y Abbott, 2007).

Otra especulación planteada para explicar el resultado negativo hacia la prueba bioquímica de la urea, radica en el que la bacteria aislada no fuese otro biotipo de *B. bronchiseptica*, si no que se tratara de otra bacteria como *Alcaligenes*, *Achromobacter* u otra especie del género *Bordetella* como lo es *B. pertusis*. Cabe mencionar que los

---

---

tres géneros pertenecen a la misma familia bacteriana (Alcaligenaceae). Sin embargo, estudiando más a fondo cada una de las posibles opciones mencionadas anteriormente, se encontró que dadas las características y condiciones de crecimiento, quedaría descartado el género *Alcaligenes* ya que presenta colonias con bordes biselados, habitualmente rodeadas por un halo que cambia al color verde en agar sangre de oveja y además produce un olor frutal muy característico que recuerda al de las manzanas o fresas. Por otra parte *B. pertusis*, presenta como características bioquímicas una motilidad negativa y una ureasa negativa, sin embargo, las cepas aisladas de bovino mostraron una marcada motilidad positiva por lo que se descarta la posibilidad de que las cepas fueran *B. pertusis*, aunado a lo mencionado anteriormente cabe mencionar que de esta especie sólo se han reportado aislamientos de origen humano, además de que no crece en agar Mac Conkey, medio que fue utilizado casi siempre para el resembrado de las cepas. Y finalmente la especie de *Achromobacter* aunque crece en agar Mac Conkey, y desarrolle colonias muy parecidas a las reportadas para *B. bronchiseptica* presenta como una característica marcada una oxidación fuerte hacia la xilosa (Bailey y Scott. 2002).

Se han encontrado en la literatura trabajos como el realizado en 1996 por McMillan y colaboradores, quienes reportan cepas de *B. bronchiseptica* con ureasa negativa, de igual forma demuestran que la urea está regulada por el fenotipo *bvg<sup>-</sup>* y que también se ve afectada por la temperatura, así mismo mencionan que la ureasa no puede ser inducible por la urea o regulada por la disponibilidad del nitrógeno. Este reporte sustenta a los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a las cepas de bovino que mostraron ser urea negativa (McMillan, *et al.*, 1996).

De igual forma, en otro estudio realizado en hospederos murinos se menciona que la ureasa no es esencial para que *B. bronchiseptica* colonice y persista dentro del hospedero (McMillan, *et al.*, 1999). Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, se puede decir que la presencia de la enzima ureasa en *B. bronchiseptica* no es de suma importancia para su colonización y persistencia en el tracto respiratorio de la especie bovina.

Como puede observarse en la Tabla 6.2 la cepa Gbv07 muestra una reacción positiva hacia la utilización de la manosa y un resultado dudoso de la asimilación de la melobiosa, estas pequeñas variaciones en el metabolismo de esta cepa son soportados por los estudios existentes en cuanto a los requerimientos nutricionales de *B. bronchiseptica*, en donde los autores reportan un alto nivel de variabilidad entre las cepas aisladas de diferentes hospederos y su habilidad para utilizar fuentes de carbono en particular (Porter, *et al.*, 1993).

Ulrich y Needham reportaron que *B. bronchiseptica* requiere una mezcla de aminoácidos para su crecimiento, mientras que Proom menciona que algunos aislamientos fueron capaces de utilizar al piruvato y glutamato como fuente de energía (Ulrich y Needham., 1983). Otros estudios han reportado que en un medio líquido con glucosa, *B. bronchiseptica* (fase no reportada) creció aeróbicamente incrementando el pH del medio, pero no se observó algún crecimiento en presencia de glucosa, maltosa, sacarosa, dextrosa o manitol, esto anaeróbicamente (Plotkin y Bemis., 1998).

Con respecto a la prueba de susceptibilidad antimicrobiana realizada para las cepas aisladas (dos de humano, VIC y ESP<sup>II</sup>, y dos de bovino, GBv03 y GBv04), los resultados obtenidos en esta prueba se encuentran en la Tabla 6.3, en la cual se puede observar que las dos cepas aisladas de bovinos presentaron una mayor sensibilidad hacia los antibióticos en comparación con las dos cepas aisladas de humano, así mismo se observa que el 75% fue susceptible a la kanamicina y colistina, el 50% mostró una susceptibilidad a la tetraciclina, amikacina y nitrofurantoína, y sólo el 25% fue susceptible a la eritromicina y ampicilina, dado lo anterior se puede comentar que los antibióticos pueden varían su efecto sobre las distintas especies bacterianas e incluso sobre las cepas de la misma especie.

Cabe mencionar que una de las cepas aisladas de humanos (VIC) sólo mostró susceptibilidad a la kanamicina, esta cepa fue recuperada de una persona clínicamente sana que convivía con sus mascotas (perros); sin embargo, sus mascotas ya habían sido tratadas con algunos fármacos, lo que nos permite especular que la cepa se hizo resistente, es por esta razón que la cepa no mostró una susceptibilidad hacia los otros antibióticos utilizados; la inestabilidad en los resultados obtenidos sugiere la transformación de cepas sensibles a cepas resistentes a ciertos antibióticos posiblemente ocasionada por una equivocada estrategia de dosificación y tratamiento.

Las cepas de *B. bronchiseptica* se han clasificado como virulentas y no virulentas, de acuerdo a la morfología colonial y hemólisis; las colonias en fase I son pequeñas, lisas, convexas y virulentas, las colonias en fase IV son grandes, rugosas, de borde regular y no virulenta. Por lo que las cepas de *B. bronchiseptica* pueden pasar de una fase I virulenta a la fase IV no virulenta. Sin embargo, la descripción de las colonias bacterianas por fases a generado confusión ya que las colonias de la fase I son altamente inestables y se pueden transformar en fases II, III y IV, dependiendo de las condiciones de su crecimiento (Leslie y Gardner, 1931; Molina, *et al.*, 2006). Para determinar la fase de las cepas aisladas en este trabajo se utilizó como referencia la técnica de cristal violeta; los autores Hitoshi y Yasuro, mencionan que las cepas presentes en fase I son incapaces de absorber el colorante, debido a que su membrana es lisa e impermeable; mientras que las cepas que no se encuentran en esta fase (II, III, IV) absorben el colorante debido a que su membrana sufre modificaciones en su estructura haciéndola permeable y causando que las colonias se observen coloridas.

En el presente trabajo se estudiaron ocho cepas, de las cuales sólo VIC, ESP<sup>II</sup>, GBv03, GBv08 y LBF se encontraron en fase I; mientras que la cepa GBv04 se reportó como un resultado dudoso debido a que esta cepa mostró incorporar al colorante en una forma muy débil y las cepas GBv05 y GBv07 no se encontraron en fase I. (Hitoshi y Yasuro., 1986). Dados los resultados anteriores se puede decir que esta técnica por sí sola no nos puede indicar el grado de virulencia de las cepas, pero si puede ser complementada con otras pruebas como la dermonecrotoxina,

aglutinación y hemaglutinación y así poder dar una idea del grado de virulencia presentado por las cepas.

Como se mencionó anteriormente *B. bronchiseptica* tiene la capacidad de producir la dermonecrotina (DNT), proteína capaz de ocasionar necrosis en diferentes hospederos. Al realizar la prueba de la actividad dermonecrotica de los extractos bacterianos lisados en la piel de los cuyes, se observó que del total de las cepas aisladas sólo la GBv03, GBv04 y GBv08 presentaron la dermonecrotina; mientras que las cepas VIC, ESP<sup>II</sup>, GBv05, GBv07 mostraron un resultado negativo pues sólo se observó una reacción de inflamación similar a la producida por los controles negativos, la cual se debió al inóculo administrado. Cabe mencionar que la dosis mínima necrozante para cuyes es de 2 ng de proteína por 0.1mL.

Tomando en cuenta los resultados mencionados anteriormente y relacionándolos con la determinación de la fase en que se encontraba cada una de las cepas, podemos decir que los resultados concuerdan con las cepas GBv03 y GBv08 ya que estas cepas se encontraron en fase I, mientras la cepa Gbv04 se reportó como dudosa no descartando que se pudiera encontrar en esta fase; esto debido a que en la fase I las cepas son virulentas y pueden producir la DNT, la cual es tóxica para algunos hospederos en este caso para el cuy; cabe mencionar que estas tres cepas fueron aisladas de los bovinos, por otro lado las cepas aisladas de humanos VIC y ESP<sup>II</sup> no produjeron la DNT de la misma manera que la LBF, sin embargo en un estudio realizado por Brockmeier y Register se menciona que la presencia de la DNT no es necesaria para predisponer a los cerdos a infecciones respiratorias secundarias (Brockmeier y Register, 2007).

La capacidad hemolítica de *B. bronchiseptica* está dada por una hemolisina (adenilato ciclase), la expresión de este factor puede variar según las condiciones del cultivo; por ejemplo este factor no se detecta en suspensiones de *B. bronchiseptica* incubadas a 22 °C o en presencia de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) o ácido nicotínico.



Para la evaluación de este factor de virulencia fue necesario preparar agar sangre con eritrocitos de diferentes especies (gato, perro, bovino, ovino y humano).

Los resultados de esta prueba se encuentran reportados en la Tabla 6.9, en la cual se observa que todas las cepas desarrollaron hemólisis en los diferentes tipos de agar sangre, sin embargo, la cepa con mayor actividad hemolítica fue la GBv08 ya que mostró una hemólisis completa en todos los diferentes tipos de agar sangre. Así mismo, las cepas bacterianas GBv03 y GBv04 mostraron un comportamiento similar entre ellas, ya que ambas produjeron una hemólisis de tipo beta en agar sangre de perro y una hemólisis de tipo alfa en agar sangre de gato, mientras que las cepas LBF y ESP<sup>II</sup> en agar sangre de bovino y ovino, respectivamente sólo produjeron una hemólisis de tipo alfa, pero no en los otros tipos de agar; de la misma manera la cepa GBv05 solamente desarrolló una hemólisis de tipo alfa en agar sangre de perro y en agar sangre de gato. Mientras que la cepa GBv07 presentó una hemólisis de tipo beta en agar sangre de ovino, perro y gato, y una de tipo alfa en agar sangre de bovino y humano. Relacionando la capacidad hemolítica con la presencia de la toxina DNT de las cepas GBv08, GBv03 y GBv04, se confirmó el grado de virulencia de estas, ya que fueron las únicas cepas que produjeron la dermonecrotina y además se encontraron en fase I empleando la técnica de tinción de cristal violeta. No obstante hay reportes en los cuales se menciona que *B. bronchiseptica* puede presentar una actividad variable en agar sangre (Biberstein y Chung., 1994).

La cepa LBF utilizada como control positivo sólo mostró una hemólisis tipo alfa en agar sangre de bovino, sin embargo otros autores que utilizaron la cepa LBF como control reportaron que presentaba una hemólisis de tipo beta, lo que indica que después de 10 años de conservación en nitrógeno su actividad hemolítica pudo verse disminuida.

La prueba de hemaglutinación fue realizada con suspensiones bacterianas de cada una de las cepas aisladas tanto frescas (sin inactivar) como inactivadas con formol; sin embargo, sólo los resultados obtenidos por las suspensiones frescas se

analizan a continuación, esto debido a que las suspensiones inactivadas mostraron una menor actividad hemaglutinante en comparación con las suspensiones frescas, indicando que el formol disminuye la actividad de hemaglutinar a los eritrocitos.

Retomando los resultados obtenidos en esta prueba, muy brevemente se puede mencionar que todas las cepas mostraron una mayor actividad hemaglutinante con los eritrocitos de borrego, bovino, y perro. Sin embargo las cepas aisladas de humanos mostraron una menor capacidad de hemaglutinar a los eritrocitos de su misma especie. Mientras que el 80% de las cepas aisladas de bovino mostraron una hemaglutinación positiva para los eritrocitos de bovino y perro. En un reporte se propuso que las diferencias en cuanto a la hemaglutinación puede deberse a las especies del origen de los aislamientos de *B. bronchiseptica* (Kang, *et al.*, 1970; Molina, *et al.*, 2006). En 1986 Lee y colaboradores reportaron que las cepas que se encuentran en fase I tiene la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de diferentes especies como humano, caballo, bovino y pollo, mientras que cepas en fase no I no aglutinan eritrocitos de bovino y pollo (Lee, *et al.*, 1986).

Los ensayos de aglutinación en las cepas de *B. bronchiseptica* han sido utilizados como un método serológico para facilitar el diagnóstico y estimar la frecuencia de alguna enfermedad ocasionada por esta bacteria. Sin embargo, existen factores que pueden influir en los resultados de esta prueba; como lo observado en un estudio realizado por Jenkins, quien reporta que se obtienen títulos aglutinantes más altos cuando se utiliza como antígeno a la bacteria en fase I que cuando no se encuentra en esta fase; así mismo la reacción antígeno-anticuerpo puede verse afectada por la temperatura (Jenkins, 1978; Aguilar, 2004). En el presente estudio este ensayo se realizó mediante la utilización de sueros hiperinmunes contra *B. bronchiseptica* y *B. pertusis* enfrentándolos con cada una de las suspensiones bacterianas de las cepas aisladas, los resultados obtenidos muestran un título de aglutinación mayor con el suero hiperinmune contra *B. bronchiseptica* que contra el de *B. pertusis*, este resultado se presentó en un 100% en cada una de las cepas aisladas, por lo tanto podemos confirmar que las cepas aisladas corresponden al género *Bordetella* especie *bronchiseptica*.

La mayoría de los polímeros biológicos poseen carga eléctrica y, por lo tanto, son capaces de migrar bajo la influencia de un campo eléctrico por esta razón fue utilizada la técnica de electroforesis para observar la similitud entre las cepas aisladas mediante el análisis de las proteínas presentes en cada una de los extractos proteicos obtenidos de cada cepa de *B. bronchiseptica*.

Los patrones electroforéticos obtenidos de los extractos proteicos de las cepas aisladas muestran que si existen similitudes ya que el 100% de las cepas presentó las bandas de peso molecular de 39.2 y 20.5 Kd, así mismo el 75 % (6/8) presentaron las bandas de peso molecular de 85.4, 48.9 y 62.5 Kd, el 62.5 % (5/8) coincide en una banda con PM de 68.4 Kd, la cual podríamos caracterizar como Pertactina, esta proteína se encontró presente en las cepas VIC, GBv03, GBv 04, GBv07 y la GBv 08 estos resultados coinciden y confirman la virulencia de las cepas, con excepción de la cepa GBv07 la cual en el corrimiento electroforético presentó la proteína, pero no produjo la dermonecrotina y tampoco se encontró en fase I como para ser considerada virulenta. De la misma manera el 50% (4/8) de las cepas aisladas mostró las bandas de cuyo peso molecular fue de 93.4, 74.5 y 46.8 Kd, la cepa que presentó la proteína de mayor peso molecular fue la GBv08 con 122 Kd; cabe mencionar que la cepa de VIC demostró como proteína de mayor peso molecular la de 68.4 Kd.

En un estudio realizado por Cotera y su grupo, se muestra que de las diversas cepas analizadas no presentaron una diferencia muy marcada a nivel de componentes estructurales por lo que se podría pensar que cualquiera de ellas podría inducir inmunidad cruzada contra las demás (Cotera, *et al.*, 1990); comparando los resultados obtenidos en este estudio se puede comentar que los patrones electroforéticos que muestran las diferentes proteínas obtenidas durante el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida SDS- PAGE, si presentaron algunas diferencias. Sin embargo, se puede mencionar que es posible inducir inmunidad cruzada entre algunas cepas, por ejemplo, la GBv 03, GBv04 y la GBv 08 ya que muestran una similitud en cuanto a las diferentes pruebas realizadas en este trabajo.

Tomando en cuenta las pruebas realizadas y los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir que a las cepas aisladas se les realice como un estudio futuro un análisis filogenético, sobre todo para confirmar la especie de *Bordetella* correspondiente a las cepas aisladas de los bovinos. Cabe mencionar que las pruebas de actividad metabólica han sido tradicionalmente utilizadas para la identificación de las especies del género *Bordetella*, sin embargo, se ha buscado desarrollar métodos moleculares del análisis del DNA. En este sentido, el análisis de las secuencias del gen de ARN 16S (también conocido como 16S rDNA) ha cobrado importancia para el estudio de filogenia y taxonomía bacteriana (Janda y Abbott, 2007). De hecho la clasificación de procariontes en la 2da. Edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática está basada en este procedimiento.

## 8. CONCLUSIONES.

**8.1.** Se logró el aislamiento de una cepa de *B. bronchiseptica* (VIC) a partir de ocho exudados faríngeos realizados a humanos clínicamente sanos.

**8.2.** De nueve exudados nasofaríngeos practicados a bovinos se logró aislar cinco cepas de *B. bronchiseptica* (GBv03, GBv04, GBv05, GBv07 y GBv08) que coincidieron en su totalidad con los datos reportados en la literatura a excepción de la prueba bioquímica de la urea, a la cual resultaron ser negativas.

**8.3.** Todas las cepas aisladas tanto de humano como de bovino fueron positivas a la prueba serológica de aglutinación en microplaca utilizando el suero hiperinmune específico para de *B. bronchiseptica*.

**8.4.** Tres de las cepas aisladas GBv03, GBv04 y GBV08 resultaron ser cepas virulentas, considerando la evaluación de la presencia de factores de virulencia, tales como la hemaglutinina, hemólisis y la dermonecrotoxina.

**8.5.** Los patrones electroforéticos de las cepas de *B. bronchiseptica* GBv03, GBv04 y GBV08 que presentaron similitud en el grado de virulencia son equivalentes entre sí, mientras que cepas menos virulentas presentaron variaciones en cuanto a la presencia de las bandas proteicas.

**8.6.** La capacidad de aglutinar hematíes de diferentes especies presentada por las cepas de *B. bronchiseptica* se ve afectada por el formaldehído, cuando se valora por la prueba serológica de hemaglutinación en microplaca.

---

## 9. ANEXOS

### 9.1. Reactivo de Bradford.

|   |        |
|---|--------|
| Azul de Coomassie R-250                           | 100 mg |
| Etanol 95%  | 50 mL  |
| Ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) | 100 mL |
| Aforar a un litro                                 |        |

### 9.2.- Geles de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio PAGE-SDS al 12%.

#### 9.2.1. Solución de monómeros

|                |        |
|----------------|--------|
| Acrilamida     | 30 g   |
| Bis-acrilamida | 0,8 g  |
| Agua destilada | 100 mL |

Se filtró en papel Whatman No. 1 y se almacenó a 4 ° C, evitando el contacto con la luz.

#### 9.2.2. Regulador del gel de separación Tris- HCl 1.5 M, pH 8.8

|                |         |
|----------------|---------|
| Trizma base    | 9.082 g |
| Agua destilada | 50 mL   |

Se ajustó el pH con HCl 6 N, se filtró en papel Whatman No. 1 y se almacenó a 4 ° C.

#### 9.2.3 Regulador del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

|                |         |
|----------------|---------|
| Trizma base    | 3.027 g |
| Agua destilada | 50 mL   |

Se ajustó el pH con HCl 6 N, se filtró en papel Whatman No. 1 y se almacenó a 4 ° C.

---

**9.2.4 Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 10%**

|                |       |
|----------------|-------|
| SDS            | 1 g   |
| Agua destilada | 10 mL |

Se guardó a temperatura ambiente.

**9.2.5 Persulfato de amonio al 10%**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Persulfato de amonio | 0.1 g |
| Agua destilada       | 1 mL  |

Se preparó en el momento de su utilización.

**9.2.6 Gel tapón**

|  |           |
|--|-----------|
| Tris 1.5 M, pH 8.8                       | 0.25 mL   |
| Solución de monómeros                    | 0.5 mL    |
| Persulfato de amonio al 10%              | 5 $\mu$ L |
| N'N'N'N' tetrametiletilendiamina (TEMED) | 3 $\mu$ L |

**9.2.7 Gel de separación**

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Tris 1.5 m pH 8.8           | 1.24 mL    |
| Monómeros                   | 1.99 mL    |
| SDS al 10%                  | 49 $\mu$ L |
| Agua destilada              | 1.67 mL    |
| Persulfato de amonio al 10% | 50 $\mu$ L |
| TEMED                       | 25 $\mu$ L |

---

**9.2.8 Gel concentrador**

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Tris 0.5 M pH 6.8           | 0.5 mL     |
| Monómeros                   | 0.25 mL    |
| SDS al 10%                  | 20 $\mu$ L |
| Agua destilada              | 1.13 mL    |
| Persulfato de amonio al 10% | 50 $\mu$ L |
| TEMED                       | 25 $\mu$ L |

**9.3.** Solución amortiguadora de corrida (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3).

|                |         |
|----------------|---------|
| Trizma base    | 0.605 g |
| Glicina        | 2.98 g  |
| SDS            | 0.2 g   |
| Agua destilada | 200 mL  |

**9.4.** Solución digestora.

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Tris 0.5 M, pH 6.8 | 4.375 mL |
| SDS                | 1 g      |
| Glicerol           | 0.5 mL   |
| 2 – Mercaptoetanol | 0.125 mL |
| Azul de Bromofenol | 0.05 g   |



**9.5.** Solución madre para tinción de proteínas.

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Azul de coomassie R-250 | 2 g    |
| Agua destilada          | 200 mL |

**9.6.** Solución para la tinción de proteínas, coomassie R-250.

|                |        |
|----------------|--------|
| Solución madre | 25 mL  |
| Metanol        | 100 mL |
| Ácido acético  | 20 mL  |
| Agua destilada | 55 mL  |

**9.7.** Solución desteñidora I para gel

|                  |        |
|------------------|--------|
| Metanol absoluto | 250 mL |
| Ácido acético    | 50 mL  |
| Agua destilada   | 200 mL |

**9.8.** Solución desteñidora II para gel

|                  |        |
|------------------|--------|
| Metanol absoluto | 25 mL  |
| Ácido acético    | 35 mL  |
| Agua destilada   | 440 mL |

---

Para poder realizar el primo aislamiento de las cepas de *B. bronchiseptica* se utilizó agar Mac Conkey Quimitra S. A. de C.V., posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias para lo cual fue necesario utilizar los siguientes reactivos: Cristal violeta MERCK, Lugol, Alcohol-acetona, Safranina, Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), p-tetrametilfenilendiamina SIGMA al 1%. La motilidad de las cepas aisladas se determinó por medio de la técnica de gota suspendida y el medio Motilidad Gi ½ ANALYTAB.

También se utilizó el sistema API 20E<sup>BIOMERIEUX</sup> para la determinación de las pruebas secundarias en las cepas aisladas de bovinos y su interpretación se llevó a cabo utilizando reactivos como: Hidróxido de potasio (KOH) y alfa naftol, esto para determinar la prueba de VP, en la lectura de la prueba de Nitratos (NO<sub>3</sub>) se utilizó, alfa naftilamina y ácido sulfanílico, la producción de Indol se detectó por medio del reactivo de Kovac MERCK

Así mismo se determinó la fermentación de algunos carbohidratos los cuales fueron, D-glucosa SIGMA, Manosa SIGMA, Inositol SIGMA, D-sorbitol SIGMA, Ramnosa SIGMA. Después de haber caracterizado cada una de las cepas aisladas se realizó el procedimiento adecuado para su conservación empleando suero fetal bovino (SFB) BIBCO y agar infusión cerebro-corazón BIOXON (BHI). Del mismo modo se utilizaron sensidiscos impregnados de ciertos antibióticos a ciertas concentraciones los cuales se enlistan a continuación: Penicilina 2 U OXOID, Vancomicina 5 µg OXOID, Kanamicina 1000 µg OXOID, Rifampicina 15 µg OXOID, Eritromicina 60 µg OXOID, Colistina 10 µg OXOID, Tetraciclina 30 µg BIU.RAD, Nitrofurantoína 300 µg BIU.RAD, Ampicilina 10 µg BIU.RAD, Dicloxacilina 1 µg BIU.RAD y Amikacina 30 µg BIU.RAD.

Para la determinación de la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se utilizaron los siguientes reactivos, Glicina SIGMA, Lauril Sulfato de Sodio, Trizma base SIGMA, Bis – acrilamida SIGMA, Acrilamida MERCK, TEMED SIGMA y Persulfato de amonio SIGMA

El tipo de hemolisis desarrollado por cada cepa fue observado en agar sangre, para lo cual fue necesario realizar la preparación del medio agar sangre, utilizando Base de agar sangre BIOXON, posteriormente la sangre fue colocada en una concentración del 5 %.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

Ackermann, M. R., Register, K. B., Gentry, C., 1997. A porcine model for the evaluation of virulence of *Bordetella Bronchiseptica*. J. Comp. Path; 116: 55-61.

Aguilar, G. V., 2004. Reacciones de aglutinación. Gac Méd Méx; 140(3): 50-52.

Andrews, A. H., 2000. Sanidad del ganado vacuno lechero. Acribia S. A., España. Pág. 8-16.

Angus, J. C., Jans, S. S., y Hirsh, D. C. 1997. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). JAVMA 210 (I): 55-58.

Azechi, H., Koyoma, N. and Terakaro, N., 1973 Sensitivity in vitro to bacterial drugs of *Bordetella bronchiseptica* isolated from swine. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 26: 75-79.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, V. J., Tripp R. A., 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annual Review of Immunology; 18(1): 767-811.

Bárceñas, M. G., 1993. Tesis de Maestría. Comparación de la respuesta inmune humoral de cerdos inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* y la desarrollada en casos clínicos de rinitis atrófica porcina. FESC – C1 UNAM: 1-18.

Bailey y Scott., 2002. Diagnóstico microbiológico. 11ed. Panamericana, Buenos Aires. Pág. 425-436.

Bassinat, L., Gueirard, P., Maitre, B., Houssent, B., Gounon, P., Guiso, N., 2000. Role de adhesions and toxins in invasion of human tracheal epithelial cell by *Bordetella pertussis*. Infect. Immun; 68(4): 1934-1941.

Bauwens, J. E., Spach, D. H., Schacker, T. W., Mustafa, M. M., Bowden, R. A., 1992. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. J Clin Microbiol; 30(9):2474-2475.

Bemis, D. A., y Wilson, S. A., 1985. Influence of potential virulence determinants on *Bordetella bronchiseptica*-induced ciliostasis. Infect Immun; 50(1): 35-42.

Biberstein, L. E., Chung, Y., 1994. Tratado de Microbiología Veterinaria. 2ed. Acribia S.A., España Pág. 215-218.

Bock, A. G., 2001 The bygas two-component system of *Bordetella spp.*: a versatile modulador of virulence gene expression. International Journal of Medical Microbiology: 291 (2): 119-130.

Brad Fenwick, Comunicación personal.

- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *analytical biochem*; 72: 248-254.
- Brickman, T. J. y Armstrong, S. K., 2002. Alcaligin siderophore production by *Bordetella bronchiseptica* strain RB50 is not repressed by the bvgAs virulence control system. *J. Bacteriol*; 184(24): 7055-7057.
- Brockmeier, S. L., Register, K. B., 2007. Expression of the dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.*; 125 (3-4):284-9.
- Cassiday, P. Sauden, G., Heurelman, K., Mooi, F., Kristine, M. Bisgard, y Popovic, T., 2000. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States 1935-1999. *J. Infect. Dis.* 182: 1402-1408.
- Carbone, M., Pennisi, M. G., Masucci, M., De Sarro, A., Giannone, M., Fera M. T., 2001. Activity and postantibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin against feline *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Veterinary Microbiology*; 81:79-84.
- Carter, G. R., 1994 *Bacteriología y micología veterinarias aspectos esenciales*. Ed. El manual Moderno S.A de C.V, México D. F. Pág. 341-345.
- Castillo, S. J. I., 1992 Tesis de Licenciatura. Efecto de la toxina de *Bordetella bronchiseptica* sobre la remoción de *Pasteurella multocida* en pulmón y cornetes de ratón. FESC – C1 UNAM. Pág. 4-15.
- Chang, K. C., Zankein, R. M., Cho, C. T. Montgomery, J. C., 1975 Posttraumatic purulent meningitis due to *Bordetella bronchiseptica* *J. Pediatr.* 86: 639-640.
- Charles, A. J., Ruslan, M., 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*; 20: 197-216.
- Cherry, J. D., Gornbein, J., Heininger, U., Stehr, K., 1998. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* 16: 1901-1906.
- Chong, M. J. C., 1994. Tesis de licenciatura. Efecto de la inmunización activa o pasiva sobre la replicación de *Bordetella bronchiseptica* en el pulmón del ratón. FESC – C1 UNAM. Pág. 7-17.
- Collings, L. A., y Rutter, J. M., 1985. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract. *J. Med. Microbiol.* 19: 247-258.
- Cotera, G., Atilano, D., Montaraz, S. P. y Montaraz, J. A., 1990. Patrones electroforéticos de diferentes cepas de *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Méx.* 4: 403-407.

---

Cowan, S. T., 1974. Cowan and stells manual for the identification of medical bacteria, 2ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Deeb, B. J., DiGiacomo, R. F., Bernard, B. L. y Silbernagel, S. M., 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. J Clin Microbiol. 28(1):70-5.

Dworkin, M. S., Sullivan, P. S., Buskin, S. E., Harrington, R. D., Olliffe, J., MacArthur, R. D., Lopez, C. E., 1999. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. Clin Infect Dis.;28(5):1095-1099.

El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: role of acylation and identification of the main integrin interaction domain. J Biol Chem.

Farrington, D. O., and Switzer, 1977. Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170: 34-35.

Frost, B. M., M. E. Valiant, B. Weissberger, and E. L. Dulaney. 1976. Antibacterial activity of efrotomycin. Jpn. J. Antibiot. 29:1083-1091.

Fuchslocher, B., Millar, L. L., Cotter, P. A., 2003. Comparison of *bipA*, alleles within and across *Bordetella species*. Infect Immun; 71(6): 3043- 3052.

Füzi, M., 1973 Selective isolation of *Bordetella bronchiseptica*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig 231: 466-470.

Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, L. S., Adorini L, Gubler, U., *et al.* 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. Annu Rev Immunol; 16: 495-521.

Gerlacha, G., Von Wintzingerodeb, F., Middendorfa, B., Grossa, R., 2001 Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. Microb Infect.; 3: 61-72.

Gonzalez, A. G., 2007. Comprendiendo la neumonia bovina producida por *Manheimia (Pasteurella) Hemolitica* Virbac. Al día 2-5.

Good, R. C., y May, B. D., 1971. Respiratory pathogens in monkeys. Infect. Immun. 3: 87-93.

Goodnow, R.A., 1980 Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Reviews 44, 722-738.

Gueirard, P., Weber, C., Le Coustumier, A., Guiso, N., 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. Journal of Clinical Microbiology, 33(8): 2002-2006.

Gyles, L. C., 2004. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3ed Blackwell Publishing USA Pág.259-267.

Harris, D. L., y Switzer, W. P., 1968. Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and combined inoculums. Am. J. Vet. Res. 29: 777-785.

Harris, D. L., y Switzer, W. P., 1972. Immunization of pigs against *Bordetella bronchiseptica* infection by parenteral vaccination. Am. J. Vet. Res. 33: 1975-1984.

Harvill, E. T., Preston, A., Allen, A. G., Maskell, D. J., Miller, J. F., 2000. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. Infect Immun; 68(12): 6720-6728.

Henderson, I. R., Nataro, P. J., 2001; Virulence functions of autotransporter proteins. Infection and Immunity; 69(3):1231-1243.

Hewlett, E., 1997. Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. Pediatr. Infect. Dis. 16:578-584.

Hitoshi, Ishikawa y Yasuro Isayama., 1986. *Bordetella bronchiseptica* phase Journal of Clinical Microbiology: 235-239.

Huebner, S. E., Christman, B., Dummer, S., Tang, Yei-We and Goodman, S. 2006. Hospital-acquired *Bordetella bronchiseptica*. Infection following hematopoietic stem cell transplantation. J. Clin. Microbiol. 44(7): 2581-2583.

Janda, M. J. y Abbott, S. L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pulses, perils, and pitfalls. J. Clin. Microbiol; 45(9): 2761-2764.

Jenkins, E. M., 1978. An agglutination test for the detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. Can. J. Comp. Med. 42: 286-292.

Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. 2005. T. Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica* J Antimicrob Chemother. 56(3):485-490.

Kang, B. K., Koshimizu, K., Ogata, M., 1970. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. Agglutination test on *Bordetella bronchiseptica* infection. Jpn J Vet Sci 32: 295-306.

Katzenstein, D. A., LeFran, C. M., Colin, J., 1984. *Bordetella bronchiseptica* bacteremia. The Western Journal of Medicine: 96-98.

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

- Koneman, E. W., Ailen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. y Winn, W. C., 2001. Diagnóstico microbiológico texto y atlas color. 6ed. Medica Panamericana., Buenos Aires. Pág. 416-423
- Labaw, L. W., y Mosley V. M, 1955. Periodic structure in the flagella of *Bordetella bronchiseptica*. Biochim. Biophys. Acta 17: 322-324.
- Lacey, B. W., 1953. Three-dimensional patterns of antigenic modulation of *Haemophilus pertussis*, *H. parapertussis* and *H. bronchisepticus*. J. Gen. Microbiol; 8:iii-iv.
- Lee, S. W., Way, A. W., Osen, E. G., 1986. Purification and subunit heterogeneity of pili of *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun;51 (2):586-593.
- Lehninger, A., 1993. Principles of Biochemistry. 2ed. Worth Publishers.
- Leslie, P. H., y A. D. Gardner., 1931. The phases of *Haemophilus pertussis*. J. Hyg. 31: 423-434.
- Letcher, J., Weisenberg, E., Jonas, A., 1993. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a koala. J Am Vet Med Assoc; 202 (6):985-987.
- López, D. Ma. E., 1993. Tesis de Licenciatura. Interacción entre *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* en la rinitis atrófica empleando un modelo experimental de infección por aerosoles en ratón. FESC – C1 UNAM Pág. 9-11.
- Lorenzo-Pajuelo, B., Villanueva, J. L., Rodriguez, C. J., Vergara, I. N., Bernabeu, W. M., García, C. A., et al., 2002. Cavitory pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing reduced amounts of pertactin and other major antigens. J Clin Microbiol 40(9): 3146–3154.
- Mc Gowan, J., 1911. Some observations on a laboratory epidemic principally among dogs and cats in witch the animals affectes presents the symptoms of the disease called “distemper”. J. Pathol. Bacteriol. 15: 372-426.
- Madigan, M. T, Martinko, J. M, y Parker, J., 2003. Brock Biology of microorganism. 10ed. Prentice Hall, E.U.A.
- Magyar, T., Semjén, G., 1985. A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* responsible for adherence. Acta Vet Hung 33(3-4) 129-136.
- Martineau, G. P., Broes, A., Jong de, M. F., Martineau, R., B., 1982. Experimental reproduction of atrophic rhinitis with *Pasteurella multocida* on gnotobiotic and convectional piglets. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congress. México, City. 88.
- Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Katahira, J., Horiguchi, V., 2002. Identification of a receptor binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin. Infect Immun; 70(7): 3427-3432.



---

Mattoo, S., Foreman, W. A. K., Cotter, P. A., Miller, J. F., 2001. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci* 6:168-186.

Mattoo, S., Miller, J. F., Cotter, P. A., 2000. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun*; 68 (4): 2004-2033.

McClenahan, D., Hellenbrand, K., Atapattu, D., Aulik, N., Carlton, D., Kapur, A., Czuprynski, C., 2008. Effects of lipopolysaccharide and *Mannheimia haemolytica* leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(2):338-47.

McMillan, D. J., Shojaei, M., Chhatwal, G. S., Guzmán, C. A. y. Walker, M. J., 1996. Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbial Pathogenesis* 21: 379-394.

McMillan, D. J., Shojaei, M., Chhatwal G. S., Guzmán, C. A. y. Walker, M. J., 1999. Expression of urease does not affect the ability of *Bordetella bronchiseptica* to colonise and persist in the murine respiratory tract *FEMS Microbiology Letters* 178: 7-11.

Mengellers, M. J., Van Klingerren, B., Van Miert, A. S., 1990. In vitro susceptibility of some porcine respiratory tract pathogens to aditoprim, trimethoprim, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, and combinations of these agents. *Am J Vet Res*. 51 (11):1860 -1864.

Mobley, H. y. Hausinger, T., 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev.*; 53(1):85-108.

Molina, G. G., 2001. Tesis de Maestría. Aislamiento y caracterización de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan; Universidad Nacional Autónoma de México.

Molina, G. G., Rosales, Ma. E., Barcenas, M. G., Montaraz, C. J. A. 2006. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. *Vet. Med.* 37: 313-324.

Montaraz, J. A., Novontny, P. y Yuanyi, J., 1985. Identification of 68- kilodalton protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 47: 744-751.

Mooi, F. R., Van Oirschot, H., Heuvelman, K., Van Der Heide, HG. J., Gaastra, W. y Willwms, R. J. L., 1998. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors p. 69/prtactin and pertussis toxin in the Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine- driven evolution. *Infect. Immun.* 66: 670-675.

Mooi, F. R, Hallander, H., Wirsing von Koing, C. H., Hoct, B, y Guiso N., 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertusis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*; 19: 174-181.

- Nakase, Y., 1957a. Studies on *Haemophilus bronchisepticus*. I. The antigenic structures of *Haemophilus bronchisepticus* from ginea pig. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 30: 57-72.
- Nakase, Y., 1957b. Studies on *Haemophilus bronchisepticus*. II phase variation of *Haemophilus bronchisepticus*. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 30: 73-77.
- Nelson, David R.; Lehninger, Albert L; Cox, Michael, 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman. Pág. 148.
- Neumann, A. L., 1989. Ganado vacuno para producción de carne. Limusa, México. Pág. 818-821.
- Nicolet. J., 1986. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Acribia S.A, Zaragoza España. Pág. 90-95.
- Novotny, P., Chubb, A. P., Cownley, K. y Montaraz, J. A., 1985. Adenylate cyclase activity of a 68,000 –molecular- weight protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 50: 199-206.
- Papasian, C. J., Downs N. J, Talley R. L, Romberger D. J. y Hodges G. R., 1987. *Bordetella bronchiseptica* bronchitis. *J Clin Microbiol*; 25(3):575-577.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A, Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., et al., 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics*; advance online publication: 1 – 9.
- Pittman, M., 1974. Genus *Bordetella* Moreno-López 1952, 282-283. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Plotkin, B. J., Bemis, A., 1998. Carbon source utilization by *Bordetella bronchiseptica*. *J. Med Microbiol*; 47(9):761-765.
- Porter, J. F., Wardlaw, A. C., 1993. Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett* 110:33-36.
- Prescott, J. F., Gannon, V. P., Kittler, G., Hlywka, G., 1984. Antimicrobial drug susceptibility of bacteria isolated from disease processes in cattle, horses, dogs and cats. *Can Vet J.* 25(7):289-292.
- Quinn, P. J., Carter, M.E. 1994 *Clinical veterinary microbiology*. wolfe, España. Pág. 289-290.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., 2003 *Elementos de microbiología veterinaria*. Acribia S.A. Zaragoza España Pág. 97-98.

---

Rambow, A. A., Fernandez, R. C., Weiss, A. A., 1998. Characterization of brkA expression in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun*; 66(8): 3978-3980.

Rath, B. A., Register, K. B., Sokol, D. M., y Van Dyke, R. B., 2008. Persistent *Bordetella bronchiseptica* pneumonia an immunocompetent infant and genetic comparison of clinical isolates with kennel cough vaccine strain. *Clin. Infect. Dis.* 46(6):905-908.

Register, K. B., 2001. Novel genetic and phenotypic heterogeneity in *Bordetella bronchiseptica* pertactin. *Infect. Immun*; 69(3): 1917.

Register, K. B., Brockmeie, S. L., 2007. Expression of the dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida* *Veterinary Microbiology* 125: 284-289.

Rice, J. A., Carrasco, M., Hoodgins, D. C., Shewen, P. E., 2007. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*; 8: 117-128.

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

Risso, A., 2000. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol*; 68: 785-792.

Roop II, R. M., Veit, H. P., Sinsky, K. J., Hewlett, E. L., 1987. Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonie in experimentally infected neonatal swins. *Infect. Immun.* 55 (1) 217 -222.

Rougier, S., Galland, D., Boucher, S., Boussarie, D., Vallé, M., 2006. Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. *Vet Microbiol.* 15; 115 (1-3):192-8.

Ryan, M., Mc Carthy, L., Rappuoli, R., Mahon, B. P., Mills, K. H. G., 2003. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co- injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol*; 10(4):651-662.

Skelly, B. J., Pruss, M., Pellegrino, R., Andersen, D. y Abruzzo, G., 1980. Variation in degree of atrophic rhinitis with field isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Proceed. Int. Pig. Vet. Soc. Congress. Copenhagen.* Pág. 210.

Songer, G. J., Post, W. K., 2005. *Veterinary microbiology bacterial and fungal agents of animal disease.* Elsevier Saunders. China. 147-153.

Speakman, A. J., Dawson, S., Binns, S. H., Hart, C. A., Gaskell, R. M., 1997. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. *Vet. Microbiol.* 54: 63-72.

---

Speakman, A. J., Dawson, S., Corkill, J. E., Binns, S. H., Hart, C. A., Gaskell, R. M., 2000. Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Vet Microbiol*; 71(3-4):193-200.

Stefanelli, P., Mastrantonio, P., Hausman, S. Z., Giuliano, M., Burns, D., 1997. Molecular characterization of two *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from children with cough. *Journal of clinical Microbiology*, 1550–1555.

Stockbauer, K. E., Fuchslocher, B., Miller, J. F. y Cotter, P. A., 2001. Identification and characterization of *bipA*, a *Bordetella bvg*-intermediate phase protein. *Mol Microbiol*; 39(1): 65-78.

Switzer, W. P., y Farrington, D. O., 1975. Infectious atrophic rhinitis. In H. W. Dunne and Leman, A. D., (ed.), *Diseases of swine*, 4th ed. Iowa State University Press, Ames Pág. 687–711.

Trigo, F. J., 1987. El complejo respiratorio de los bovinos y ovinos. Departamento de patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM Pág. 2-37.

Ulrich, J. A., y Needham, G. M., 1953. Differentiation of *Alacliigenes faecalis* from *Brucella bronchiseptica* by biochemical and nutritional methods. *J. Bacteriol.* 66: 210-215.

Valencia, M. E, Martín C. L., López, M., Soriano, V., Moreno, V., González, L. J., 2004. Motivo de ingreso hospitalario en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad. *Med Clin (Barc)*; 119:293-295.

Van Loo, I. H. M., Van Der Heide, H. G. J., Nagelkerke, N. J. D., Verhoef, J. y Moii, F. R., 1999. Temporal trends in the population structure of *Bordetella pertussis* during 1949-1996 in a highly vaccinated population. *J Infect. Dis.* 179:915-923.

Welsh, R. D., 1996. *Bordetella bronchiseptica* infections in cats. *J. Am Anim Hosp Assoc.*; 32(2):153-8.

Wilkins, R. J., y Helland, D. R., 1973 Antibacterial sensitives of bacteria isolated from dogs with tracheobronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 162: 47-50.

Wilson, M. P., y Miles, G., 1946. *Bordetella bronchiseptica* a reassessment of its role in canine respiratory disease. *Vet. Rec.* 93: 486-487.

Winstanley, C., Hales, B. A., Sibanda, L. M., Dawson, S., Gaskell, R. M., Hart, C. A., 2000. Detection of type II secretion system genes in animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Mol. Microbiol*; 72: 329-337.

Wollfrey, B. F., Moody, J. A., 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol. Rev* 4, 243-255.

Yasuhiko, Irie. y Ming, H. Yuk., 2007. In vivo colonization profile study of *Bordetella bronchiseptica* in the nasal cavity. Department of Microbiology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA Pág 191 - 198.

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