



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Comparación molecular de cepas de *Bordetella
bronchiseptica* aisladas del perro y del hombre**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA

María Graciela Molina González

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

COMITÉ TUTORAL

Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dra. Gabriela Barcenás Morales
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Cuautitlán Izcalli, Edo. Mex. Noviembre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Reconocimiento al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo por el apoyo para mi ingreso al programa de doctorado y los materiales para ejecutarlo.

Al comité tutorial, Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz y Dra. Gabriela Bárcenas Morales, por sus sugerencias e interés en asistir a los seminarios de avance durante el desarrollo del trabajo.

Mención especial al Dr. De la Torre por su desinteresado apoyo en la realización del trabajo experimental e iniciarme en el mundo de las técnicas de biología molecular. No es fácil encontrar investigadores que ofrezcan recursos y un laboratorio completo a un estudiante.

Agradezco a los sinodales; Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Rafael Camacho, Dra. Susana Elvira Mendoza y Dra. María Eugenia Torres Márquez cuyas observaciones y ejemplos ayudaron reforzar el escrito de tesis y al crecimiento personal.

Gracias Dra. Alcántar Curiel María Dolores y QFB Jarillo Quijada María Dolores por asesoría y facilitar los materiales y equipo para la elaboración de la Electroforesis en Campos Pulsados. Unidad de Medicina Experimental. Coordinación de Investigación. Facultad de Medicina. UNAM.

Integrantes del laboratorio de Bioquímica Molecular de UBIPROFESI UNAM por su apoyo al compartir su conocimiento en el análisis bioinformático en particular a los Dres. Jorge Campos y Eduardo Urrutia, M. en C. Alejandro Monsalvo Reyes.

Eduardo Urrutia y Alejandro Monsalvo del equipo de quimeras, gracias por el rescate y mostrarme que las cosas para mañana ya es tarde. Mención en exclusiva para Alejandro quién siempre fue un estímulo en lo personal y académico. Es un privilegio contar contigo.

MVZtas. en particular al Coordinador de Atención Canina de Ecatepec MVZ José Luis Trejo Cesario, gracias por permitir la toma de muestras. Su franca disposición permitió un ambiente agradable a la hora del muestreo.

Licenciado en Ciencias de la Comunicación Erick Bernardo Suaste Molina gracias por la revisión del escrito.

Profesores compañeros de la planta docente de los Módulos de Metodología Científica I, II y III de la FES-I por sus tiempos y atenciones.

Gracias por las atenciones durante el doctorado a los integrantes de la Unidad de Posgrado Campo 1 y 4, profesores y amigos.

Todo mi reconocimiento y gratitud a una persona que tomo las riendas del trabajo sin más interés que el de que obtuviera el grado. Gracias amiga y maestra Dra. María Eugenia Torres Marquez, sin tu apoyo todavía estaría en el naufragio. Aprendí de ti con el ejemplo el rigor científico, la objetividad, la firmeza en las decisiones, la rebeldía con argumentación y muchas otras cosas que ni mi cabeza y papel alcanzarían para describir.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en particular a la FES-I y FES-Cuautitlán por los permisos otorgados. El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) con el proyecto IN2003 10-3. Y el Programa Para la Superación Académica (PASPA).

Al Comité de Becas del COMECYT por el estímulo económico (12BTD0026) para titulación en la convocatoria Becas Tesis de Posgrado 2011.

DEDICATORIAS

A mi hijo Erick B. S Molina, es un gusto compartir los momentos académicos y los no tanto.

Vicente y Arturo Sánchez Morales, su ejemplo, compromiso y enseñanzas permitieron que culminara una vida académica satisfactoria. Me congratulo de formar parte de sus amistades.

Amigas las quiero por su calidad humana y compromiso de amistad para conmigo. Ustedes saben quiénes son.

A mi familia mamá, hermanos y sobrinos, gracias por su atención.

Los caídos en el camino †

A los hombres de mi vida

ÍNDICE	5
Índice de cuadros y figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
1 Introducción	10
1.1 Marco Teórico	11
1.1.1 Generalidades sobre el género <i>Bordetella</i>	11
1.1.2 Ubicación taxonómica de <i>Brdetella bronchiseptica</i>	12
1.1.3 Característica metabólicas de <i>B. bronchiseptica</i>	12
1.1.3.1 Requerimientos fisicoquímicos de la bacteria	13
1.1.4. Identificación de <i>B. bronchiseptica</i>	13
1.1.4.1 Identificación por PCR	14
1.1.4.1.1 Identificación por ARNr 16S	14
1.1.5 Factores de Virulencia	14
1.1.6 Patogénesis	15
1.1.6.1 Infecciones por <i>B. bronchiseptica</i>	15
1.1.6.2 Traqueobronquitis Infecciosa Canina	15
1.1.6.3 Infecciones respiratorias de <i>B. bronchiseptica</i> en humanos	15
1.1.7 Caracterización molecular del género <i>Bordetella</i>	16
2. Justificación	18
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	19
4.1 Objetivos particulares	19
5. Materiales y métodos	20
5.1 Población muestreada	20
5.2 Toma de muestras y aislamiento de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	20
5.3 Identificación de <i>B. bonchiseptica</i>	20
5.3.1 Cepas bacterianas	20
5.3.2 Pruebas bioquímicas	21
5.3.2 Identificación por análisis comparativo de la secuencias de ARNr 16S	22
5.3.3.1 Preparación del ADN para el análisis de ARNr 16S	22
5.3.3.2 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación por ARNr 16S	23

5.3.3.3 Análisis comparativo de las secuencias	23
5.4 Almacenamiento de las cepas	23
5.5 Análisis molecular de las cepas	23
5.5.1.1 Preparación del ADN para la electroforesis en campos pulsados	24
5.6.1. Análisis de los datos de la electroforesis en campos pulsados	24
6. Resultados	25
6.1 Muestreo e Identificación de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	25
6.1.1 Muestreo y aislamientos	25
6.1.2 Identificación de cepas de <i>D. bronchiseptica</i> por pruebas bioquímicas	25
6.1.3 Identificación de las cepas por análisis comparativo de la secuencia de ARNr16S	26
6.2 Patrón electroforesis en campos pulsados	30
7. Discusión	35
7.1 Muestreo y aislamiento de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	35
7.2 Identificación de las cepas aisladas	38
7.3 Patrón de electroforesis en campos pulsados	43
8. Conclusiones	46
9. Literatura citada	47

Índice de Cuadros

Cuadro	Título	Página
1	Cepas de <i>B. bronchiseptica</i> utilizadas	21
2	Número total de muestras trabajadas por población	25
3	Características bioquímicas de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	26
4	Número de acceso al GenBank de secuencias de rDNA 16S de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas de perro	29
5	Número de acceso al GenBank de secuencias de rDNA 16S de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas de perro y una de humano	30
6	Patrones de PFGE de <i>B. bronchiseptica</i> digerida con XbaI	32
7	Aislamientos de <i>B. bronchiseptica</i> en humanos en comparación con el trabajo actual	38

Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1	Carta de color auxiliar en la interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas del estuche BBL Crystal (casa comercial)	22
2	Producto de PCR de iniciadores rDNA 16S en gel de agarosa 1% de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	27
3	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de cepas de <i>B. bronchiseptica</i> con los iniciadores rDNA 16S	27
4	Producto de PCR de iniciadores rDNA 16S en gel de agarosa 1% de cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	28
5	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de cepas de <i>B. bronchiseptica</i> con los iniciadores de rARN 16S	28
6	Patrón de electroforesis en campos pulsados de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas de perro	31
7	Patrón de electroforesis en campos pulsados de cepas de <i>B. bronchiseptica</i> aisladas de perro	31
8	Representación esquemática de patrones de PFGE y dendograma de XbaI de <i>B. bronchiseptica</i> elaborado con NTSYSpc versión 2.02.	33
9	Dendograma de patrones de PFGE generados por digestión con XbaI de cepas de <i>B. bronchiseptica</i> , realizada de acuerdo NTSYSpc versión 2.02	34
10	Esquema para la identificación de <i>D. pertussis</i> , de acuerdo al laboratorio de IRAs bacterianas en el INDR.	39

Abreviaturas

American Tipe Culture Colection	(ATCC)
Ácido Dexosiribonucleico Subunidad 16	(rDNA 16S)
Ácido Ribonucleico Ribosomal Subunidad 16	(ARNr 16S)
Ácido Ribonucleico	(RNA)
Ácido Desociribonucleico	(DNA)
Banco de genes	(GenBank)
Basic Local Aligment Seare	(BLAST)
<i>Bordetella bronchiseptica</i> de origen porcino	(LBF)
Caldo Infusión Cerebro Corazón	(BHI)
Carbohidratos	(CHO's)
Centro de control canino	(CCC)
Desoxiadeno sına trifosfato	(dATP)
Deoxicitidina trifosfato	(dCTP)
Deoxiguanosina trifosfato	(dGTP)
Desoxitimidina Trifosfato	(dTTP)
Electroforesis en campos pulsados	(PFGE)
Enzimas de restricción	(REA)
Equipo Crystal método de identificación miniaturizado	(BBL Crystal)
Escuela de Entrenamiento Canino	(EEC)
Espaciador transcrito intergénico	(ITS)
Guanina – Citosina	(GC)
Hemaglutinina Filamentosa	(FHA)
Hospital General de México	(HGM)
Infecciones Respiratorias Agudas	(IRA's)
Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica	(InDRE)
Kilobases	(Kb)
Kilodalton	kDa
Luz ultravioleta	(UV)
Nanogramos	(ng)
National Center for Biotechnology Information	(NCBI)
Reacción en Cadena de la Polimerasa	(PCR)
Pares de bases	(pb)
Perrus Callejeros	(PC)
Primer universal corriente abajo	(3'-5'RD1)
Primer universal corriente arriba	(5'-3'FD1)
Pertactina	(PRN)
Polimorfismo de DNA al Azar	(RAPD)
Proteína de Resistencia al Suero	(BrK)
Rinitis Atrófica	(RA)
Revoluciones por minuto	(rpm)
Solución Salina Fisiológica	(SSF)
Traqueobronquitis Infecciosa Canina	(TBIC)
Unidades Formadoras de Colonia	(UFC)
Virus de inmunodeficiencia humana	(VHI)

Resumen

Bordetella bronchiseptica es un agente causal de la Traqueobronquitis Infecciosa Canina (tos de las perreras). Los casos de infección en humanos son poco frecuentes y la mayoría de los reportes de aislamiento de la bacteria provienen de personas con un estado debilitante. Se desconoce la prevalencia o persistencia de la bacteria en este tipo de población, así como el origen de la misma. En este sentido, el presente trabajo pretende contribuir a establecer una posible infección cruzada entre el perro y el hombre a través de la comparación molecular de cepas de *B. bronchiseptica* en las siguientes poblaciones: 1) perros caseros, 2) perros callejeros, 3) personas sanas y, 4) pacientes del Hospital General de México. Se obtuvieron 62 exudados nasales de perros caseros y se lograron 5 aislamientos; 6 aislamientos se consiguieron a partir de 428 muestras de perros de Centros de Control Canino. Se encontró 1 aislamiento de la bacteria en muestra de una persona con VIH positivo. La identificación se basó en características morfológicas y bioquímicas. La taxonomía se confirmó mediante la secuenciación parcial del gen 16S rDNA. Las secuencias del gen del 16S rDNA de once cepas presentaron 98-99% de homología con cepas *B. bronchiseptica* registradas en el GenBank (NCBI), mismas que están depositadas. El patrón de restricción en PFGE incluyó 3 tipos principales (A, B y C), 6 subtipos de A que difieren en menos de 3 bandas (A1 – A6), el tipo B y subtipo B1 difieren del tipo A por 4 bandas, el tipo C y subtipos (C1-C7) difiere del tipo A en 6 o más bandas. La mayoría de las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perro presentan el patrón tipo A (57%). Es importante señalar que la cepa de *B. bronchiseptica* aislada de humano (VIH6) tiene una relación cercana con las cepas aisladas de perros, incluidas las obtenidas de perros caseros.

Palabras clave: *Bordetella bronchiseptica*, 16S rDNA, perros, PFGE.

1.0 Introducción

El género *Bordetella* consta de 9 especies, tres especies del género son ampliamente reconocidas como agentes causales de enfermedades respiratorias en mamíferos; *B. pertussis*, *B. parvaptusis* y *B. bronchiseptica*. Hasta ahora se considera que las dos primeras causan enfermedad en humanos y *B. bronchiseptica* en varios mamíferos (Goodnow, 1984; Larch, 2009).

Las infecciones naturales más importantes y mejor descritas son las ocasionadas en perros y cerdos. En cerdos, por ejemplo, es agente causal de la Rinitis Atrófica (AR) que es una enfermedad caracterizada por descarga nasal purulenta, desviación del cornete nasal y reducción del crecimiento. Se presenta principalmente en lechones menores de 8 semanas. En pocos casos los animales se recuperan (Collings y Rutter, 1985).

La Traqueobronquitis Infecciosa Canina (TBIC) también conocida como tos de las perreras es una enfermedad altamente contagiosa. La enfermedad leve o severa, se caracteriza por una tos paroxística seca o mucoide, acompañada por descarga ocular y nasal. La enfermedad dura de una a tres semanas y la muerte por neumonía no es frecuente (Keil y Fenwik, 1998).

En 1991, Wolfrey y Moody realizaron una revisión de enfermedades humanas relacionadas con *B. bronchiseptica*. A partir de esta fecha se han publicado otros reportes de casos, en los que se coincide que la enfermedad ocasionada por *B. bronchiseptica* en humanos inmunocomprometidos es neumonía. Otras manifestaciones incluyen sinusitis y bronquitis. Niños comúnmente expuestos a animales de granja o mascotas presentan síntomas parecidos a los ocasionados por *B. pertussis* (Ner et al., 2003).

La mayoría de los trabajos sobre el aislamiento de *B. bronchiseptica* en perros se han llevado a cabo en poblaciones confinadas, como escuelas de entrenamiento canino, criaderos, pensiones y alber-

gues, (Bemis et al., 1977; Azetaka y Konishi, 1989). En el caso particular del aislamiento de la bacteria en poblaciones abiertas y aquellas que conviven con sus dueños en estrecha relación no existen reportes. El conocer la existencia de *B. bronchiseptica* en estas poblaciones podría ser de utilidad para conocer si la bacteria puede estar presente en individuos sin una historia clínica de síntomas causadas por la bacteria, además de la transmisión entre animales con signología de la enfermedad.

Con respecto al aislamiento de *B. bronchiseptica* en personas en estado inmunocomprometido a pesar de que han ido en aumento (Ki-Bum et al., 2008; Ner et al., 2003). Los reportes son escasos y de clasos clínicos aislados, es decir, se desconoce la prevalencia o persistencia de la bacteria en este tipo de población, así como el origen de la misma.

Aunque la infección con *B. bronchiseptica* está asociada con aproximadamente 18 mamíferos, poco se conoce acerca de su epidemiología en la naturaleza (Switzer et al., 1966; Ngom et al., 2006). La fuente primaria de infección se desconoce, y poco se conoce acerca de su transmisión intra e interespecie en la vida silvestre. La transmisión de animal a animal se da por contacto directo con secreciones respiratorias, fómites y dispersión por aerosoles.

Solo Gueirard et al. en 1995 evidenciaron la posible transmisión de la bacteria de un conejo a una anciana que presentaba un cuadro respiratorio de neumonía; éste estudio se basó en el análisis de electroforesis en campos pulsados (PFGE).

A pesar de que es lógico que el origen de la infección del humano con *B. bronchiseptica* sea el contacto con animales, esto no ha sido documentado. El proyecto original pretendía mostrar que las cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas de perros y personas eran las mismas.

1.1 Marco teórico

1.1.1 Generalidades sobre el género *Bordetella*

El género *Bordetella* consiste de 9 especies; *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. ansorpii* y *B. petrii*. Además, esta estrechamente relacionado con los géneros *Achromobacter* y *Alcaligenes*. Los estudios de Gerlach et al., 2001; Gerlach et al., 2004, ubican a *Achromobacter* como el género más cercano a *Bordetella*, y no a *Alcaligenes*. Sin embargo el análisis filogenético basado en rRNA 16S coloca a *Alcaligenes* como el ancestro del que se derivan *Achromobacter* y *Bordetella* (Sebahia et al., 2006).

Con base en las secuencia del rDNA 16S, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, y *B. holmesii* forman un grupo cercanamente relacionado separado de las otras cinco especies de *Bordetella*. *B. parapertussis* se ha aislado de humanos y ovejas. Estudios genéticos mostraron que los aislados de *B. parapertussis* a partir de humanos y ovejas pertenecen a linajes distintos, y actualmente se hace referencia a ellos como *B. parapertussis*_{HU} y *B. parapertussis*_{OV}, respectivamente (van der Zee et al., 1996; Diavatopoulos et al., 2005).

B. holmesii se describió en 1995 y se ha aislado de humanos y una fuente animal quizá se ha identificado (Weyant et al., 1995). El análisis comparativo de las secuencias de DNAr 16S y la secuencia de elementos de inserción específico de *B. pertussis* sugiere que *B. holmesii* está cercanamente relacionada con ésta especie (Reischl et al., 2001). Sin embargo, la secuencia de genes “housekeeping” o de mantenimiento, y el análisis de la composición de ácidos grasos sugieren que *B. holmesii* esta más cercanamente relacionada con *B. avium* que con *B. pertussis* (Gerlach et al., 2004). Esta incongruencia se debe quizá a que *B. holmesii* adquirió DNA de *B. pertussis* por transferencia horizontal (Diavatopoulos et al., 2006). Aunque *B. holmesii* se ha aislado a partir de sangre, fluido pleural y esputo de pacientes inmunocomprometidos, también se ha aislado de exudados nasofaríngeos de pacientes con

síntomas parecidos a tosferina (Yih et al., 1999). *B. trematum* se aisló de una herida y de infecciones de oído en humanos (Vandamme et al., 1996). Poco se conoce de los factores de virulencia de ésta especie.

B. bronchiseptica causa infecciones respiratorias en una gran variedad de mamíferos en los que se incluye ratones, ratas, cuervos, zorrillos, zarigüeya, conejos, mapaches, gatos, perros, hurones, lobos, cerdos, erizos, ovejas, koalas, leopardos, caballos y humanos (Goodnow, 1980). Sin embargo, las infecciones naturales más importantes y mejor descritas son las ocasionadas en perros y cerdos.

La filogenia derivada del análisis rDNA 16S muestra que existe una relación estrecha de *B. hinzii*, *B. avium*, y *B. trematuma* con *B. bronchiseptica*. *B. avium* causa enfermedades respiratorias en varias especies de aves (Kersters et al., 1984). También se han aislado organismos parecidos a *B. avium* de pacientes con otitis crónica media (Dorittke et al., 1995) y de un perro con endocarditis bacteriana (Ramirez et al., 2003).

B. hinzii se encontró en aves de corral y humanos (Vandamme et al., 1995). *B. hinzii* es un patógeno oportunista en humanos inmunocomprometidos y el aislamiento se ha obtenido a partir del tracto respiratorio, sangre y bilis. El análisis de genes reveló que cuenta con el gen que codifica para la toxina adenilato ciclasa hemolisina que se encuentra en *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* (Donato et al., 2005).

B. petrii se aisló de un cultivo anaeróbico en un bioreactor enriquecido con sedimentos de río (von Wintzingerode et al., 2001). Es el primer miembro del género *Bordetella* aislado del ambiente y capaz de crecer en condiciones anaeróbicas. También *B. petrii* se aisló tanto de un paciente con osteomielitis mandibular, como de pacientes con fibrosis quística (Fry et al., 2005; Moissenet et al., 2005).

11 Con respecto a *B. ansorpii*, solo existe una

publicación, la bacteria se aisló de un exudado purulento de un quiste epidérmico (Ko et al., 2005). La paciente estaba inmunodeprimida, pues estaba bajo quimioterapia. Debido a la estrecha proximidad de *B. ansorpii* con *B. petrii*, es posible que sea una bacteria ambiental.

La identificación de linajes de *Bordetella*, generados por la adquisición y pérdida de genes asociados con su principal nicho ecológico, así como la elucidación de tales cambios es relevante; pues contribuye al conocimiento de la evolución de los miembros patógenos del género *Bordetella* y su conocimiento.

1.1.2 Ubicación taxonómica de *B. bronchiseptica*

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia. Alcaligenacea

Género. *Bordetella*

Especie: *bronchiseptica*

1.1.3 Característica metabólicas de *B. bronchiseptica*

El estudio de la fisiología de las *Bordetellas* patógenas se centró en sus inicios en *B. pertussis* debido al interés en desarrollar medios simples para la producción de vacunas. Actualmente se conoce con mayor detalle la fisiología de las otras especies del género.

B. bronchiseptica tiene un metabolismo no fermentativo centrado en la oxidación de aminoácidos y los intermediarios del ácido cítrico. La incapacidad para oxidar carbohidratos ya se ha descrito (Proom, 1955). Los análisis in silico de secuencias de nucleótidos apoyan las osbervaciones experimentales que predicen la ausencia de un ciclo glicolítico. En todas la especies del género estan ausentes los genes que codifican para enzimas que realizan las reacciones de fosforilación dependientes de ATP durante

la glucólisis: la glucocinasa requerida para la fosforilación de la glucosa para producir glucosa-6-fosfato y la 6-fosfofructocinasa para convertir fructosa-6-fosfato a fructosa, 1,6-bifosfato.

Las especies de *Bordetella* llevan a cabo la gluconeogénesis a partir de piruvato o fosfoenolpiruvato (PEP) en la ruta anabólica para la producción de aminoazúcares, polisacáridos, aminoácidos aromáticos y la vía de las pentosas, a partir de los ácidos málico y oxálico (Armstrong and Gross, 2007). La vía de las pentosas es clave para precursores de carbohidratos como la ribosa que es componente de ácidos nucleicos, también es importante para la producción de eritrosa y la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducida (NADPH) que son necesarias para la producción de los aminoácidos aromáticos; fenilalanina, tirosina y triptofano y como donador de electrones en reacciones de biosíntesis de la célula, respectivamente.

El género *Bordetella* está agrupado en la familia *Alcaligenacea*. Los miembros de estas especies son cocobacilos Gram-negativos, estrictamente aerobios y no tienen metabolismo fermentativo. A pesar de la preferencia de la bacteria por condiciones microoxigénicas, la secuencia del genoma de *B. pertussis* reveló que se puede adaptar sin problema a condiciones de crecimiento aeróbico ya que cuenta con cinco grupos de genes que codifican para la citocromo c oxidasa (Kranz et al., 2002). La presencia de citocromo c oxidasa se confirma por la reacción oxidasa positiva de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*.

El contenido de GC de la bacteria esta entre 65 y 68 mol%, la temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C y aglutinan eritrocitos de una variedad de mamíferos. Todas las especies son catalasa positiva y utilizan el citrato como única fuente de carbono. Se puede distinguir una especie de otra por características fenotípicas, así como por su crecimiento en agar peptona libre de sangre, movilidad, actividad de ureasa

y reducción de nitratos (Gerlach et al., 2001).

En el caso particular de *Bordetella bronchiseptica* una de las características más sobresalientes es la falta de acción fermentativa sobre los carbohidratos. No produce indol, ni hidrógeno sulfurado. A diferencia de las otras especies del género, tiene la capacidad de reducir los nitratos, debido a que expresa una nitrato reductasa periplásmica funcional. Torrey y Rahe (1913) dividen las cepas de esta bacteria en dos grupos, teniendo en cuenta la reducción de los nitratos. Las cepas del grupo A no reducen los nitratos y las del grupo B los reducen a nitritos.

Por otra parte *B. bronchiseptica* posee actividad de ureasa muy acusada; crece en agar MacConkey en el que es fácil apreciar las pequeñas colonias parduscas, con el centro de color violeta y es móvil gracias a sus flagelos peritricos.

1.1.3.1 Requerimientos fisicoquímicos de la bacteria

La temperatura óptima de crecimiento es de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, pero diversas especies del género tales como *B. trematum*, *B. hinzii*, *B. bronchiseptica* y *B. avium* son capaces de crecer en un rango de temperatura de 25 a 42°C . *B. bronchiseptica*, produce proteínas de choque frío cuando se crece a una temperatura de 15°C . La bacteria también es capaz de resistir a estrés nutricional, como lo muestra su habilidad para crecer en lagos y amortiguador salino de fosfatos (Porter et al., 1991). Sin embargo no queda claro si replica en este vehículo, dado que no hay fuente de carbono, azufre o nitrógeno.

Aunque las *Bordetellas* patógenas crecen bien en medio líquido definido de Stainer and Scholte (pH 7.6), son capaces de crecer en medios con valores de pH de 7 o ligeramente menores. El crecimiento en cultivo líquido frecuentemente está limitado por el incremento en la alcalinidad del medio que puede ser igual o mayor que pH 8.0.

Bordetella bronchiseptica puede recuperarse fácilmente del tracto respiratorio de animales por raspado nasal o traqueal (Goodnow, 1980). Crece óptimamente en aerobiosis y a temperatura de 37°C en medios con pH ajustados a 7-7.2.

En el aislamiento primario a partir del pulmón de perro crece lentamente y a las 24 h de incubación todavía no se aprecia ningún crecimiento en la superficie de agar, pero hacia las 48 h aparecen pequeñas colonias circulares parecidas a gotas de rocío, diseminadas por la superficie del medio, redondas, lisas y brillantes. Esta forma lisa (S) es inestable en los medios artificiales sobre todo después de la resiembra. En líquido, la bacteria produce turbidez uniforme, dando un sedimento granular, pero sin formar película en la superficie. Hacia las 22 h, en la superficie del medio y en torno al tubo se forma un crecimiento anular (Merchant y Parker, 1984; Nicolet, 1985).

La identificación de primo aislamiento de *B. bronchiseptica* es difícil en comparación con las mantenidas en laboratorio. Los medios empleados para el aislamiento son el agar sangre y el agar MacConkey con glucosa en el que es fácil apreciar las pequeñas colonias parduscas, en el centro color violeta. El crecimiento en agar sangre de cepas de *B. bronchiseptica* mantenidas en el laboratorio comúnmente presentan hemólisis y son brillantes, con un diámetro de 2.0 mm después de uno a dos días de cultivo. Simpson y Simmons en 1976 reportaron que aislamientos primarios a partir de exudados nasofaríngeos no presentaron hemólisis, el diámetro a las 24 h fue de 0.1-0.2 mm y su motilidad se detectó hasta los 3 días de incubación (Goodnow, 1980). Las colonias presuntivas se deben someter a tinción de Gram y a su identificación bioquímica.

1.1.4 Identificación de *B. bronchiseptica*

La identificación clásica de aislados de la bacteria de muestras del tracto respiratorio se basa principalmente en morfología y características

metabólicas en las que se incluyen el Gram, pruebas de nitrato e indol, actividad de enzimas (catalasa y oxidasa), y la ausencia de fermentación de diferentes carbohidratos. Muchas de éstas características pueden comprobarse simultáneamente con “kits” o estuches comerciales como el API (bioMérieux) y el BBL Crystal para bacterias no fermentadoras (bioMérieux) (Peele et al., 1999).

No obstante que las pruebas de actividad metabólica han sido tradicionalmente utilizadas para la identificación de las especies del género *Bordetella*, estos procedimientos pueden quedar rebasados en situaciones particulares, como comportamientos atípicos de primo aislamientos y pueden ser inexactos en cuanto a la diferenciación con otros miembros de la familia *Alcaligenaceae*. Por estas razones se ha buscado desarrollar métodos moleculares de análisis del DNA. En éste sentido, el análisis de la secuencias del gen de RNA 16S (también conocido como rDNA 16S) ha cobrado importancia para el estudio de filogenia y taxonomía bacteriana (Janda y Abbott, 2007). De hecho la clasificación de procariontes en la 2a edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática esta basada en este procedimiento.

1.1.4.1 Identificación por PCR

1.1.4.1.1 Identificación por RNAr 16S

De acuerdo a Patel 2001 (citado en Janda y Abbott , 2007) el uso de las secuencias de los genes de RNA 16S para estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana es adecuado por varias razones: a) el gen esta presente en todas las bacterias; 2) la función del gen RNA 16S no cambia en el tiempo, y los cambios en su secuencia pueden asociarse a cambios evolutivos (cronómetro molecular); 3) el gen rRNA 16S es lo suficientemente grande (1,500 bp) para propósitos bioinformáticos. En general la técnica de RNA 16S consiste en; a) las células procedentes de un cultivo axénico se rompen; b) se amplifica el gen mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); c) el gen es secuenciado; d) 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).

El operon de DNA ribosomal en bacterias comprende tres genes funcionales y evolutivamente conservados; la subunidad pequeña 16S (rRNA) gen (*rrs*), la subunidad grande 23S rRNA y el gen 5S rRNA, intercaladas con regiones variables espaciadoras (espaciador transcrito intergénico ITS). La cantidad de operones difiere para cada género, así va desde uno para micoplasmas hasta 14 para *Clostridium*. Los oligonucleótidos o primers que codifican para regiones conservadas de DNA (frecuentemente llamadas primers universales) se han utilizado para amplificar fragmentos del gen ribosomal de un amplio rango de bacterias.

1.1.5 Factores de virulencia

A pesar de la escasa diversidad genética dentro del género *Bordetella*, existen diferencias substanciales entre los aislados con respecto a la expresión de los genes de virulencia. El género cuenta con diversos genes de virulencia que solo se expresan por una especie o cepa. La especie *bronchiseptica* produce diversos factores de virulencia así como, diversas proteínas de autotransporte que incluyen a la pertactina (PRN) y proteína de resistencia al suero (BrK) y varias adhesinas o factores de colonización incluyendo hemaglutinina filamentosa (FHA), varios serotipos de fimbrias (FIM), que participa en la adherencia a las células epiteliales del tracto respiratorio (Matoo and Cherry, 2005).

Las FHA de *B. bronchiseptica* tienen una masa molecular y propiedades de hemaglutinación muy similares a los FHA de *B. pertussis*. Son proteínas de 220 kDa, reconocidas por los glucolípidos de las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio (Tuomanen et al., 1988). Las FHA pueden interactuar con varios receptores de la célula

hospedera: glicoconjugados a través del dominio lecitina, glicoconjugados en el moco respiratorio por el dominio unión a heparina, eritrocitos a través de la unión heparina y dominio de lecitina N-terminal e integrinas de leucocitos a través del dominio RGD (arginina-glicina-asparagina).

El género *Bordetella* expresa fimbrias de cuatro serotipos: Fim2, Fim 3, Fim X y Fim A, las cuales están codificadas por los genes *fim 2*, *fim 3*, *fim X* y *fim A*, respectivamente (Savelkoul et al., 1996). Las fimbrias tienen entre 3 a 4 nm de diámetro y están compuestas de subunidades antigénicamente relacionadas con un peso molecular de 21 a 24 kDa. Aunque resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* con *B. pertussis* están de acuerdo con la hipótesis que las fimbrias contribuyen a la adherencia de *Bordetella* al epitelio respiratorio (Mooi et al., 1992) y que Fim 2 y Fim 3 se incluyen como componentes de vacunas subcelulares de *B. pertussis*, su papel en la patogénesis no se ha establecido contundentemente. Estos factores de virulencia son responsables de la adherencia de las bacterias al epitelio ciliado del huésped, pérdida de células ciliadas del tracto respiratorio, producción excesiva de moco, y algún tipo de tos (Parton, 1996).

1.1.6 Patogénesis

1.1.6.1 Infecciones por *Bordetella bronchiseptica*

A pesar que las infecciones por *B. bronchiseptica* se asocian con enfermedades respiratorias en 18 mamíferos, poco se conoce acerca de su epidemiología en la naturaleza. El huésped primario de *B. bronchiseptica* se desconoce, y poco se sabe de la transmisión intra e inter especie en el ambiente silvestre. La mayoría de los estudios se enfocan a animales domésticos que viven confinados. La transmisión de animal a animal es por contacto directo con secreciones respiratorias, fómites, y quizá por aerosoles. Porter et al., 1991 mostraron que la bacteria puede crecer en lagos, lo que sugiere

que puede existir como organismo de vida libre. Si éste fuera el caso, la transmisión a animales podría darse sin la necesidad de contacto directo.

1.1.6. Traqueobronquitis Infecciosa Canina

La Traqueobronquitis Infecciosa Canina (TBIC) también conocida como Tos de las Perreras, se considera como una de las enfermedades del tracto respiratorio del perro de mayor morbilidad. La TBIC se presenta frecuentemente en situaciones donde los perros permanecen agrupados (perreras, criaderos, etc.). El impacto económico y zootécnico de esta enfermedad está más bien ligado a labores de crianza y adiestramiento canino, así como el cuidado de animales que se utilizan para la investigación y enseñanza.

La historia clínica y la exploración física son aspectos relevantes para establecer el diagnóstico de TBIC. Un signo característico de TBIC es la tos seca. La tos aumenta con el ejercicio. En casos de complicaciones de TBIC se observan signos de enfermedad sistémica, pirexia persistente, pérdida de peso, debilidad y diarrea (Keil y Fenwick, 1998).

1.1.6.3 Infecciones respiratorias de *B. bronchiseptica* en humanos.

Bordetella bronchiseptica también es capaz de colonizar el tracto respiratorio de humanos. El primer caso fue reportado fue por McGowan en 1911. Desde ese entonces hasta 1990 el 52% de 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 presentan suficientes datos microbiológicos para sustentar la participación de *B. bronchiseptica* (Woolfrey y Moody, 1991). De 1990 a la fecha 75 casos más están documentados (Reina et al., 1991; Deckar et al., 1991; Cuesta et al., 1991; Borrás et al., 1991; Winters et al., 1992; Espino et al., 1992; Bauwens et al., 1992; Meznar et al., 1993; de la Fuente et al., 1994; Brisou et al., 1994; Gueirard et al., 1995; Stefanelli et al.,

1997; Van Der Zee et al., 1996; Tamion et al., 1996; García et al., 1998; Gómez et al., 1998; Choy et al., 1999; Dworkin et al., 1999; Zuabi et al., 1999; Petrocheilou et al., 2000; Lorre III y et al., 2001; Viejo et al., 2002; Lorenzo-Pajuelos et al., 2002; Walet et al., 2002; Belen et al., 2003 Ner et al., 2003; Valencia et al., 2004; Villuedas et al., 2004, Huebner et al., 2006; Berkowitz et al., 2007; Spiker et al., 2008; Rath et al., 2008; Galeziok et al., 2009; Ki-bum et al., 2009; Gisel et al., 2010; Mazumder y Cleveland, 2010).

De estos 85 casos 75 corresponden a personas con un estado inmunocomprometido, sobresalen aquellos que padecen Fibrosis Quística (32 casos), seguida por 21 casos de individuos seropositivos al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Del total de casos, 29 estuvieron en contacto con animales y de los otros 49 no se tiene el dato. En este punto cabe señalar que Gueirard et al., en 1995 son los únicos que pudieron corroborar que la cepa de *B. bronchiseptica* aislada de una anciana con bronconeumonía era la misma que la de un conejo con bronconeumonía con el que convivía, basado en el análisis de electroforesis en campos pulsados.

Estudios más recientes demuestran el aislamiento de *B. bronchiseptica* en humanos sanos o inmunocomprometidos (Gueirard et al., 1995; Stefanelli et al., 1997; Lorenzo-Pajuelos, 2002; Huebner et al., 2006; Rath et al., 2008). En el 2006 Huebner et al., reportaron la transmisión nosocomial a pacientes a los que se les había realizado un trasplante de células madre hematopoyéticas. Para ello, utilizaron el análisis electroforético de campos pulsados. En este estudio también se sugiere que la fuente inicial pudo haber sido una mascota (perro) propiedad de uno de los pacientes, aunque éste no estuvo en contacto con su mascota después del trasplante.

La enfermedad ocasionada por *B. bronchiseptica* en humanos inmunocomprometidos es neumonía. Otras manifestaciones incluyen sinusitis y bronquitis. Niños comúnmente expuestos a

animales de granja o mascotas presentan síntomas parecidos a los ocasionados por *B. pertussis*.

Aunque la infección con *B. bronchiseptica* está asociada con aproximadamente 18 mamíferos, poco se conoce acerca de su epidemiología en la naturaleza. La fuente primaria de infección se desconoce, y poco se conoce acerca de su transmisión intra e interespecie en la vida silvestre. La transmisión de animal a animal se da por contacto directo con secreciones respiratorias, fómites y dispersión por aerosoles.

Foley et al., (2002) evaluaron la transmisión cruzada entre especies (perro y gato); las diferencias genéticas y fenotípicas entre los aislamientos las realizaron por PFGE y comparación de resistencia a antibióticos.

1.1.7 Caracterización molecular del género *Bordetella*

La PFGE es el método de comparación más sensible y reproducible para el género *Bordetella* Mooi et al., 2000; Shin et al., 2007a). El método consiste en obtener patrones específicos (“fingerprint”) del DNA bacteriano total previamente fraccionado con enzimas de restricción. Otros estudios de diversidad genética en *Bordetella spp* utilizan análisis de plásmidos (Kloos et al., 1978), polimorfismo en secuencias de inserción (van der Zee 1996), ribotipos (Register et al., 1997), secuencia de DNA de genes ribosomales (Binns et al., 1998).

Se han utilizado diversos métodos para estudios epidemiológicos de la infección con *Bordetella bronchiseptica*, que incluyen análisis de enzimas de restricción (REA), polimorfismo de DNA al azar (RAPD), ribotipos y análisis de macro-restricción por PFGE. En el caso particular de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino los reportes de diversidad genética son escasos; entre éstos se encuentra el de Keil y Fenwick (1999) quienes evaluaron la diversidad genética de 26 aislamientos

de *Bordetella bronchiseptica* obtenidas de perro y encontraron una diversidad genética considerable, contrario a lo que se ha reportado para la especie aislada de otros hospederos. Estos autores utilizaron como herramienta epidemiológica OPA-4 RAPD y ribotipos con PvuI. En algunos casos de humanos infectados por *Bordetella bronchiseptica* hay un antecedente de contacto con mascotas o animales de granja (Fabbienne et al., 1996). Considerando la alta prevalencia de *B. bronchiseptica* en gatos (Hoskins et al., 1990), en perros (Englund et al., 2003; Molina et al., 2006) y en cerdos (Shashidhar, 1983), existe una alta probabilidad de que esta bacteria pueda ser transmitida al humano. La transmisión de *Bordetella bronchiseptica* entre diferentes especies de huéspedes ya ha sido descrita (Gueirard et al., 1995; Dawson et al., 2000). Los grupos de riesgo por infección de *Bordetella bronchiseptica* son niños (Stefanelli et al., 1997), individuos que estén en contacto directo con animales (Gueirard et al., 1995) o, que estén inmunocomprometidos (Dworking et al., 1999; Huebner et al., 2006).

En algunos casos de humanos infectados por *Bordetella bronchiseptica* hay un antecedente de contacto con mascotas o animales de granja (Fabbienne et al., 1996). Considerando la alta prevalencia de *B. bronchiseptica* en gatos (Hoskins et al., 1990), en perros (Englund et al., 2003; Molina et al., 2006) y en cerdos (Shashidhar, 1983), existe una alta probabilidad de que esta

bacteria pueda ser transmitida al humano. La transmisión de *Bordetella bronchiseptica* entre diferentes especies de huéspedes ya ha sido descrita (Gueirard et al., 1995; Dawson et al., 2000). Los grupos de riesgo por infección de *Bordetella bronchiseptica* son niños (Stefanelli et al., 1997), individuos que estén en contacto directo con animales (Gueirard et al., 1995) o, que estén inmunocomprometidos (Dworking et al., 1999; Huebner et al., 2006).

A pesar de la existencia de trabajos que documentan la infección de *Bordetella bronchiseptica* en humanos, no se ha demostrado de manera concluyente el origen de la misma.

De acuerdo a los antecedentes aquí planteados, la hipótesis de la propuesta de trabajo fue que las cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas del humano y del perro son iguales. Para abordarla se propuso el aislamiento de cepas pareadas, es decir, cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perros y de sus propietarios. Se incluyeron en el estudio cepas de perros callejeros de Centros de Control Canino (CCC) y de pacientes inmunodeprimidos que asisten a la unidad de neumología del Hospital General de México (HGM). Estas cepas se sometieron a dos análisis moleculares: secuenciación del gen de rDNA 16S y electroforesis en geles de campos pulsados. Los resultados de éstos análisis permitieron saber si las cepas aisladas de perros, personas sanas o inmunodeprimidas eran una misma, o diferente.

2.0 Justificación

Bordetella bronchiseptica es una bacteria que causa enfermedades del tracto respiratorio en diferentes mamíferos, en perros es uno de los agentes causales de la tos de las perreras. El aislamiento de la misma se ha llevado a cabo en poblaciones confinadas y la transmisión entre la misma especie e interespecies ya ha sido documentada.

Los casos de infección en humanos son poco frecuentes y la mayoría de los reportes de aislamiento de *B. bronchiseptica* provienen de personas con un estado inmune comprometido. Pero una vez infectado se presentan serios síndromes patológicos, lo que señala el riesgo médico de una zoonosis potencial. La población de perros callejeros en México es alta y el contacto con las personas es frecuente por lo que el conocer infecciones naturales en los perros incidirá a sensibilizar a médicos veterinarios y estructuras de salud pública de animales en este caso perros, especialmente en el contexto de inmunosupresión.

De acuerdo a lo aquí planteado, la propuesta de trabajo fue que el perro es una fuente de infección de *B. bronchiseptica* para el ser humano. Para abordarla se propone el aislamiento de cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de personas con trastornos respiratorios y de perros. Estas cepas se sometieron a dos análisis moleculares: 1) secuenciación del gen de rDNA 16S y 2) electroforesis en geles de campos pulsados. Los resultados de éstos análisis permitirán saber si las cepas aisladas de perros y personas son una misma, o diferente.

3.0 Hipotesis

Las cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas del humano y perros son las mismas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer una comparación molecular entre cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas del perros y del humano.

4.2 Objetivos particulares

- 1.- Generar una colección de muestras de perros de diferentes fuentes, de personas sanas y con trastornos respiratorios.
- 2.- Ubicar taxonómicamente a las cepas aisladas por pruebas bioquímicas y secuencia del gen rDNA 16S.
- 3.- Analizar los aislamientos mediante Electroforesis en Geles de Campos Pulsados (PFGE).
- 4.- Comparar la diversidad genética de las cepas aisladas en las muestras pareadas, y cepas aisladas de una misma especie.

5.0 Materiales y métodos

5.1 Población muestreada

Se tomaron muestras de personas y perros. En el caso de los perros se obtuvieron exudados nasales y/o faríngeos de; a) perros caseros (n=62); y b) perros de Centros de Control Canino (CCC) (n=428). La población de perros de CCC procedió del municipio de Ecatepec, Estado de México y de las delegaciones Gustavo A. Madero y Azcapotzalco del Distrito Federal. En el caso de los perros caseros se obtuvieron exudados de perros con afecciones respiratorias (tos, estornudo y secreción nasal) y clínicamente sanos.

Con respecto a las personas, se obtuvieron exudados nasales y faríngeos de; a) personas sanas (n=63) y de otras que convivían con los perros caseros señalados en el párrafo anterior. b) Lavados bronquiales de pacientes que acudían al servicio de broncoscopia del departamento de neumología del Hospital General de México (n=114). De estos 61 eran seropositivos al virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), seis tenían cáncer y el resto padecían algún problema respiratorio. c) Exudados nasales de personas hospitalizadas en la Unidad de Infectología del mismo hospital (n=9), de las cuales 7 eran positivos a VIH y dos con reacciones positivas al virus de Influenza H1N1.

5.2 Toma de muestras y aislamiento de cepas de *Bordetella bronchiseptica*

Los exudados faríngeos y nasales de personas sanas, perros caseros y perros de CCC se realizaron con ayuda de hisopos estériles de algodón o rayón, se tomaron muestras de las dos fosas nasales cuidando de no tocar la parte externa de la nariz. En cuanto a los exudados faríngeos, estos se tomaron evitando arrastrar muestra de la lengua, encías o dientes. Los hisopos conteniendo las muestras se colocaron en caldo de infusión cerebro corazón y medio de transporte Stuart o solución salina

fisiológica (SSF) con cefalexina (40µg/ml) y se trasladaron al laboratorio manteniéndolos en frío.

Los lavados bronquiales se realizaron con 10 ml del lavado en 1 mL de SSF, se realizaron diluciones seriadas y 100 µl de la dilución 10^{-3} se plaqueo en cajas con agar base sangre suplementada con eritrocitos de carnero al 5% y agar MacConkey respectivamente. Después de incubar 24-48 h a 37°C se revisó la morfología de las colonias, buscando características que concordaran con *B. bronchiseptica*. En todos los casos los aislamientos sugestivos de *B. bronchiseptica* se sembraron en agar MacConkey con la finalidad de lograr cultivos puros. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h. Se observó la morfología de las colonias y por tinción de Gram la morfología microscópica, y se procedió a la identificación.

5.3 Identificación de *Bordetella bronchiseptica*

Las cepas que mostraban características morfológicas macro y microscópicas sugestivas de *B. bronchiseptica*, se les identificó por pruebas bioquímicas y secuenciación del RNAr 16S.

5.3.1 Cepas bacterianas

Además de las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas durante este estudio, se utilizaron otras nueve cepas de *B. bronchiseptica* aisladas en nuestro laboratorio en el periodo septiembre de 1997 a marzo de 1998 (Cuadro 1). Como controles se incluyeron dos cepas de *B. bronchiseptica* (4617 y 10580) del “American Type Culture Collection” (ATCC) y una cepa de origen porcino (LBF) proporcionada por el Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Inglaterra. Todas las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y morfología de las colonias (Molina et al., 2006) y se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido.

Cuadro 1. Cepas de *Bordetella bronchiseptica* utilizadas en este estudio

Cepa	Origen del aislamiento	Fuente
P1	Perro callejero	Cavidad nasal
P4	Perro callejero	Cavidad nasal
P18	Perro callejero	Cavidad nasal
P21	Perro callejero	Cavidad nasal
P31	Perro de escuela de entrenamiento canino	Cavidad nasal
P36	Perro de escuela de entrenamiento canino	Cavidad nasal
P37	Perro de escuela de entrenamiento canino	Cavidad nasal
P38	Perro de escuela de entrenamiento canino	Cavidad nasal
P98	Perro callejero	Cavidad nasal
LBF	Cerdo	Pulmón
4617	Perro	
10580	Se desconoce	

5.3.2 Pruebas bioquímicas

Para la identificación por pruebas bioquímicas se utilizó un método de identificación miniaturizado BBL Crystal Equipo Crystal ID Entérico /no fermentadores. El estuche está compuesto de 1) las tapas del panel BBL Cristal E/EF, 2) las bases BBL Crystal y 3) los tubos con SSF para preparar el inóculo. La tapa contiene 30 sustratos deshidratados. La base tiene 30 pozos de reacción.

El inóculo de prueba se utiliza para llenar

los 30 pozos de la base. Cuando se alinea la tapa con la base y se cierra en su lugar, el inóculo de prueba rehidrata los sustratos secos e inicia las reacciones correspondientes. Después de un período de incubación de 18-24 h, se examinan los pozos para observar cambios de color que se comparan con una carta de color (Fig.1). Los cambios de color son el resultado de actividades metabólicas de las bacterias y las reacciones se detectan por el uso de un indicador de pH en el sustrato del análisis.

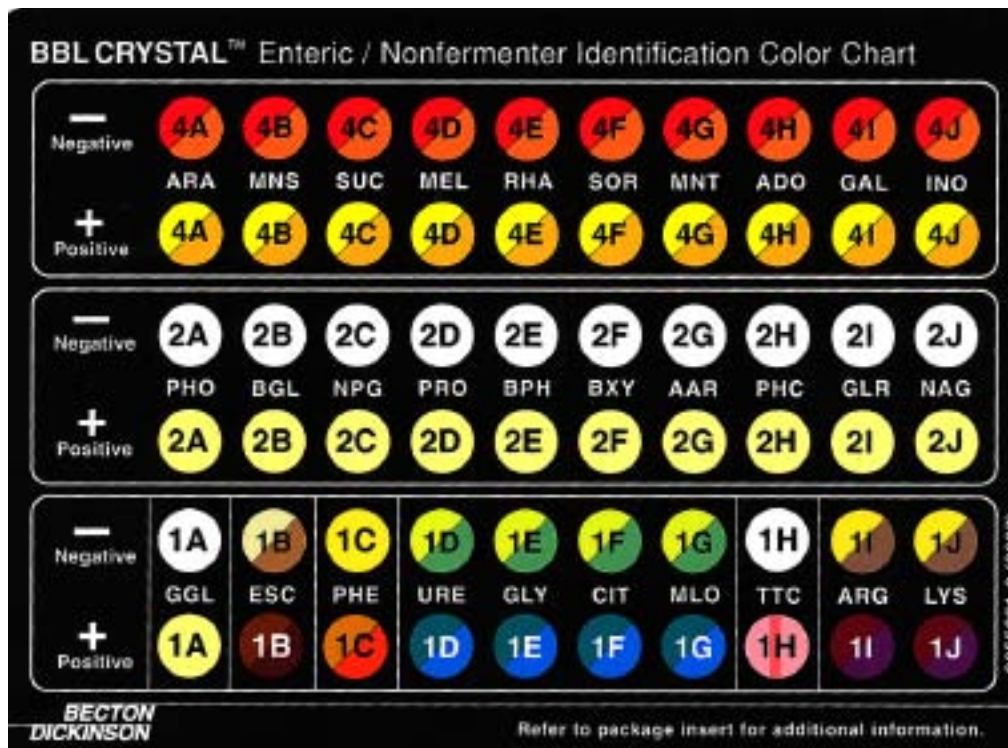


Figura 1. Carta de color auxiliar en la interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas del estuche BBL Crystal (casa comercial)

Cabe destacar que de las 30 pruebas bioquímicas, las de mayor relevancia para la identificación de *B. bronchiseptica* son la carencia de fermentación de carbohidratos (se incluyen 10), hidrólisis de la urea y degradación del citrato. Además se tiene que realizar por separado la detección de oxidasa y la no producción de indol, que no se incluyen en el estuche de detección.

Se utilizaron como controles, las cepas de *B. bronchiseptica* ATCC 4617 y 10580, una cepa aislada de perro (P37) y una de cerdo (LBF). También se utilizó una cepa de *Escherichia coli* que fermenta los carbohidratos, es indol positiva, citrato y urea negativa. Las cepas presuntivas de *B. bronchiseptica* se crecieron en agar MacConkey a 37°C, después de 48 h se ajustó un inóculo de cada cepa a 9×10^8 UFC en la escala de MacFarland utilizando para ello el tubo para preparación del inóculo que viene en el estuche. Se inocularon los pozos del estuche BBL con la suspensión bacteriana. Se incubaron a 37°C durante 24 h en cámara húmeda y se registraron los resultados.

5.3.3 Identificación por análisis comparativo de la secuencia de RNAr 16S.

Las cepas aisladas e identificadas como *B. bronchiseptica* por pruebas bioquímicas, así como las cepas enlistadas en el Cuadro 1, se identificaron por secuenciación del RNAr 16S. Se procedió como a continuación se describe.

5.3.3.1 Preparación del DNA para el análisis de RNAr 16S

Extracción de DNA

Las cepas se sembraron en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubaron a 37 °C durante 48 h. De estos cultivos se preparó una suspensión bacteriana en SSF, equivalente al tubo 3 en la escala de McFarland que equivale a 9×10^8 UFC y se centrifugó a 10 000 rpm durante un minuto. La extracción de DNA se realizó mediante el uso de un estuche “DNAeasy Blood & Tissue” de Qiagen (Promega, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA se almacenó a -70°C hasta su utilización.

5.3.3.2 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación por RNA 16S

Se utilizaron los iniciadores universales para RNAr 16S RD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) y FD1 (AGAGTTGATCCTGGCTCAG) (Sigma, USA) de acuerdo a Lows et al., 1999. El PCR se realizó en 25 µL volumen final en tubos de 0.2 mL. Para cada reacción se utilizó 100 ng de DNA total. El buffer de reacción contenía 20mM tris HCL (pH 8), 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brasil), 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos rDNA 16S RD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) y FD1 (AGAGTTGATCCTGGCTCAG) (Sigma, USA), y 0.2 mM dATP, dTTP, dCPT, y dGTP (Invitrogen, Brasil). La mezcla se colocó en un termociclador 2720 (de Applied Biosystems, USA), con una desnaturalización inicial por 3 minutos a 94°C seguido por ciclos de desnaturalización 1 min a 94°C, alineamiento 30 seg 55°C, y finalmente la extensión 2 min a 72°C se repitieron 30 ciclos en estas condiciones. La reacción se terminó con una extensión de un paso por 7 min a 72°C, almacenándose a 4°C.

Después del PCR, 20 µL de cada producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó el marcador de peso molecular de DNA de 1Kb (Invitrogen, Brasil). El gel se observó en un transiluminador de UV y se tomó una fotografía.

5.3.3.3 Análisis comparativo de las secuencias

El producto de PCR se purificó con un estuche Wizard (Promega, USA). Los amplicones se secuenciaron utilizando un secuenciador 3100 Genetic Analyzer, BigDye Terminator V 3.1 Sequencing kit, soporte Pop6, electroforesis 1h 45min, capilar 50cm (UNAM-FES-Iztacala), obteniéndose la secuencia nucleotídica del producto la que fue comparada con otras secuencias disponibles en la base de datos del “GenBank”. “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (WWW/ncbi.nlm.nih.gov).

Las secuencias se registraron en el “GenBank” y se obtuvo el número de acceso para cada secuencia.

5.4 Almacenamiento de las cepas

Las cepas se crecieron masivamente en cajas de agar MacConkey, después de incubarlas a 37°C durante 48 h se cosecharon las bacterias con SSF y se lavaron dos veces con SSF. La suspensión se centrifugo a 5 000 rpm durante 10 min y se añadió caldo BHI y suero fetal bovino (1:1) o glicerol (al 40% 1:1). Las alícuotas se mantuvieron por 24 h a 4°C y finalmente se almacenaron en nitrógeno líquido y en congelación a -70°C en ultracongelador.

5.5 Análisis molecular de las cepas

El análisis de diversidad genética se realizó por medio del patrón de restricción del DNA total de la bacteria utilizando la técnica de PFGE (Shin et al., 2007a) con algunas variaciones que a continuación se describen.

5.5.1.1 Preparación del DNA para la PFGE

a) Siembra de las cepas

Las cepas de *B. bronchiseptica*, se sembraron en agar MacConkey y se incubaron a 37°C durante 48 h. De cada cultivo 4-5 colonias se sembraron en tubos conteniendo caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se depositaron en una placa rotatoria para su agitación (1400 rpm) a 37°C. Después de 24 h, 600µl de cada una de las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 13, 000 rpm por 2 min. Las pastillas se lavaron con 500µl de amortiguador de lavado (Tris 20 mM, EDTA 1 mM pH8) y cada una se resuspendió en 150µl de amortiguador de suspensión (Tris 100 mM, EDTA 100 mM pH8).

b) Elaboración de bloques

Las pastillas bacterianas resuspendidas se colocaron a 37°C durante 5 min en agitación a 750 rpm, posteriormente se agregaron 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y agarosa (pronadisa D-1LE, lab.

CONDA) al 1.6% en amortiguador de lavado y se mezcló la suspensión. Inmediatamente se llenaron los moldes para la formación del bloque y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

c) Lisis bacteriana

Los bloques se colocaron en amortiguador de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1% pH 8) y se dejaron a 50°C toda la noche en agitación. Después de este tiempo los bloques permanecieron a temperatura ambiente y se lavaron con agua desionizada en baño de agua a 50°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados con amortiguador TE IX (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH8), tres lavados en el amortiguador en baño de agua a 50°C y dos a temperatura ambiente.

d) Digestión del DNA

Para la digestión los bloques se colocaron en 300 µl de la enzima XbaI (In vitrogen 10 U/ml), y se incubaron a 37°C toda la noche en agitación a 450 rpm. Se aspiró la mezcla de la enzima y se agregó agua para mantener hidratado el bloque, listo para correr la electroforesis.

e) Condiciones de la electroforesis en campos pulsados.

La electroforesis en campos pulsados se realizó en un equipo DRII (Bio-Rad USA) con amortiguador TBE 0.5X en un gel de agarosa (Pronadisa D-5, lab CONDA) al 1%.

Condiciones de electroforesis:Tiempo inicial 5.3 seg. Tiempo final 49.9 segundos, gradiente 6.0 v/cm, tiempo de corrimiento 20 h. Se utilizó el marcador de peso molecular lambda (BioLabs, USA).

f) Tinción del gel.

El gel se tiñó 30 min con bromuro de etidio y se lavó con agua de la llave. El gel se observó en un transiluminador, se escaneó y se archivó en forma digital.

5.5.1.2 Análisis de los datos de la electroforesis en campos pulsados

El patrón de DNA generado por la electroforesis en campos pulsados se analizó de acuerdo a los criterios de Tenover et al (1995), con base en la diferencia de bandas. El patrón de PFGE más repetido se designó tipo A y los patrones idénticos se utilizaron como referencia para diferenciar otros patrones; así en el patrón tipo A se incluyen cepas con menos de tres bandas diferentes, en el tipo B con menos de 6 bandas diferentes, y el tipo C con 7 o más bandas diferentes. Después de un análisis a simple vista, el gel se analizó con el software Alpha Imager (Alpha Innotech Co.), y se utilizó el coeficiente de Dice (Register y Sanden, 2006) para establecer los patrones de restricción. A partir de este análisis se construyó un dendograma con el software NTSYSpc versión 2.02.

6.0 Resultados

6.1 Muestreo e identificación de cepas de *Bordetella bronchiseptica*

6.1.1 Muestras y aislamientos

Se colectaron seiscientos setenta y seis muestras en total durante el periodo de febrero de 2009 a diciembre de 2011. De estas muestras, 63 corresponden a perros caseros, 428 a perros de Centros de Control Canino (CCC), 63 a personas sanas, 114 a pacientes del Hospital General de México (HGM) y 9 a personas hospitalizadas en la Unidad de Infectología de HGM (Cuadro 2). De las 676 muestras, sumando las de los perros y las de humanos, 12 fueron positivas a *Bordetella bronchiseptica*. De éstas, once provenían de los perros y una se aisló de un paciente de la Unidad de Infectología.

En el Cuadro 2 se puede apreciar que el porcentaje de aislamiento de *Bordetella bronchiseptica* (1.4%) fue menor en la población de perros

Cuadro 2. Número total de muestras trabajadas por población.

Población Muestreada	No. Muestras	Aislamientos (%) por grupo
Perros caseros	62	5 (8)
Perros de Centro de Control Canino (CCC)	428	6(1.4)
Personas sanas	63	0
Pacientes del Hospital General México (HGM)	114	0
Pacientes de Infectología	9	1(11)

muestreados en CCC comparado con el de los perros caseros (8%).

En cuanto a los exudados de personas sanas que convivían con sus mascotas (perros caseros), no se obtuvieron aislamientos, aun cuando en uno de los perros se aisló la bacteria.

A las cepas aisladas se les asignó un código, así que se tiene, 151837083, 151829626, Maxim, 1518596000, y MP1 cepas aisladas perros caseros y 231003011, 331003011, 361003011, 151703011, 78B1, 4F1 corresponden a aislamientos de CCC. La cepa denominada VIH6 se aisló de uno de los pacientes del Hospital General del cual se desconoce si convivía con mascotas portadoras.

6.1.2 Identificación de cepas de *Bordetella bronchiseptica* por pruebas bioquímicas

En las cajas de agar MacConkey, después de 36 h a 37°C, se pudo observar la morfología típica de *B. bronchiseptica*, es decir, colonias color parduzco con el centro color violeta. Al microscopio se pudo observar bacilos Gram negativos móviles.

Después de obtener los aislamientos con morfología típica de *Bordetella bronchiseptica*, se procedió a la identificación por pruebas bioquímicas. Los resultados se resumen en el Cuadro 3.

A partir de cultivos puros crecidos en agar MacConkey y después de un periodo de incubación de 48 h a 37°C de las cepas aisladas, se realizaron pruebas bioquímicas primarias; actividad de oxidasa y catalasa, y no producción de indol (Cuadro 3). Las bacterias que presentaron estas características bioquímicas, se sembraron en los paneles de BBL Crystal, los resultados fueron congruentes con las características metabólicas de la bacteria (Cuadro 3).

Las bacterias aisladas se identificaron como *B. bronchiseptica* cuando fueron positivas a las pruebas de: oxidasa, ureasa, catalasa, citrato y negativas a las otras pruebas bioquímicas. En el

Cuadro 3 Resultados de las pruebas bioquímicas de cepas de *Bordetella bronchiseptica*

Cepa/Actividad metabólica	Oxidasa	Catalasa	Gelatinasa	Urea	Citrato	Indol	CHO's
151837083	+	+	-	+	+	-	-
151829626	+	+	-	+	+	-	-
Maxim	+	+	-	+	+	-	-
1518596000	+	+	-	+	+	-	-
MP1	+	+	-	+	+	-	-
231003011	+	+	-	+	+	-	-
331003011	+	+	-	+	+	-	-
361003011	+	+	-	+	+	-	-
151703011	+	+	-	+	+	-	-
78B1	+	+	-	+	+	-	-
4F1	+	+	-	+	+	-	-
VIH6	+	+	-	+	+	-	-
4617	+	+	-	+	+	-	-
10581	+	+	-	+	+	-	-
LBF	+	+	-	+	+	-	-
P37	+	+	-	+	+	-	-
E. coli	-	+	-	-	-	+	+

*Aldonitol e inositol negativo CHO's = carbohidratos

Cuadro 3 se puede observar que de los 30 reactivos que contiene el estuche BBL Crystal, se colocaron solo las pruebas bioquímicas de mayor relevancia para la identificación de *B. bronchiseptica*, que son la no fermentación de carbohidratos (incluye 10) indicados en el cuadro como CHO'S, hidrólisis de la urea y degradación del citrato. Además de la detección de oxidasa, catalasa y la no producción de indol que no se incluyen en el estuche de detección. En el cuadro se puede advertir también el resultado de las pruebas bioquímicas de cepas control: *B. bronchiseptica* ATCC 4617 y 10580, y una cepa aislada de perro (P37) y almacenada en nitrógeno líquido. También se utilizó una cepa de *Escherichia coli* que fermento 8 de los 10

carbohidratos, es indol positivo, citrato y urea negativo.

6.1.3 Identificación de las cepas por análisis comparativo de la secuencia de RNAr 16S.

A veinticuatro cepas de *B. bronchiseptica*, previa identificación por características bioquímicas, se les corroboró su identificación por secuenciación del RNAr 16S.

El producto de PCR presentó el tamaño de 1 500 pb esperado (Figuras 2 a 5); en las figuras se muestra la amplificación del DNA de todas las cepas de *B. bronchiseptica*.

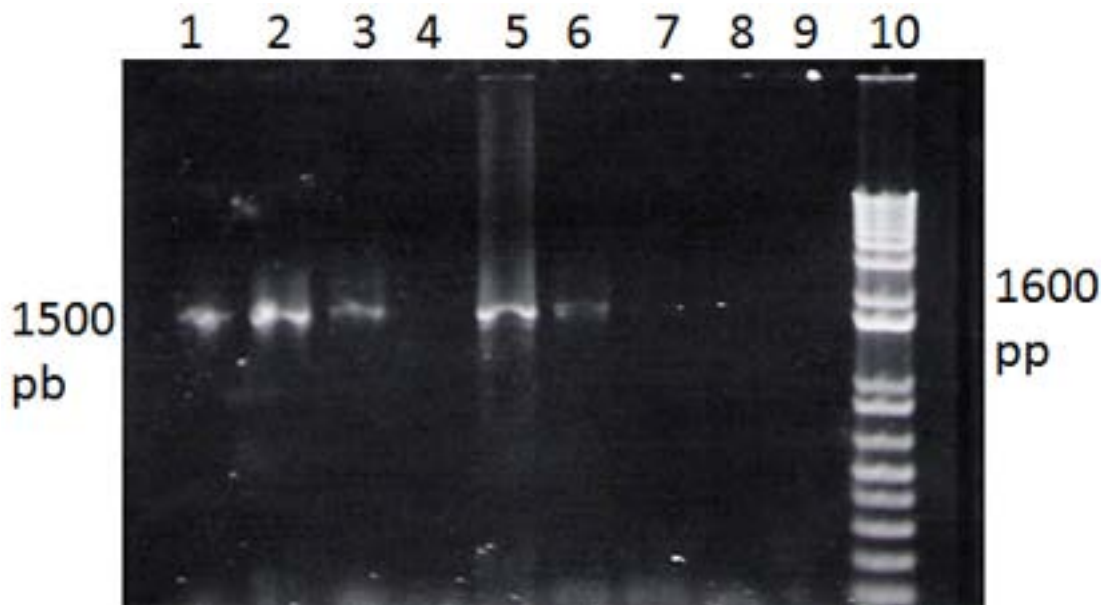


Figura 2. Producto de PCR de iniciadores rDNA 16S en gel de agarosa 1% de cepas de *B. bronchiseptica*. Carril 1.- 4617; 2.-10580; 3.- P4; 4.-P18; 5.- P36; 6.- P37; 7.-P3 8.-P98, 10.- Marcador de pares de bases 1 Kb.

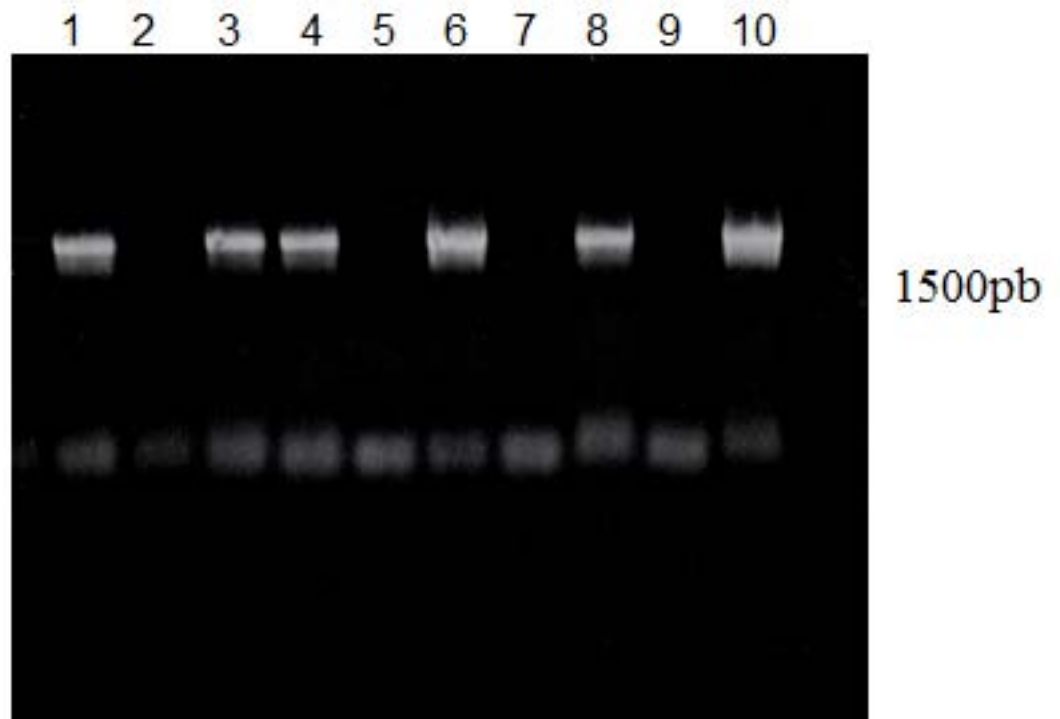


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de cepas de *B. bronchiseptica* con los iniciadores rDNA 16S. Carril: 1.- LBF; 3.- P21; 4.- P31; 6.- P1; 8.- P98 y 10.- Control Positivo

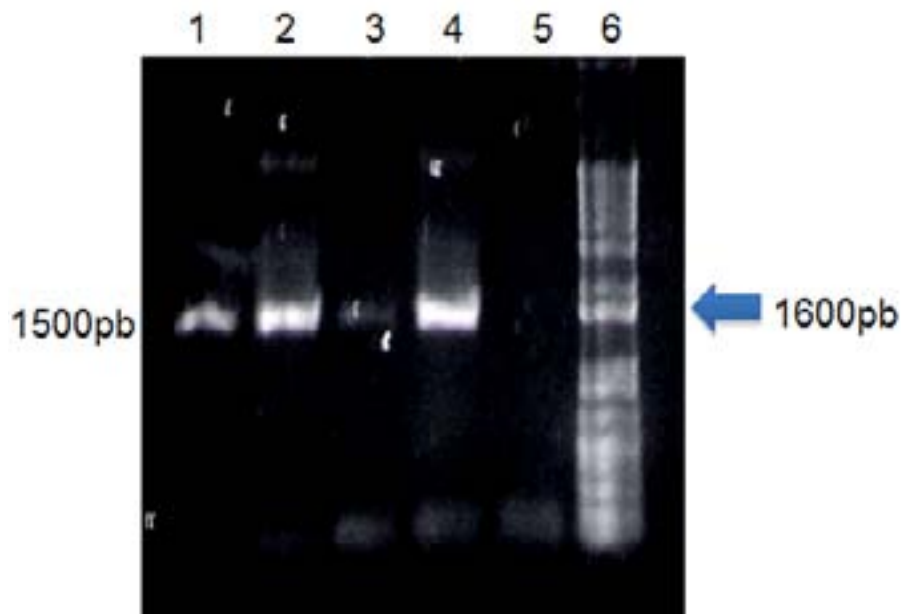


Figura 4. Producto de PCR de iniciadores 16S rDNA en gel de agarosa 1% de cepas de *B. bronchiseptica*: Carril 1.- P18; 2.- P37; 3- P9; 4.-Control 4617 y 6.- Marcador de pares de bases 1 Kb.

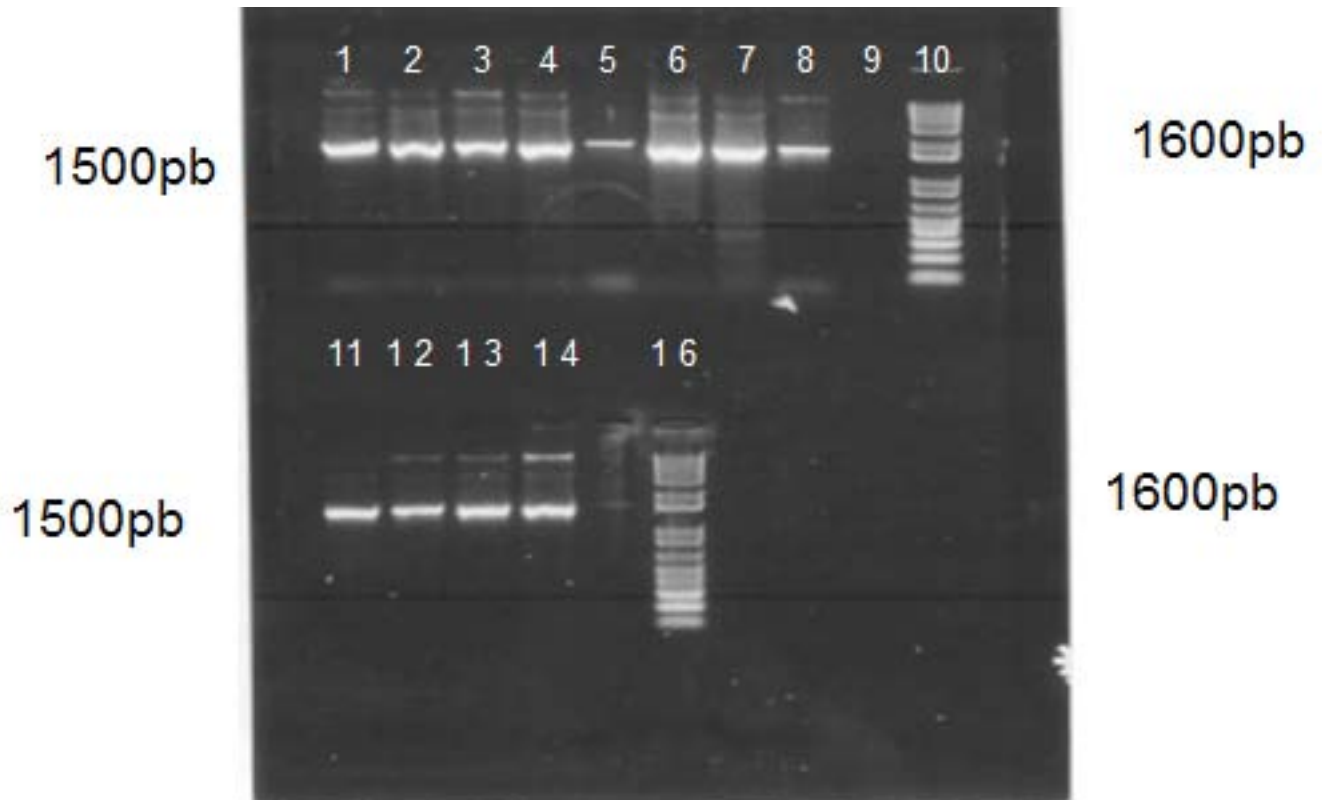


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de cepas de *Bordetella bronchiseptica* con los iniciadores de rRNA 16S. Carril: 1. – 231003011 2.- 151703011; 3.- 331003011; 4.- 361003011; 5.- 10580 ATCC; 6.- 78B1; 7.- VIH6; 8.- 151837083; 10.- Marcador 1Kb; 11.- 151829626; 12.- Maxim; 13.- 1518596000; 14.- MP1 y 16.- Marcador 1Kb.

En las Figuras 2-4 se muestran las amplificaciones del DNA de las cepas aisladas en nuestro laboratorio en el periodo septiembre 1997 a marzo 1998 y controles ATCC 4617 y 10580 y una cepa de origen porcino LBF.

En la Figura 5 se representan los amplicones de generados a partir del DNA de las cepas aisladas en este trabajo.

El par de iniciadores utilizados para amplificar 1 500 pb que codifican para el rRNA 16S de *B. bronchiseptica* solo mostró un amplicon, la banda de cada una de las cepas se purificó y secuenció. El “Basic Local Aligment Seare (BLAST)” de las secuencias en la base de datos “GenBank” presentó 98-99% de homología con *B. bronchiseptica*, con excepción de las cepas 78B1 y VIH 6 que la homología de 90 y 82% respectivamente.

Cuadro 4 Identificación por rDNA 16S de cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perro y número de acceso al GenBank.*

Cepa	Iniciador	Resultado (GB)	No. de acceso al GenBank
P4	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	FJ867619
P18	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	GQ131888
P21	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	EU152965
P21	RD1	<i>B. bronchiseptica</i>	EU152968
P31	FD1	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	EU152962
P31	RD1	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	EU152966
P36	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	FJ867620
P37	FD1	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	FJ867621
P98	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	GQ131889
LBF	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	EU152964
10580	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953658
4617	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	(ATCC)
P1	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ824384
P38	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953660

Cuadro 5 Identificación por rDNA 16S de cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perro y una de humano (VIH6), se muestra el número de acceso al Genbank.*

Cepa	Iniciador	Resultado (GB)	No. de acceso al GenBank
151837083	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953661
151829626	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953654
Maxim	RD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953662
1518596000	FD1	<i>B. bronchiseptica RB50</i>	JQ953656
MP1	RD1	<i>B. bronchiseptica RB50</i>	JQ953657
231003011	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953652
331003011	FD1	<i>B. bronchiseptica RB50</i>	JQ953655
361003011	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953663
151703011	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953653
78B1	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JX129161
4F1	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953651
VIH6	FD1	<i>B. bronchiseptica</i>	JQ953659

Las secuencias obtenidas en este estudio están depositadas en el Gen Bank con los números de acceso EU152962-68, FJ867619-21, GQ131888-89, JQ824384 y JQ953651-63, (Cuadro 4 y 5), cepas aisladas en 1997 a 1998 almacenadas en nitrógeno líquido y cepas de aislamiento reciente respectivamente.

6.2 Patrón de PFGE.

La digestión con la enzima XbaI del DNA genómico de las cepas de *B. bronchiseptica* generó bandas resueltas en un rango de 78 a 488Kb (Figuras 6 y 7). Las cepas de referencia (ATCC 4617 y 10580, LBF) se incluyeron en

30 cada uno de los geles y se produjo constantemente el mismo patrón. Con los pesos obtenidos de cada banda se realizó una matriz y las cepas se agruparon de acuerdo a los criterios de Tenover et al., 1995, ver sección 5.6.1.13. La mayoría de las cepas arrojaron un total de 11 a 13 bandas, originando diversos patrones de restricción en el arreglo de DNA. De acuerdo a la presencia o ausencia de cada una de las bandas se observaron un total de 17 patrones distintos de restricción, incluyendo 3 tipos principales definidos como A, B y C. El tipo A con 6 subtipos (difieren de 1 a 3 bandas; A1 y-A6). El patrón más común de PFGE y que agrupa a 6 cepas (28.57%) idénticas fue denominado A (Cuadro 6). Los subtipos A1

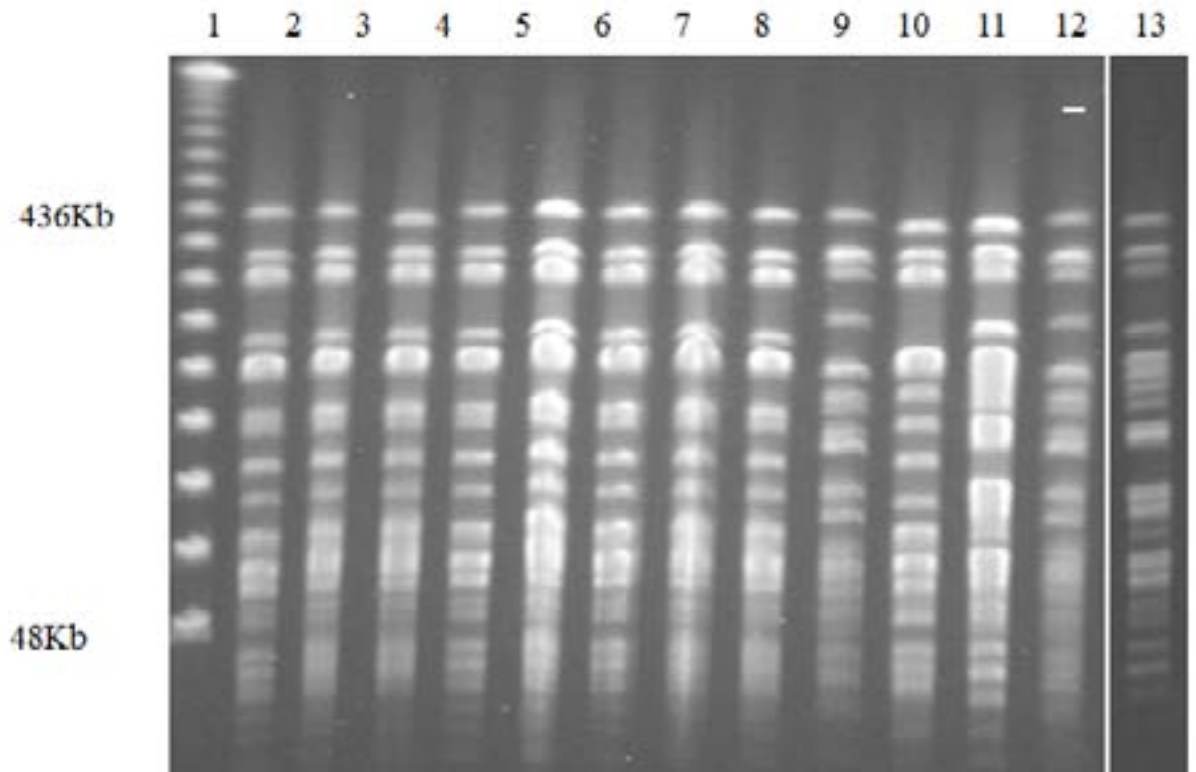


Figura 6 Patrón de electroforesis en campos pulsados de cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas de perro. Carriles (A): 1.- Marcador de pares de bases lambda; 2.- P1, 3.- P4; 4.- P18; 5.- P21; 6.- P31; 7.- P36; 8.- P37; 9.- P38; 10.- P98; 11.- 10580; 12.- 4617; 13.- LBF; 14.- 4617. 151703011; 4F1.

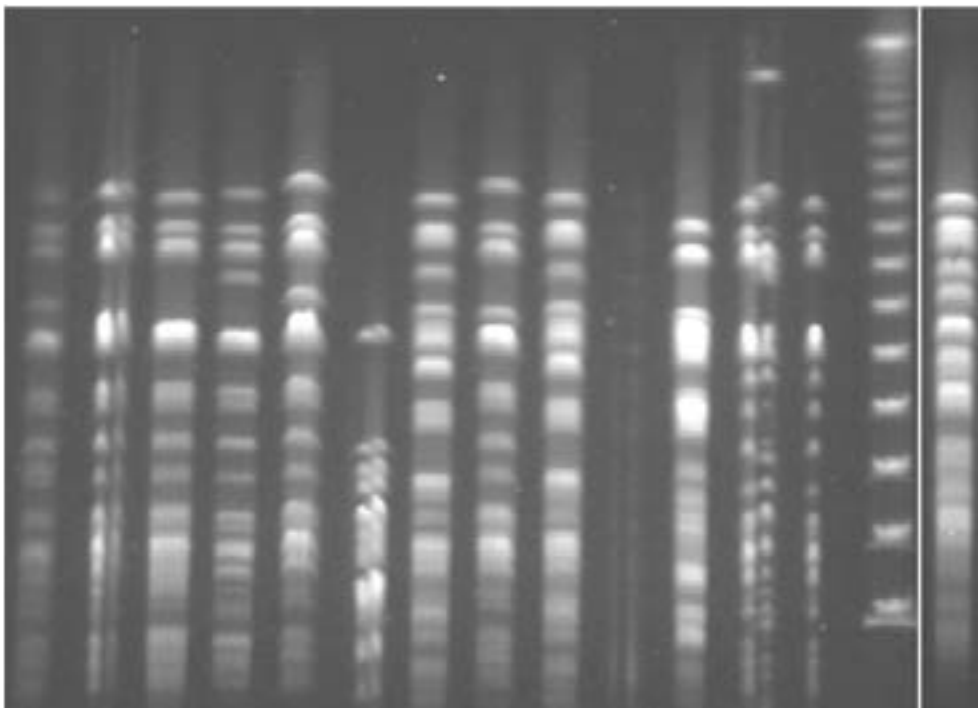


Fig. 7 Patrón de electroforesis en campos pulsados de cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas de perro. Carriles (A): 1.- 151837083; 2.- 1518596000; 3.- 151829626; 4.- Maxim; 5.- MP1; 6.- 78BC Carriles (A): 1.- 1514; 4.- Maxim; 5.- MP1; 6.- 78B1, 7.- 361703011; 8.- 3310011; 9.- 151703011; 10.- 4F1; 11.- 2310; 12.- VIH6; 13.- 10580; 14.- Marcador de pares de bases lambda; 15.- 4F1.

Cuadro 6. Patrones de PFGE de *B. bronchiseptica* digerida con XbaI.

	Patrón de PFGE*	Cepa	No. de fragmentos diferentes comparado con el tipo idéntico.	Categoría*	No. de aislados (%)†
A	A	P1,P4,P21, P38,MP1,331003011	0	Indistinguible	6 (28.57)
	A1		1	Relacionados cercanamente	6 (28.57)
	A2	P36	1		
	A3	1518596000	2		
	A4	VIH6	2		
	A5	P18	3		
	A6	151837083	3		
		15189626			
B	B	MAXIM	4	Relación posible	1 (4.76)
	B1	P37	4		1(4.76)
C	C	4F1	6	Diferente	1(4.76)
	C1	P98,LBF	7		1 (4.76)
	C2	361003011, 151703011	8		2 (9.52)
	C3	P31	9		1 (4.76)
	C4	4617	13		
	C5	231003011	11		1(4.76)
	C6	10580	7		
	C7	78B1	8		1(4.76)

Tenover et. al., 1995 Calculados sobre las 21 cepas aisladas de perro, sin contar las cepas de referencia. *Ver figura 8

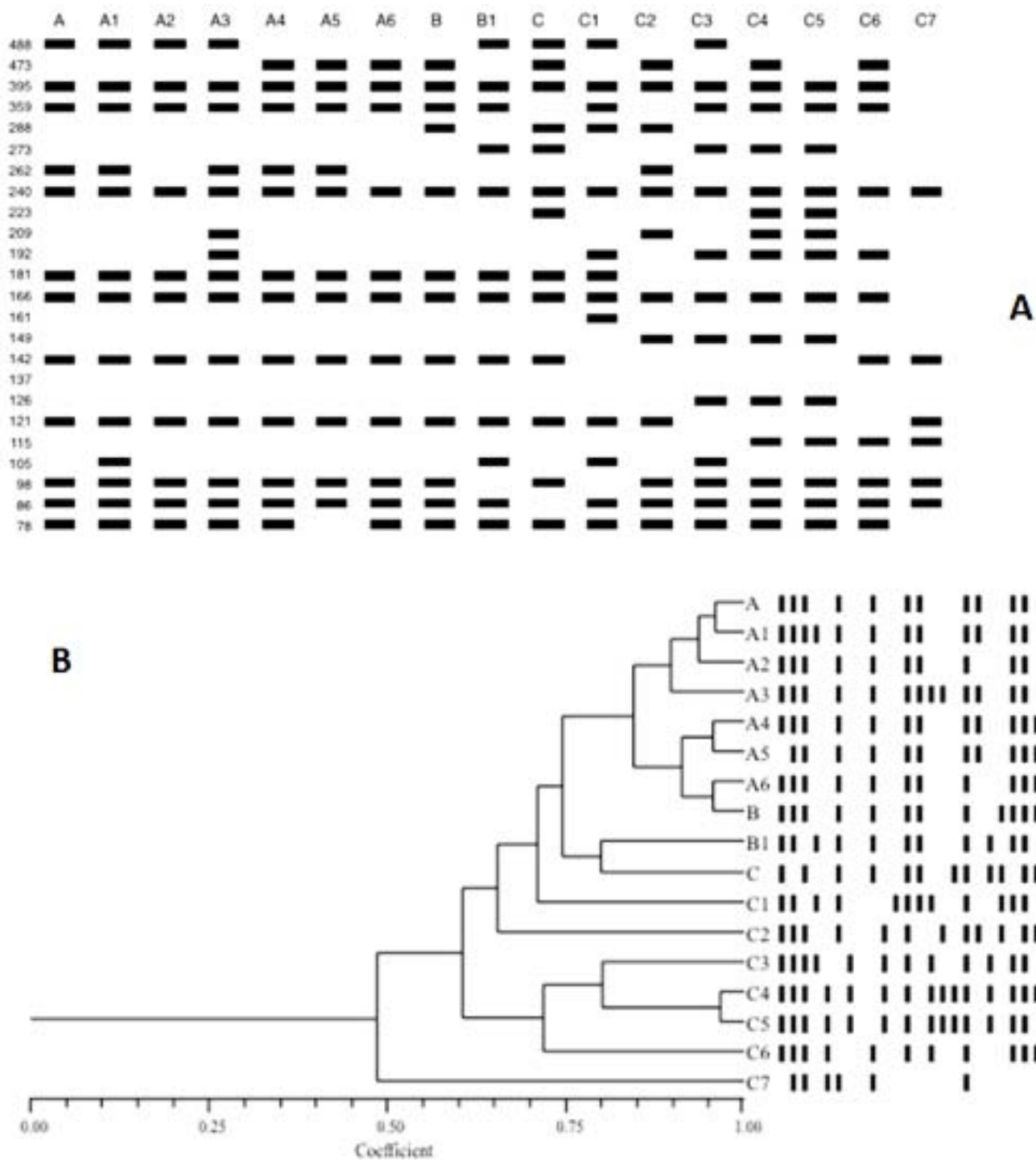


Figura 8 Representación esquemática de patrones de PFGE y dendrograma de XbaI de *B. bronchiseptica* elaborado con NTSYSpc versión 2.02. (A) Líneas: Marcador de pares de bases lambda; A-C, patrones de PFGE de *B. bronchiseptica* (B) Patrones de PFGE y dendrograma de cepas de *B. bronchiseptica*.

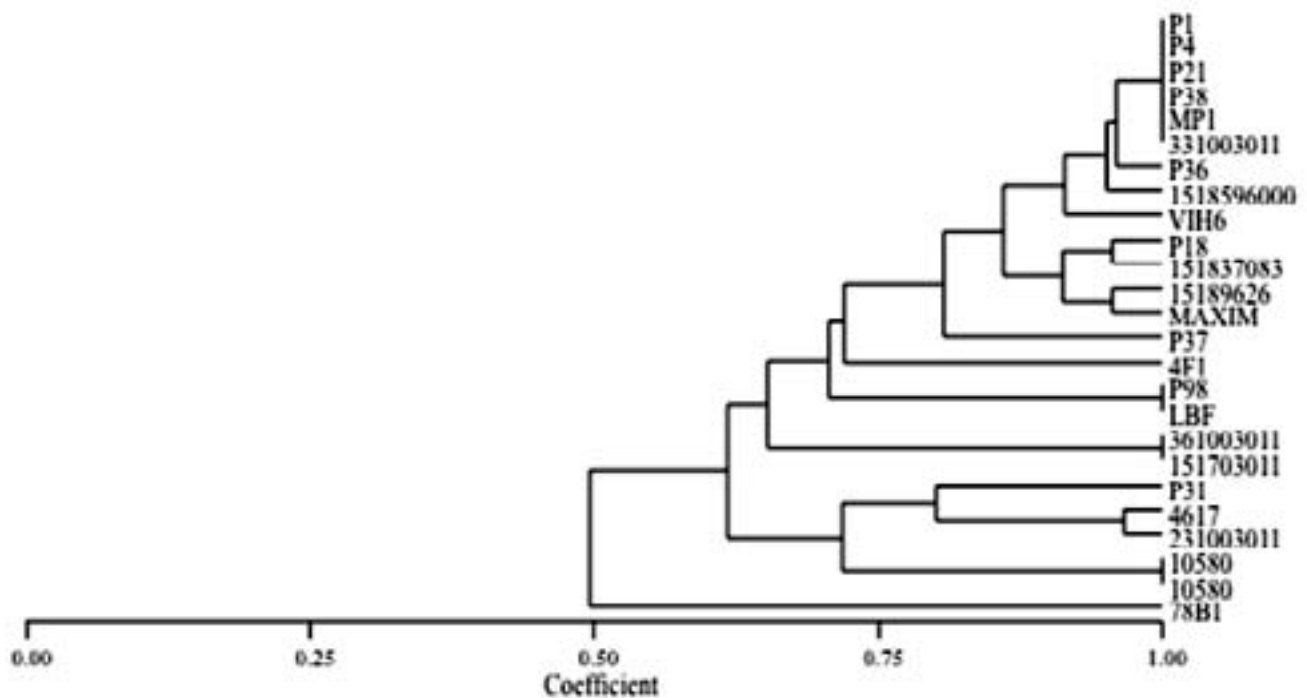


Figura 9 Dendrograma de patrones de PFGE generados por digestión con XbaI de cepas de *B. bronchiseptica*, realizada de acuerdo NTSYSpc versión 2.02

– A6 tienen una relación muy cercana y están relacionados con el tipo A idéntico, el patrón de restricción difiere de 1 a 3 bandas. El tipo B y subtipo B1 difiere del tipo A por 4 bandas, el tipo C y subtipos (C1-C7) difiere del tipo A en 6 o más bandas.

La mayoría de las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perro, presentan el patrón tipo A, las cepas Maxim y P37 tiene un patrón tipo B y B1 respectivamente. Las cepas 4F1, P98, P31, 361003011, 141703011, 231003011, 78 B1, LBF y las cepas ATCC 4617 y 10580 un patrón tipo C con sus subtipos.

El dendrograma generado por el análisis del software NTSYS a partir del patrón de restricción del DNA de las cepas de *B. bronchiseptica* (Figuras 8 Y 9), formó tres tipos principales

(A, B y C). Los subtipos A1-A6 (cepas P36, 1518596000, VIH6, P18, 151837083, 15189626) presentan una relación estrecha con el tipo A idénticas (cepas P1, P4, P21, P38, MP1 Y 331003011). En este grupo están incluidos cuatro cepas aisladas de perros de CCC y dos de perros caseros (P38 y MP1). Es importante señalar que la cepa de *B. bronchiseptica* aislada de humano (VIH6) tiene una relación cercana con once cepas aisladas de perros incluidas las obtenidas de perros caseros.

El tipo B tiene una relación menos estrecha con el tipo A. El tipo C es diferente del tipo A. Las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perros caseros (8 de las 10) presentaron un patrón homogéneo, esto es, se ubicaron en los tipos A y B.

7.0 DISCUSIÓN

7.1 MUESTREO Y AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Bordetella bronchiseptica*

Bordetella bronchiseptica es un patógeno común en el tracto respiratorio de muchos animales silvestres y domésticos (Stavely et al., 2003; Farrington y Jorgenson, 1976; Rougier et al., 2006). En perros, es agente causal de la Traqueobronquitis Infecciosa Canina (TBIC), también llamada tos de las perreras, como patógeno primario o como agente secundario después de una infección viral (Wright et al., 1973; Azetaka y Konishi, 1988). También puede causar neumonía en humanos con un estado inmunocomprometido. Se ha propuesto que la bacteria puede ser transmitida de animales enfermos (Gueirard et al., 1995) y específicamente de perro a humano (Decker et al., 1991; Huebner et al., 2006).

En el presente estudio se describe el primer intento en México de comprobar la presencia de *Bordetella bronchiseptica* en humanos con una situación de salud debilitante y la relación epidemiológica que guarda con las cepas aisladas de perro. De 114 lavados bronquiales y 9 exudados de personas con algún padecimiento clínico, así como 62 exudados nasales y faríngeos de personas sanas, se obtuvo un aislamiento de la bacteria de una persona seropositiva al VIH. Con respecto a las dos poblaciones de perro muestreadas (perros caseros y perros de CCC), se lograron 5 y 6 aislamientos respectivamente, de *B. bronchiseptica*. Con base al patrón de restricción generado por electroforesis en campos pulsados (PFGE), la cepa de *B. bronchiseptica* de origen humano está estrechamente relacionada con 12 de 21 cepas de origen canino.

Desde 1910 cuando se reportó la presencia de *B. bronchiseptica* en perros, se han publicado diversos trabajos de animales enfermos o sanos que acuden a revisión en los consultorios médicos

veterinarios, albergues, pensiones y criaderos. Por lo regular, los estudios están enfocados al aislamiento de *B. bronchiseptica* en animales confinados y su relación a brotes de TBIC.

De los trabajos reportados en donde se presentó un brote de TBIC el realizado por Bemis et al., 1976 es un estudio de una perrera que albergaba entre 300 y 400 animales; en el muestreo por aspirado traqueal de 88 cachorros obtuvieron el 11% de aislamiento *Bordetella bronchiseptica* y 12 % de 78 animales de un año de edad. Ese mismo año, Batey y Smits reportaron que *B. bronchiseptica* fue la responsable de un brote de TBIC en cachorros, pues fue aislado de todos los animales enfermos.

McClandish et al. (1978) encontraron una cifra muy alta de 40% a partir de 27 animales tomando las muestras de diversas áreas del tracto respiratorio. En 1998 Azetaka y Konishi, analizaron 33 muestras de perros provenientes de un brote de tos de las perreras en Japón, encontrando el mayor porcentaje de aislamiento (21% para adenovirus tipo 2 y 9% para *B. bronchiseptica*. Por su parte Angus et al., (1997) mostraron que de 264 perros muestreados por aspirado traqueal en un periodo de 6 años (1989-1995), obtuvieron 116 aislamientos bacterianos de los cuales el 12% correspondió a *B. bronchiseptica*. Estudios más reciente reportados por Chalker et al., 2003, Foley et al., 2004 y Mochizuki et al., 2008 mostraron porcentajes de aislamiento de 47 % (n= 152), 23 % (n= 120) y 10 % (n=68) respectivamente.

Se puede observar en los ocho trabajos antes descritos, que el porcentaje de aislamiento de *B. bronchiseptica* está en un rango de 11 a 20%. Es importante señalar cuatro aspectos relevantes: la inconstancia en el tamaño de la muestra, la edad de los perros (en su mayoría cachorros), todos los animales confinados por más de dos semanas y animales con signología de enfermedad respiratoria o diagnosticados con TBIC.

Los datos mencionados en el párrafo anterior concuerdan con el porcentaje de aislamiento reportado en este estudio, en particular para la población de perros caseros (8% n=62). Una observación considerable que se presentó fue la identificación de problemas de afecciones en vías respiratorias (rinorrea, tos, secreción mucopurulenta y anorexia) en un consultorio veterinario en donde se obtuvieron 12 exudados nasales de perros entre tres y cinco meses de edad, de los cuales 4 resultaron con *B. bronchiseptica*. Los exudados provenían de perros importados de los Estados Unidos de América que son mantenidos en el consultorio en cuestión hasta su venta.

De seis exudados que se consiguieron durante el mes de marzo se obtuvieron 3 aislamientos y uno de 6 muestras en mayo. Con excepción de dos exudados, en todos crecieron otras bacterias, una de ellas identificadas como *Pseudomona sp.*

B. bronchiseptica creció en un solo caso como cultivo puro, cepa denominada "Maxim": el animal llevaba dos tratamientos con antibióticos y continuaba con los signos. El antibiograma realizado en el laboratorio mostro que la cepa fue sensible a 3 antimicrobianos de 7 que se ensayaron. El mismo patrón se presentó en otra cepa (1518596000) aislada dos meses después.

En un trabajo anterior nosotros reportamos algo similar; de 11 muestras de perros de una escuela de entrenamiento canino con afecciones en vías respiratorias, obtuvimos 5 aislamientos de *B. bronchiseptica* (Molina et al., 2006).

Con respecto a la problemática anterior, Radhakrishnan et al., 2007 mostraron en un estudio de 7 años (1993-2002) que de 65 perros con <1 año de edad con neumonía, atendidos en un hospital veterinario, a 32 se les aisló *B. bronchiseptica*. Los mismos autores mencionan la probabilidad de que hayan adquirido la infección en una tienda de mascotas pues ahí hay contacto muy cercano entre los cachorros y mayor estrés debido a infecciones recurrentes bacterianas,

virales y parasitarias, además de cambios bruscos en el ambiente y la dieta.

En este trabajo también se reporta el aislamiento de *B. bronchiseptica* en una población de perros CCC. Desafortunadamente, no se tienen datos sobre el estado clínico de los animales a los que se les aisló la bacteria, pues el CCC de Ecatepec, Edo. Mex. de donde se obtuvo la mayoría de las muestras, no reportó problemas de TBIC. Esto explicaría el bajo porcentaje de aislamiento (1.4% n=428) de *B. bronchiseptica* en esta población. No obstante, de los escasos trabajos en los que se reporta el aislamiento de *B. bronchiseptica* en animales sanos, está el realizado por Chalker et al., 2003, quienes obtuvieron un 39% de aislamiento con una n=54, muy superior a lo encontrado en el presente trabajo.

Es justo señalar que el estudio de Chalker et al., en el 2003 se realizó en una perrera de reubicación con una historia prolongada de enfermedades respiratorias. En esta perrera los animales permanecen mínimo tres semanas, ello sugeriría que son portadores asintomáticos.

Se ha señalado que *B. bronchiseptica* forma parte del tracto respiratorio de perros (Clapper y Mende, 1963 y MacKiernan et al., 1984) por lo que el aislamiento de la bacteria puede ser común. Lo anterior no se demuestra en el presente trabajo, pues solo se lograron tener 6 aislamientos.

Esto ya se había observado por nuestro grupo de trabajo (Molina et al., 2006). Al respecto, Ueland 1990 obtuvo muestras de perros provenientes de distintas áreas geográficas de Noruega con síntomas de TBIC, encontró que la enfermedad se caracterizó por una alta infectividad y no se presentó en animales confinados o en una perrera, pues la mayoría de ellos nunca estuvieron en una. De acuerdo a sus resultados él sugiere que *B. bronchiseptica* no está involucrada en la enfermedad, pues en los muestreos realizados por lavados de faringe no se mostró su presencia, es decir, no se aisló *B. bronchiseptica*.

Por otro lado no se obtuvieron aislamientos de *B. bronchiseptica* en lavados bronquiales de pacientes del Hospital General de México. En este sentido se menciona que *B. bronchiseptica* es una bacteria que causa infecciones en el tracto respiratorio de mamíferos y raramente se aísla en muestras clínicas, sin embargo se le ha involucrado como agente causal de infecciones en el tracto respiratorio (Scully et al., 2000; Shimoni et al., 2000; Llombart et al., 2006), peritonitis (Ki-Bum et al., 2009; Hadley et al., 2009) y meningitis (Belen et al., 2003). En este trabajo se aisló una cepa de *B. bronchiseptica* (VIH6) a partir de un exudado nasal de una persona positiva al VIH, internada en la unidad de infectología del Hospital General de México, desafortunadamente no se cuenta con datos clínicos del paciente.

Se ha reportado que *B. bronchiseptica* coloniza el tracto respiratorio de cuidadores de animales (Goodnow, 1980). En este trabajo no se obtuvieron aislamientos de la bacteria en 10 exudados nasales y faríngeos de trabajadores del Centro del Control Canino de Ecatepec, en su mayoría médicos veterinarios, aún cuando la persona que realizaba trabajo administrativo cursaba con afección respiratoria crónica (tos, secreción nasal, afónica y dolor en la espalda). Estos resultados pudieran estar relacionados con el reducido número de aislamientos logrados en los perros capturados en el Centro, además de que el personal médico no está en contacto directo con los animales, quienes son sacrificados a las 48 h de su ingreso al Centro.

Con relación a lo anterior, aunque la transmisión de la bacteria de animales a humanos se ha documentado en cuidadores de animales y niños, el contacto estrecho con animales enfermos no es esencial para contraer esta infección, pese a causar complicaciones respiratorias leves y enfermedad parecida a las que provoca *B. pertussis* (Gueirard et al., 1995). Así lo demuestran trabajos en donde se documentó la transmisión nosocomial (Stevens-Krebbbers et al., 1991; Huebner et al., 2006).

Existen informes de personas que presentaron infecciones severas debido a *B. bronchiseptica* (Amador et al., 1991); la mayoría de estas infecciones involucran el tracto respiratorio y se producen en el paciente que tiene una enfermedad subyacente, y que esta inmunosuprimido (Le Costumier et al., 1995; Dworkin et al., 1999; Ner et al., 2003; Spiker et al., 2008).

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte en México del aislamiento *B. bronchiseptica* de un paciente con VIH y se suma a las escasas investigaciones dirigidas a la búsqueda intencionada de la bacteria. Son cuatro los trabajos en los que se realizó un seguimiento en un periodo de tiempo de entre 6-8 años (Spiker et al., 2008; Dworkin et al., 1999). Sobresale el tamaño de muestra utilizada y el total de aislamientos obtenidos. Como se puede observar en el Cuadro 7, el menor número de muestras fue de 874 donde los autores obtuvieron dos aislamientos (Dworkin et al., 1999). Mientras que cuando la n fue de 41,336 los aislamientos fueron 23 (Spiker et al., 2008). Es importante notar que este último dato, no discrimina *B. bronchiseptica* de *B. parapertussis*. Comparativamente con estos reportes, un buen logro de este trabajo es el aislamiento de *B. bronchiseptica* a partir de una n de 157 obtenida en dos años.

Los trabajos sobre aislamiento de *B. bronchiseptica* señalados en el párrafo anterior deben su alcance a la buena coordinación y organización entre los hospitales de cada lugar. En México, el vincular la investigación con el sector salud sobre todo en hospitales, no es una práctica fácil. Así cabe señalar que el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE) en México es una entidad encargada de la vigilancia epidemiológica de microorganismos en todo el país por tanto, están en contacto con los hospitales regionales. A él se remiten todos los aislamientos de patógenos de vigilancia epidemiológica.

vigilancia están *B. pertussis*, *B. parapertussis* y recientemente *B. holmesii*. El laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA's) es el encargado de confirmar las identificaciones de aislamientos de estas bacterias. También lleva el registro de los brotes de las infecciones de este tipo. En el IRA's se cuenta con el protocolo para la identificación de *B. bronchiseptica*, aún cuando ésta no figura como un patógeno de vigilancia epidemiológica; se menciona que hubo un aislamiento de la bacteria, sin embargo la ficha técnica y la cepa no están disponibles (QFB Guadalupe Guerrero, responsable del laboratorio, comunicación personal).

Esta investigación concuerda con que la bacteria solo se aísla de personas con un estado inmunocomprometido, puesto que en 63 exudados de personas sanas no se obtuvieron aislamientos.

B. bronchiseptica infecta a animales mascota y de granja a los que los humanos están frecuentemente expuestos, incluyendo gatos y perros. Las infecciones en humanos ocurren ocasionalmente, cuando se presentan en individuos inmunocomprometidos, aunque también se ha reportado en enfermedades relacionadas con adultos sanos y niños (Matoo y Cherry, 2005). En este estudio se consiguieron 60 muestras de personas sanas con sus mascotas, de éstas sólo se tuvo un aislamiento de una mascota (MP1), no así de los dueños.

Hay pocos datos epidemiológicos contundentes relacionados en la transmisión de *B. bronchiseptica* entre animales domésticos y humanos. Los perros y gatos son hospederos de la bacteria y frecuentemente implicados como fuente de infección a los humanos, pero mucha de la evidencia es circunstancial. De la misma forma, falta información relacionada con la potencialidad de la transmisión humano-humano. La obtención de detalles clínicos y datos epidemiológicos pareados con comparaciones genéticas de casos aislados y en contacto es necesaria para

establecer más firmemente patrones de transmisión e identificar probables riesgos de contacto.

7.2 Identificación de las cepas aisladas

El aislamiento de *B. bronchiseptica* puede realizarse en varios medios de cultivo, como MacConkey, Bordet-Gengou o Smith Baskerville. Estos medios de cultivo permiten el crecimiento de numerosos contaminantes que pueden alterar la morfología de las colonias de *B. bronchiseptica*, por ejemplo, la flora orofaríngea, nasal o la de lavados bronquiales tales como *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y Enterobacterias. Lo que dificulta el aislamiento de *B. bronchiseptica* y complica el proceso de la identificación, o bien puede que la carga bacteriana de *B. bronchiseptica* sea tan pequeña que no se pueda desarrollar y por tanto, no detectable. También es bien sabido que *P. aeruginosa* puede invadir las cajas con agar, obstruyendo la presencia de otras bacterias o producir sustancias que pueden

Cuadro 7. Aislamientos de *Bordetella bronchiseptica* en humanos en comparación con el trabajo actual.

Autor	Tamaño de muestra	Aislamientos
En el presente trabajo	151	1
Dworkin et al., 1999	41,336	9
Ner et al., 2003	5,187	6
Villuedas et al., 2004	2,064	2
Spiker et al., 2008	874	23*

impedir el crecimiento de otras bacterias (van Ba et al., 2000 citado en Bittar et al., 2010). En el presente trabajo se aislaron 12 cepas de *B. bronchiseptica* a partir de agar MacConkey en donde se pudo observar el crecimiento típico de la bacteria. Sin embargo, con la finalidad de aumentar la posibilidad del crecimiento (ver Cuadro 2), se procedió a utilizar el protocolo indicado por el laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas y Pertussis (IRAs del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (InDRE) (Figura 10). La toma de muestra se hizo con hisopos de rayón, pues estos y los de dacron, son los más adecuados para preservar a la

bacteria viva. Los ácidos grasos presentes en los hisopos de algodón pueden interferir en el crecimiento y por tanto, en la recuperación de cualquier tipo de bacteria, incluyendo *B. bronchiseptica*.

Los hisopos se colocaron en solución salina fisiológica estéril conteniendo cefalexina 40µg/ml y se transportaron en frío al laboratorio. Los exudados se sembraron en agar Bordet-Gengou suplementado al 15% con eritrocitos de carnero y MacConkey, a ambos se les agregó cefalexina 40µg/ml. Se incubaron durante 24 y 48 h a 37°C. Las colonias presuntivas de *B. bronchiseptica* se sometieron a tinción de Gram y se resembraron

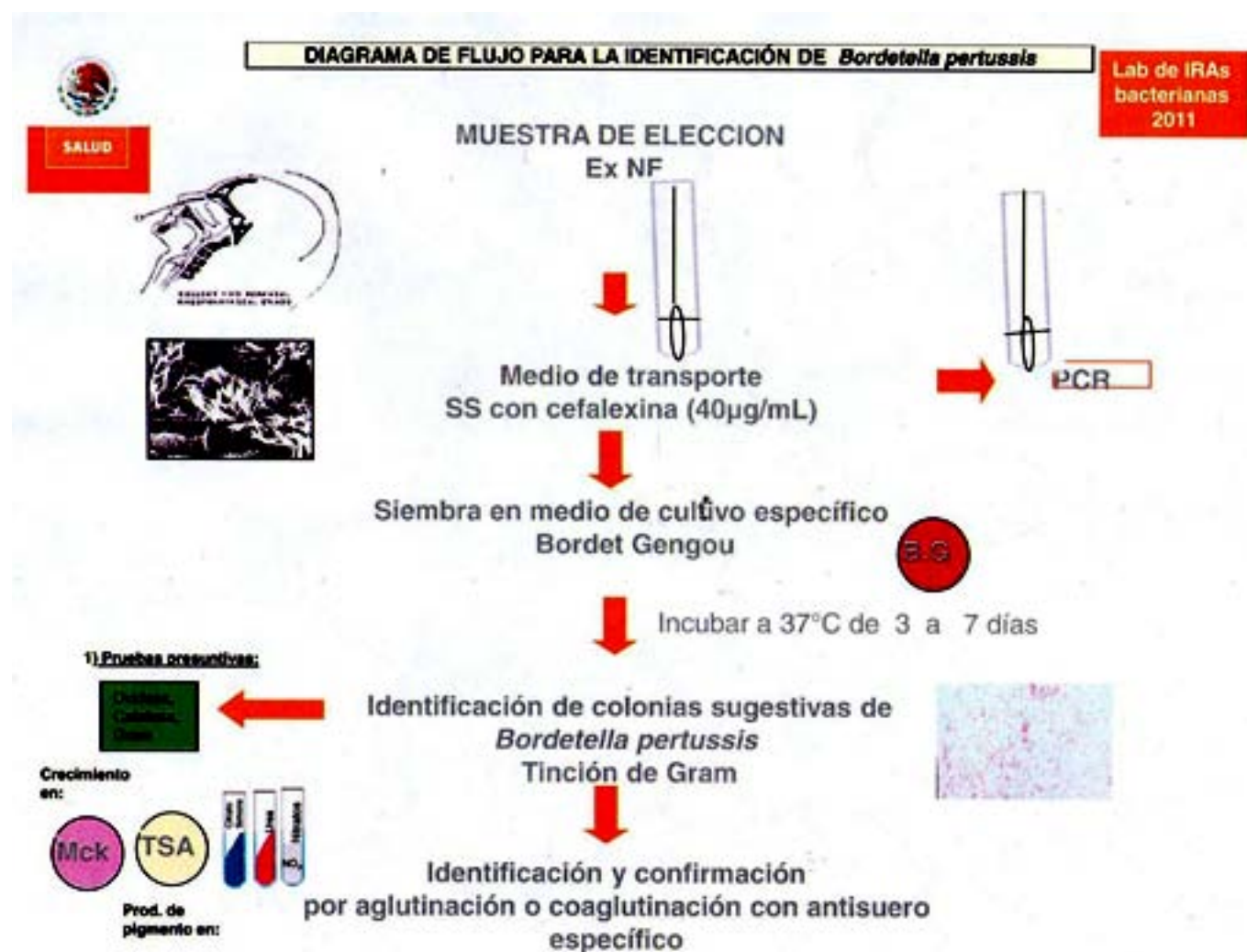


Figura 10 Esquema para la identificación de *Bordetella pertussis*, de acuerdo al laboratorio de IRAs bacterianas en el InDRE. El procedimiento aplica para tres especies del género en la que se incluye *B. bronchiseptica*.

en agar MacConkey para obtener cultivos puros.

Siguiendo el protocolo del InDRE, a las bacterias se les realizaron las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, ureasa y citrato. En este protocolo se usa el agar Bordet-Gengou que es un medio más enriquecido que la base de agar sangre utilizado en este estudio. Sin embargo, no se logró el aislamiento de la bacteria en 96 muestras, independientemente de que fueran de perros o humanos. Ambos medios, Bordet-Gengou y base de agar sangre, contienen peptonas, cloruro de sodio y se les suplementa con eritrocitos de carnero 15 y 5% respectivamente. Aún cuando Bordet-Gengou tiene una mayor cantidad de eritrocitos, la base de agar sangre, contiene infusión de músculo cardíaco que ayuda al desarrollo de la bacteria.

El uso de la solución salina fisiológica y los medios con cefalexina (40µg/ml) disminuyeron en mucho el crecimiento de otras bacterias, de tal suerte que facilitó la observación de la morfología de las colonias y por tanto la detección del crecimiento característico de *B. bronchiseptica*. De hecho, se observó crecimiento de uno o dos tipos de colonias pero sin la hemólisis β típica en Bordet-Gengou. A pesar de ello, a las colonias desarrolladas en este medio se les realizó la tinción de Gram y si la morfología correspondía a un cocobacilo parecido a *B. bronchiseptica*, se les hacía el seguimiento de acuerdo al protocolo del InDRE, pero ninguna de las sospechosas se identificó como *B. bronchiseptica*. Debido a que no se obtuvieron aislamientos de la bacteria y para descartar si la cefalexina podría estar interfiriendo con el crecimiento de la misma, se sembraron las 12 cepas aisladas y una de referencia 10580, en agar Bordet-gengou y MacConkey con cefalexina (40µg/ml). Todas crecieron en ambos medios.

La propuesta de los medios de cultivo selectivos para *B. bronchiseptica* se basa en el uso de antibióticos, pero los resultados de efectividad

de aislamiento y desarrollo de la bacteria difieren sustancialmente (Farrington y Switzer, 1977; Smith y Baskerville, 1979; Laraviere, et al 1993; IRAs, 2011). En este estudio la utilización de hisopos de algodón, caldo BIH como medio de transporte y agar MaConkey en su formulación original resultaron ser adecuados para el aislamiento de *B. bronchiseptica*.

La identificación clásica de muestras recuperadas de humanos o animales con signos de enfermedad respiratoria y que involucran a *B. bronchiseptica*, están basados principalmente sobre diferentes características morfológicas y metabólicas. Estas características incluyen la tinción de Gram, crecimiento a 37°C, actividad de enzimas (catalasa, oxidasa y ureasa), asimilación de carbono mediante el citrato, y falta de actividad sobre azúcares.

En este trabajo se identificaron 12 cepas de *B. bronchiseptica* por características fenotípicas y propiedades bioquímicas; oxidasa, catalasa, ureasa, prueba de indol y la no utilización de 10 carbohidratos. Las propiedades fenotípicas y metabólicas de las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* de perros y una de humano están de acuerdo con los datos de la literatura.

Para la identificación por pruebas bioquímicas de las cepas aisladas se utilizó el estuche miniaturizado BBL Crystal. En este, las cepas de *B. bronchiseptica* aisladas mostraron actividad de ureasa incierta, después de 48 h. Por tanto, se confirmó la actividad en tubo, por la prueba de Cristiancens y se obtuvo una reacción positiva a las 24 h. Una característica de *B. bronchiseptica* a diferencia de otras especies del género es la actividad de ureasa en un máximo de 24 h, aunque Denes et al., 2006 comprobaron la actividad de ureasa después de 48 h. Además mostraron que cepas de *B. bronchiseptica* crecidas en 20 mM de MgSO₄ fueron ureasa positiva y las crecidas en ausencia de MgSO₄ no presentaron actividad. Nosotros observamos en una misma placa el desarrollo de cepas de *B. bronchiseptica* con y sin

actividad de ureasa, esto mismo lo reportaron Khayar et al., 2011. En el presente estudio se excluyeron de la investigación cepas bacterianas que coinciden con todo el perfil morfológico y bioquímico de la bacteria pero sin actividad de ureasa.

La diversidad bacteriana de acuerdo a su origen constituye una variable difícil para los sistemas de identificación. Cepas bacterianas de la misma especie pueden variar ligeramente en sus reacciones bioquímicas. Las bacterias de origen animal, diferente al *Homo sapiens*, son de difícil identificación pues las bases de datos son muy pobres. Así que los microbiólogos y veterinarios interesados en esta área están evaluando sistemas de identificación rápida sobre la base no sólo de su costo, sino de su capacidad a dar resultados confiables y su fácil realización e interpretación. Esto permitirá la incorporación de datos a una base de datos diversa que incluya variaciones en reacciones bioquímicas de la misma bacteria (Peele et al., 1997).

Los perfiles bioquímicos de bacterias aisladas de muestras clínicas de origen veterinario varían ligeramente de las bacterias de origen humano. En este punto, Papp y Muckle (1991) evaluaron la confiabilidad del sistema Sceptor (Becton Dickenson, Diagnostic Instrument Systems, Towson, Md.) para la identificación de bacterias Gram negativas y positivas de fuentes veterinarias. Del análisis de bacterias Gram negativas no entéricas el sistema identificó correctamente al 86.4%, no identificó al 4.7%, en 3.6% de las muestras identificó incorrectamente el género e identificó incorrectamente el 5.2% a nivel de especie. Se requirió de una prueba complementaria (reducción de nitratos) para la correcta identificación de 20 aislados de *B. bronchiseptica* e incluso identificó incorrectamente una cepa, aun cuando la bacteria está en la base de datos de Sceptor. El sistema resultó ser más efectivo (92.7%) para identificar aislados de *Enerobacteriaceas*.

Los lineamientos para asegurar la aceptabilidad de sistemas de identificación bacteriana automatizada indican que el nivel de seguridad debe ser aproximadamente de 95% y que aquellas especies de importancia clínica sean consistentemente identificadas.

Entre los numerosos sistemas de identificación comercial disponibles para la identificación de bacilos Gram negativos están el API 20E (Biomeriux.Vitek, Inc., Hazelwood) y el BBL Crystal E/NFC. (Becton, Dickinson, Inc Cockey Sville Md.). Peele et al., (1997) evaluaron estos dos sistemas para la identificación correcta de bacilos Gram negativos de origen animal. Mostraron que el BBL Crystal identificó correctamente 68% de las bacterias a nivel de género y especie y no identificó el 10% de las bacterias. Mientras que el API 20 E identificó el 53% de las bacterias hasta género y especie y al 24% de las bacterias no las identificó. Los autores concluyen que ambos sistemas son capaces de identificar bacterias de muestras clínicas de origen animal, aun cuando API 20E fue diseñado para identificar bacterias entéricas Gram negativas. El estuche BBL Crystal incorpora características para la identificación de bacterias Gram negativas no fermentadoras. El estuche BBL Crystal es menos laborioso y ofrece mayor reproducibilidad en comparación con el API 20E. No obstante, la interpretación de los cambios de color son más fáciles de interpretar con el API 20E.

El uso del estuche BBL Crystal permitió la identificación de las 12 cepas de *B. bronchiseptica*, con la ayuda de pruebas complementarias como las pruebas de oxidasa, no producción de indol, y reacción de oxidación/fermentación. En general, la ventaja de los sistemas de identificación comercial es que los laboratorios de microbiología cuentan con un número basto de parámetros bioquímicos sin incrementar significativamente su labor. Sin embargo, una limitación sería de este sistema es que no cuentan con pruebas apropiadas para identificar un organismo fuera de la base de datos.

También, especies raras o cepas atípicas son incorrectamente identificadas (Papp y Muckle, 1991).

La identificación errónea de bacterias por procedimientos fenotípicos estándar es común, sumado a los errores de los equipos automatizados que no están actualizados en aislamiento de bacterias poco comunes como *B. bronchiseptica*, hace la experiencia del microbiólogo invaluable. Un claro ejemplo de esto es la errónea identificación de bacterias en muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística, principalmente con bacilos Gram negativos no fermentadores como confundir *P. aeruginosa* con *A. xylosoxidans* (Bittar y Rolain, 2010). De aquí que, la emergencia de nuevas especies del género *Bordetella* que infectan al humano hace necesario hacer uso de métodos de identificación que logren distinguir las diversas especies (Mazengia et al., 2000; Harrington et al., 2009). Aún cuando las pruebas fenotípicas son útiles para la identificación de bacterias, los métodos moleculares como la PCR seguida de la secuenciación ofrecen una alternativa verificable, poderosa y segura para la correcta identificación de bacterias, especialmente bacilos Gram negativos no fermentadores (Bittar y Rolain, 2010).

La introducción de técnicas moleculares, especialmente la amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S, para la identificación de bacterias mal identificadas o no identificadas por métodos tradicionales ha revolucionado nuestro conocimiento con la descripción de bacterias emergentes y la resistencia multidrogas (Bittar y Rolain, 2010).

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del rRNA 16S u otros genes, se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no son factores determinantes, pero si factores críticos como la extracción de DNA cromosómico

y la amplificación, procesos que deben tenerse en cuenta en toda metodología de identificación molecular en el laboratorio de microbiología. Tras la secuenciación del amplicón, la observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias.

La secuencia consenso se introduce en bases de datos online de acceso público o privado, con el objetivo de identificar la cepa mediante la comparación con las otras secuencias depositadas, en estas bases. Actualmente, la base de datos que presenta mayor número de consultas por su mayor versatilidad en organismos, orígenes, genes, y tipo y número de secuencias depositadas es la base pública GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con programas como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para el alineamiento de secuencias. Además, GenBank contiene una sección de taxonomía (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) que incluye información y secuencias sobre más de 160,000 organismos.

La comparación de secuencias se ve afectada por el tamaño de las secuencias analizadas y el tipo de alineamiento utilizado. Un consenso es aceptar que una similitud del $\geq 98.5\%$ define una especie, y tasas del 95 al 99% definen género.

En este trabajo se utilizó el gen que codifica para el rDNA 16S de cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perros. Se obtuvo un producto de PCR de 1 500 pb (Figuras 2-4), cuando se usaron los iniciadores para la amplificación del rDNA 16S del DNA de las cepas de *Bordetella bronchiseptica* previamente identificadas por características morfológicas y metabólicas.

El par de iniciadores utilizados para amplificar 1 500 pb del rDNA 16S de las 24 cepas de *B. bronchiseptica*, 21 de perro, dos ATCC y una de cerdo, solo mostraron un amplicón, la banda de cada una de las cepas se purificó y secuenció. Se analizaron los electroferogramas y en caso

necesario se editaron. La comparación de la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen rDNA 16S de las doce cepas aisladas en 2010-2011 que se realizó en el “Basic Local Alignment Search (BLAST)” de las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI/GenBank presentaron 98-99% de homología con *B. bronchiseptica*. Las secuencias obtenidas en este estudio están depositadas en el GenBank, los números de acceso se pueden revisar en los Cuadros 4 y 5. Es preciso aclarar que el número de nucleótidos fue diferente para las secuencia de algunas de las cepas (EU152962, EU152964-66, EU152968, FJ867619-21, GQ131888-89 y JQ824384), que corresponden a aislamientos obtenidos durante 1997 a 1998, lo cual es inherente a la técnica de secuenciación. Sin embargo, esto se subsano en las 12 cepas aisladas en el periodo actual de la investigación, las dos de ATCC y una de cerdo (Cuadro 5). La homología obtenida en el estudio confirma que las cepas aisladas de perro corresponden a *B. bronchiseptica*.

Es importante puntualizar que dos cepas, la 78B1 aislada de perro y la VIH6 de humano, mostraron una homología de 90 y 82% respectivamente, lo que está por debajo de lo estipulado por Bou et al., 2011, $\geq 95-99\%$ para asignarlas a nivel de género, ello se traduciría en que las dos cepas no pertenecen al género *Bordetella*, aunque los mismos autores señalan que definir la especie o el género a través de un valor (% de similitud) para el rRNA 16S puede no ser siempre muy exacto especialmente cuando se cuenta con pocas secuencias de un determinado aislamiento como es el caso del aislamiento de origen humano que estamos discutiendo.

La incorrecta asignación de género y especie puede tener varias causas, como: cuando se realiza una identificación mediante el análisis de la secuencia y su alineamiento con otras secuencias, calidad disminuida de las secuencias depositadas en la base de datos y errónea asignación de especies, ausente o baja correlación entre la identificación

genotípica y fenotípica (esto sucede cuando se encuentran genotipos idénticos o similares y diferentes fenotipos o especies con significancia clínica distinta). Esto sucede con *B. pertussis* con *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* (Bou et al., 2011).

Los blancos moleculares utilizados en los estudios taxonómicos o de filogenia han variado en los distintos géneros y distintas especies bacterianas. El análisis del rRNA 16S es el marcador inicial y en numerosas ocasiones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa (Clarridge 2004 citado en Bou et al., 2011). Sin embargo, la alta homología genética en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar solo con el rRNA 16S, una identificación a nivel de especie o de género. De tal manera que la estrategia que proponemos en este trabajo es capaz de validar la comparación del rRNA como instrumento de identificación no único sino realizado después de la ubicación adecuada del género de acuerdo a los métodos convencionales.

Con base a lo anterior y a que las propiedades morfológicas y bioquímicas de las dos cepas (78B1 y VIH6) son características de *B. bronchiseptica*, podemos decir con cierta certeza que se trata de *B. bronchiseptica*.

El gen rRNA 16S, es un gen de 1500 pb que codifica para una porción de la subunidad 30S ribosomal y que está presente en todas las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004; Petti, 2007). El análisis del rRNA 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas entre grupos de bacterias y más recientemente en la clasificación e identificación de las mismas. De hecho, en las ediciones vigentes de los dos tratados fundamentales de Bacteriología el “Bergey’s Manual of Systematic” Bacteriology” y “The Prokaryotes”, basan su organización en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula (Rodicio y Mendoza, 2004).

Ha habido intentos de aplicar la tecnología de PCR a la identificación de *B. bronchiseptica*, para lo cual se han utilizado diversas variantes como secuencias de inserción (Register y Sanden, 2006) y el de la alcaligenina *alcA* (Register y DeJong, 1999). Hasta el momento, éstos no han logrado identificar solamente a *B. bronchiseptica*, es decir, el método carece de falta de especificidad y sensibilidad. Un PCR específico para la bacteria se describió basado en la amplificación del gen que codifica para la flagelina *fla* (Hozbor et al., 1999). Sin embargo, el DNA de la misma se detectó por PCR 149 días después de la infección en ratones, además de que la especificidad de los iniciadores sólo se ha documentado para cepas de *B. bronchiseptica* de origen porcino (PAR) (Register y DeJong, 2006).

Además, el número de especies identificadas en el género *Bordetella* ha aumentado en los últimos años; y en el caso de *B. bronchiseptica*, ésta se ha aislado de nuevos hospederos que incluyen al humano (Woolfrey y Moody, 1991; Ner et al., 2003; Gross et al., 2010). En éste último caso, es importante considerar que además de las bordetelas clásicas en el humano (*B. pertussis* y *B. parapertussis*), se han aislado otros miembros de éste género como *B. holmessi*, *B. trematum*, *B. hinzi*, *B. avium* y la *B. bronchiseptica*. Dado que todas ellas pertenecen al grupo de bacterias asacarolíticas, su actividad metabólica puede confundirse con otros géneros de este grupo tales como *Alcaligenes*, *Acromobacter* y *Pseudomonas*.

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos aislado cepas con todo el perfil bioquímico característico de *B. bronchiseptica*, pero carentes de la actividad de la enzima ureasa (datos no publicados). Los métodos clásicos para la identificación de bacterias se basan en las características bioquímicas y morfológicas de cepas conocidas o de referencia y bajo condiciones óptimas de crecimiento (Petti, 2007). Sin embargo, se pueden dar casos en los que las características fenotípicas de un cierto género o especie varían

ligeramente. Por lo que la identificación molecular basada en el análisis de las secuencias del gen que codifica para el rRNA 16S resulta ser una herramienta complementaria de importancia.

7.3 Patrón de electroforesis en campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés)

En el estudio de la epidemiología molecular de la infección por *B. bronchiseptica*, se han utilizado diversas técnicas; entre ellas ribotipado (Register y Magyar, 1999; Register et al., 1997) y la amplificación polimórfica al azar del DNA (RAPD por sus siglas en inglés) (Keil y Fenwick, 1999; Shin et al., 2007). En este estudio utilizamos la PFGE ya que este procedimiento ha sido propuesto como parte del análisis molecular de cepas de *B. pertussis* (Mooi et al., 2000).

Se analizaron 21 cepas de *B. bronchiseptica*, de estas cinco corresponden a perros caseros (PC), cuatro a perros de escuelas de entrenamiento canino (EEC), seis a perros de centro de control canino (CCC), cinco a perros callejeros, una de humano (ver Cuadros 1 y 2), dos cepas ATCC 4617 y 10580, y una de cerdo LBF. El DNA de cada cepa se digirió con la enzima *XbaI* y se realizó la PFGE.

La mayoría de las cepas aisladas de perros (57.1%) incluyendo la de humano presentaron el tipo A, lo que concuerda con lo reportado por Shin et al., 2007a. y Binns et al., 1998. En el caso particular de Shin et al encontraron que 28.9% de aislados de *B. bronchiseptica* de cerdo presentaron un patrón tipo A idéntico. En este trabajo el patrón fue de 28.5% para las cepas de perro (Cuadro 6). Por el contrario, encontramos siete subtipos de C que incluyen siete cepas de perro y una de cerdo. Los mismos autores reportaron un tipo C para las cepas de referencia, entre ellas 10580, pero no para los aislados de campo. Como se observa en la Figura 9, once de las 20 cepas de origen canino y la de humano (VIH6) formaron un solo grupo con sus subtipos, lo que sugiere que son la misma cepa. Dos cepas, una aislada de perro casero

(Maxim) y una de EEC (P37) presentaron un tipo B, lo que indica que están estrechamente relacionadas con las cepas de tipo A. La cepa de origen porcino fue idéntica a una cepa de perro (P98), lo que sugeriría ausencia de especificidad de especie. En este sentido cabe mencionar que se han elaborado vacunas contra Bordetelosis canina usando cepas de origen porcino (Shin et al., 2007b).

Las cepas provenientes de perros de CCC, con excepción de una (331003011), difieren de las otras 13 de origen canino; esto podría explicarse por que son diferentes las cepas bacterianas que infectan a una misma especie animal; sin embargo hasta ahora los estudios de este tipo con cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perro, gato y cerdo indican homogeneidad de especie (Binns et al., 1998), es decir las cepas caninas pertenecen todas a un mismo grupo. Por su parte Musser et al., 1987, reportaron mayor diversidad de cepas en perro que en cerdo. Para verificar si efectivamente hay diversidad genética sería necesario ampliar nuestra colección de cepas caninas.

Cabe señalar que las cepas de *B. bronchiseptica* provenientes de EEC y de PC se obtuvieron de una sola escuela y de una clínica veterinaria, respectivamente en las que se presentó un brote de Traqueobronquitis Infecciosa Canina o Tos de las Perreras, por lo que se esperaría que fueran cepas idénticas en cada una de las poblaciones. Este hecho no se observó (Figura 9), aunque en ambos casos tres de las cuatro cepas estudiadas están relacionadas: relación muy estrecha (EEC; P38 y P36) y una posible relación (P37); relación muy estrecha (PC; 1518596000, 151837083 y 15189626) y una posible relación (Maxim). Los patrones de restricción distintos se traducen en una variabilidad genética, causada por eventos genéticos tales como mutaciones, inserciones o deleciones en el DNA (Tenover et al., 1995). La diversidad genética de cepas de *B. bronchiseptica* de origen canino ya ha sido reportada (Keil y Fenwick, 1998) no así las aisladas de gato que convivían en un albergue (Binn et al., 1988). Los

autores atribuyen la variabilidad de las cepas a la presión por vacunación, hecho que se ha constatado para *B. pertussis* (Mooi et al., 2001).

Finalmente dado que *B. bronchiseptica* se aísla de perros y humanos, se deriva la pregunta; ¿el perro constituye un reservorio para la transmisión al humano? Si la transmisión no ocurre, se podría esperar que las cepas de perro y de humano fueran distintas. En este estudio se observó que la cepa de origen humano (VIH6) está estrechamente relacionada con 11 cepas de perro en su mayoría las aisladas de perros caseros y escuelas de entrenamiento canino. Esto sugiere que es probable que el origen de la cepa sea de perro de acuerdo a lo establecido por Tenover et al., 1995. Esto podría ser reforzado si se conociera la presencia de la bacteria en mascotas (principalmente perros) que hubieran estado en contacto con el paciente, desafortunadamente se carece de esta información.

Existe solo un trabajo que ha mostrado por PFGE que una cepa de *B. bronchiseptica* aislada de una anciana con bronconeumonía fue la misma que la aislada de un conejo, que estaba en contacto con la persona (Gueirard et al., 1995). Se ha propuesto la hipótesis de la transmisión zoonótica de *B. bronchiseptica*, sin embargo hay pocos datos epidemiológicos definitivos que relacionan la transmisión de *B. bronchiseptica* entre animales domésticos y humanos. Los perros y gatos son huéspedes comunes de la bacteria y frecuentemente se les implica como fuentes de infección en humanos, pero mucha de la evidencia es meramente circunstancial (Stefanelli et al., 1997; Huebner et al., 2006; Register et al., 2011). La obtención de la historia clínica y epidemiológica de datos pareados con comparaciones genéticas de aislados de humanos y animales, que estén o no en contacto, es necesaria para establecer con mayor solidez los patrones de transmisión y así identificar posibles riesgos de contacto. Este estudio fue un primer acercamiento a esta problemática. Lamentablemente de las muestras pareadas de personas sanas 45 (n=60) y animales, solo se logró un aislamiento

de la bacteria de la mascota pero no de las cinco personas que estaban en contacto con el perro. No fue posible obtener muestras de perros de los pacientes del Hospital General de México. Por lo que es conveniente ampliar el número de muestras para establecer esta relación (perro-humano) en la población mexicana y específicamente en personas con un estado inmunocomprometido.

También es necesario ampliar la colección de cepas de perros sanos y con afecciones respiratorias. Los resultados obtenidos utilizando PFGE sumados a las características de bioquímicas y de virulencia de las cepas estudiadas (Molina et al., 2006) concuerdan con el concepto de una mínima variación genética entre cepas de *B. bronchiseptica*, de acuerdo a lo reportado con Gerlach et al., 2001.

8.0 Conclusiones

Se obtuvieron 6, 5 y un aislamientos de la bacteria en Centros de Control Canino, perros caseros y humano respectivamente.

Veintiun cepas de *Bordetella bronchiseptica* (doce de este estudio, y nueve de un estudio anterior) se identificaron por rDNA 16S y perfiles bioquímicos.

Las secuencias del gen que codifica para el rDNA 16S de veintiun cepas de *B. bronchiseptica* aisladas de perro, una de cerdo y una ATCC (10580), estan depositadas en el GenBank (NCBI).

El patrón de restricción (PFGE) de las cepas mencionadas incluyó tres tipos principales (A, B y C).

La mayoría de las cepas presentan el patrón tipo A (57%).

El 66.6% de las cepas son similares, en las que se incluyen las 5 de perros caseros, 4 de perros callejeros y 3 de escuela de entrenamiento canino.

Cinco de las 6 cepas aisladas de perros de CCC son diferentes al resto.

La cepa de *B. bronchiseptica* aislada de humano (VIH6) tiene una relación cercana con las cepas aisladas de perros, incluidas las obtenidas de perros caseros.

En virtud de que solo se pudo aislar una cepa de *Bordetella bronchiseptica* de origen humano no podemos verificar o rechazar la hipótesis original.

9.0 Literatura Citada

- Amador C., Chiner E., Calpe J.L. et al, 1991. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis. 13:771-772.
- Angus J.C., Spencer S.J., Dwight C.H., 1997. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). JAVMA 210(1):55-58.
- Armstrong K.S. y Gross R. 2007. Primary metabolism and physiology of *Bordetella* species. In *Bordetella* Molecular Microbiology. Loch C ed. Horizon Bioscience. Great Britain. pp 166-190.
- Azetaka M., y Konishi S. Kennel cough complex: confirmation and analysis of outbreak in Japan. J Vet Sci 1988; 50(4):851-854.
- Batey R.G., y Smits A.F. 1976. The isolation of *Bordetella bronchiseptica* from an outbreak of canine pneumonia. Austrian Vet J. 52:184-186.
- Bauwens J.E, Spach D.H., Schacker T.W., et al. 1992. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. J Clin Microbiol 30:458-459.
- Belen O., Campos J., Cogen P., Jantusch B. 2003. Postsurgical meningitis caused by *Bordetella bronchiseptica* 22(4):380-381.
- Bemis D.A. Carmichael L.E., Appel J.G. 1977. Naturally occurring respiratory disease in Kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. Cornell Vet. 67:287-293.
- Berkowitz D.M., Bechara R.I., Wolfenden L.L. 2007. An unusual cause of cough and dyspnea in an immunocompromised patient. CHEST 131:1599-1602.
- Binns J., Speakman A.J., Dawson S., et al. 1988. The use of pulsed-field gel electrophoresis to examine the epidemiology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from cats and other species. Epid Infect 120:201-208.
- Bittar F., Cassagne C., Bosdure E., et al. 2010. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Infection in Cystic Fibrosis Patients, France. Emergin Infectious Diseases. 16:1231-1235
- Bittar F y Rolain J-M. 2010. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect 16: 809–820.
- Borras S.M., Bonal J., Bonet R.J., et al. 1991 *Bordetella bronchiseptica* septicemia in a patient with thoracic trauma Infection 19:46-48.
- Bou F., Fernández-Olmos A., García C., et al. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infec y Microbio Clín. 9:601-608.
- Brisou P., De Jaurergruerry P., Peyrade F., et al. 1994 Sinusitis and *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in AIDS. Presse Med 23:1400.
- Clapper W.E. y Made G.H. 1963. Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dogs. J Bacteriol. 85:643-648.
- Collings L.A y Rutter, J.M.1985. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract. J. Med. Microbiol., 19 : 247–255.
- Cowan S.T, y Sterel KJ. 1985 Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Ed Continental Mex. 320p.
- Cuesta J., Hermosilla T., Gros B., et al. 1991 Pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in a patient with Crohn´s disease. Anales Med Interna 8:525-526.
- Chalker V.J., Brooks H.W., Brownlie. 2003. The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease. Vet Microbiol. 95:149-156.
- Choy K.W., Wulffraat N.M., Wolfs T.F. 1999. *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection in a child after bone marrow transplation. Pediatr Infect Dis J 18:481-483.
- Decker G.R., Lavelle J.P., Kumar P.N., Pierce P.F. 1991 Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Reviews of Infectious Diseases 13:1250-1251.
- De la Fuente J., Albo C., Rodriguez A., et al. 1994 *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient

- with AIDS. *Thorax* 49:719-720.
- Dénes A.L., Rapuntean G.H., Cuc C., et al. 2006. Biochemical test used for identification of *Bordetella bronchiseptica*. *Bul. USAMV-CN.* 63:67-70
- Diavatopoulus D.A., Cummings C.A., Schouls L.M., et al. 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *Plos Pathog* 1:45.
- Diavatopoulus D.A., Hijnen M., Mooi F.R. 2006. Adaptive evolution of *Bordetella autotransporte pertactin*. *J Evol Biol.* 19:1931-1938.
- Donato G.M., Hsia H.I., Geen C.S., Hewlett E.L. 2005. Adenylate cyclase toxin (ACT) from *Bordetella hinzii*, characterization and differences from ACT of *Bordetella pertussis*. *J Bacterial* 187:7579-7588.
- Dorittke C., Vandamme P., Hinz K.H., et al. 1995. Isolation of *Bordetella avium* -like organism from a human specimen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 14:451-454.
- Dworkin M.S, Sullivan P.S., Buskin S.E., et al. 1999. *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus infected patients. *Clin Infect Dis* 28:1095-1099.
- Englund L., Jacobbs A.A., Klingeborn B., Chriel M. 2003. Seroepidemiological survey of *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza-2 virus in dogs in Sweden. *Vet. Rec.* 152:251-254.
- Espino A.R., Gascon L.F., Amor T., et al.1992 Bacteremia caused by *Bordetella bronchiseptica* in the course of inflammatory tinea capitalis. *An Esp Pediatr* 36:323-325.
- Fabiene T., Girault C., Chevron V., et al. 1996. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia with shock in an immunocompetent patient. *Scan J Infect Dis.* 28:197-198.
- Farrington D.O. y Jorgenson R.D. 1976. Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* in certain wild mammals and birds in central Iowa. *J of Wildlife Dis.* 12:523-525.
- Farrington D.D. y Switzer N.P. 1977. Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atropic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. *J Am Assoc.* 170:34-36.
- Fry N.K., Duncan J., Malnick H., Warner M., Smith A.J. Jackson M.S. Ayob A. 2005. *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1131-1133.
- Foley, J.E., Rand, C., Bannas, M.J., Norris, C.R. and Milan, J. 2002. Molecular epidemiology of feline bordetellosis in two animal shelter in California, USA preventive. *Vet. Med.* 54:141-156.
- Galeziok M., Ingram R., Passalacqua J.A. 2009 *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a man with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *J Med Case Reports* 3:1-3.
- García San Miguel L., Quereda C., Martinez M., Martin-Davila P., Cobo J., Guerrero A. 1998 . *Bordetella bronchiseptica* cavitory pneumonia in a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:675-676
- Gerlach G., von Wintzingerode F., Middendorf B., Gross R. 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Micro and Infect* 3:61-72.
- Gerlach G., Janzen S., Beier D., Gross R. 2004. Functional characterization of the BvgAS two component systems of *Bordetella holmesii*. *Microbiology* 150:3715-3729.
- Gisel J.J., Brumble L.M., Johnson M.M. 2010 *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a kidney-pancreas transplant patient after exposure to recently vaccinated dogs. *Transpl. Infect Dis* 12:73-76
- Goodnow R.A. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* 44:722-738.
- Gómez L., Graziutti M., Sumoza D., Beran M., Rolston K.1998 Bacterial pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 26:1002-1003.
- Gueirard P., Weber C., Le Coustumeir A., Guiso N. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animal. Persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol* 33:2002-2006.
- Hadley K., Torres M.A., Moran J., Schiller B. 2009. *Bordetella bronchiseptica* peritonitis be ware of the dog! *Peritoneal Dialysis International*

29:670-680.

-Harrington A.T., Castellanos J.A., Ziedalski T.M., Clarridge III J.E., Cookson B.T. 2009. Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella atrain* from patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis.* 12:72-74.

-Hinz K.H., Glunder G., Luders H. 1978. Acute respiratory disease in turkey poultts caused by *Bordetella bronchiseptica* -like bacteria. *Vet. Rec.* 103:362-263.

-Hozbor D., Fouque .F, Guiso N. 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 150:333-341.

-Huebner E., Christman B., Dummer S., et al. 2006 Hospital-acquired *Bordetella bronchiseptica* infection following hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 44:2581-2583.

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

-Kranz R.G. Beckett, C.S., Goldman B.S. 2002 Genomic analysis of bacterial respiratory and cytochrome c assembly systems: Bordella as model for the system II cytochrome c biogenesis pathway. *Res. Microbiol.* 153:1-16.

-Keil, D. and Fenwick, B.1998. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *JAVMA* 212:200-207.

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

-Ki-Bum W., Gyoun-Yim H.A., Joon-Seup K., et al. 2009 Relapsing peritonitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in continuous ambulatory peritoneal dialysis patient: a case report. *J Korean Med Sci* 24(Suppl 1):S215-S218.

-Kerstens, K., Hinz, K.H., Hertle, A., Segers, P., Lievens,A., Siegmann, Oy De Ley, J. 1984. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst., Bacterial.*34: 56-70.

-Kloos W.E., Dobrogosz E.J., Ezzel J.W., et al. DNA-DNA hybridization, plasmid, and genetics exchange

in the genus *Bordetella*. International Symposium on Pertussis, Dept. of Health, Education and Welfare, US Government. Washington DC. 60-70.

-Ko K.S. Peck K.R., Oh W.S., et al. 2005. New species of *Bordetella* , *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbio.* 43:2516-2519.

-Kranz R.G. Beckett C.S., Goldman B.S. 2002. Genomics analyses of bacterial respiratory and cytochrome c assembly systems: *Bordetella* as a model for the system II cytochrome c biogenesis pathway. *Res. Microbiol.* 153:1-6.

-Lariviere S., Leblank L., Mittal K.R. Martineau G.P. 1993. Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *J Clin Microbiol.* 31:364-367.

-Lorenzo-Pajuelos B., Villanueva J.L, Rodriguez-Cuesta J., 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* 40:3146-3154.

-Lorre III V., Bfrennan P.J., Wadlin J., et al. 2001 Infected branchial cleft cyst due to *Bordetella bronchiseptica* in an immunocompetent patient- *J Clin Microbiol* 39(11): 4210-4212.

-Lows F.J., Rademaker J.L.W., De Bruijn F.J. 1999. Three Ds of PCR base genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Ann Rev Phytopathol* 37:81-125.

-Llombart M., Chiner E., Senent C. 2006. Necrotizing pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in an immunocompetent woman. *Arch Bronconeumol.* 42:255-6.

-Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganism.* Ed. Prentice Hall, 10 ed., E.U.A .

-Matoo S. y Cherry D. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due *Bordetella pertussis* and other subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:326-382.

-McCandlish J.A.P., Thompson A., Cornwel K.J.C., Wright N.G. 1978. A study of dogs with

- kennel cough. *Veterinary Record*. 102:298-301.
- Mc Gowan J. 1911. Some observations on a laboratory epidemic principally among dogs and cats, in which the animals affected presents the symptoms of the disease called "distemper". *J Pathol Bacteriol*. 15:372-426.
- Mazengia, E., Silva, E.E., Peppe, J.A. et al. 2000. Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulin strain. *J. Clin. Microbiol*. 38:2330-2333
- Mazumder S.A. y Cleveland K.O. 2010. *Bordetella bronchiseptica* bacteremia in a patient with AIDS. *South M J*. 103:934-935.
- McKiernan B.C, Smith A.R. Kissil M. 1984. Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. *J Am Hosp Assoc*. 20:139-142.
- Merchand I.A. y Parker P.A. 1984. Bacteriología y virología veterinarias. Ed Acribia España pp 34-347.
- Meznar R., Guiso N., Micheler C., et al. 1993. Isolated of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:304-306.
- Mochizuki M., Yachi A., Oshima A., Ishida T. 2008. Etiologic study of respiratory infections of household dogs. *J Vet Med Sci* 70:563-569.
- Moissenet D., Bingen E., Arlet G., Vu-Thien. 2005. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of "Pseudomonas-like" isolates from sputum of patients with cystic fibrosis. *Pathol. Biol*. 53:500-502.
- Molina, G.M., Rosales, M.E., Barcenas, M.G. y Montaraz, C.J.A. 2006. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. *Vet. Mex*. 37:313-325.
- Monack D.M y Falkow S. 1993. Cloning of *Bordetella bronchiseptica* urease genes and analysis of colonization by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model. *Mol Microbiol* 10: 545-553.
- Mooi F.R., Jansen W.H., Brunings H., et al. 1992. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microbiol Pathog*. 12:127-135.
- Mooi F.R., Jansen, H., Brunning, H., et al. 1992. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Micro Pathog* 12:127-135.
- Mooi F.R., Hallander H., Wirsing von König C.H., et al. 2000. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19:174-181.
- Mooi F.R., van Loo, H., King A.J. 2001. Adaptation of *Bordetella pertussis* to vaccination: a cause from its reemergence. *Emergent Infect Dis* 7(3 suppl):526-528.
- Musser J.M., Bemis D.A., Ishikawa H y Selander R.K. 1987. Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. *J. of Bact*. 169:2793-2803.
- Ner Z., Ross L.A, Horn M.V., et al. 2003 *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant*. 7:413-417.
- Ngom., A., Boulanger D., Ndiaye T., et al. 2006. Domestic animals as carriers of *Bordetella* species in Senegal. *Vector- Borne and Zoonotic disease*. 6:179-182.
- Nicolet J. 1985. Compendio de bacteriología veterinaria. Ed Acribia España. pp 91-95.
- Papp J.R. y Muckle. 1991. Evaluation of the sceptor system for identification of bacteria of veterinary origin. *J Clin Microbiol*. 29:10-15.
- Parton, R. 1996. New perspective *Bordetella* pathogenicity. *J. Med. Microbiol*. 44:233-235.
- Peele, D., Bradfield, J., Pryor, W., Vore, S. 1997. Comparison of identifications of human and animal source Gram- negative bacteria by API 20E and Crystal E/NF systems. *J. Clin. microbiol*. 35:213-216.
- Petrocheilou-Paschou V., Georgilis K., Kostis .E, et al. 2000 Bronchitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in an elderly woman. *Clin Microbiol Infect* 6:147-148.
- Porter J.F. Parton R., Wardlaw A.C. 1991. Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural

- waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1202-1206.
- Proom, H. 1955. The minimal nutritional requirements of organisms of the genus *Lopez*, *J. Gen. Microbiol.* 12:63-75.
- Ramirez G.A., Espinosa de los M.A., Rodriguez F., et al. 2003. Left ventricular outflow tract-right atrial communication (Gerbode type defect) associated with bacterial endocarditis in a dog. *Vet. Pathol.* 40:579-582.
- Rath B.A., Register K.B., Wall J, S. et al. 2008. Persistent *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in an immunocompetent infant and genetic comparison of clinical isolates with kennel cough vaccine strain. *CID* 46(15):905-908.
- Register, K.B., Boisvert, A., Ackerman, M.R. 1997. Use of ribotyping to distinguish *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Int. J. Syst. of Bact.* 47:678-683.
- Register B.K., y Dejong K.D. 2006. Analytical verification of multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet Microbiology* 117:201-210.
- Register K.B. 2004. Comparative sequence analysis of *Bordetella bronchiseptica* pertactin gene (prn) repeat region variants in swine vaccines and field isolates. *Vaccine* 23:48-57.
- Register K.B., Sukumar N., Palavecino E.L. et al. 2012. *Bordetella* in a paediatric cystic fibrosis patient; posible transmission from a household. *Zoonoses and Public Healt.* 59:46-50.
- Register K.B, y Sanden G.N. 2006. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol.* 44:4577-4583.
- Reina J., Bassa A., Llompart . , Borreli N., Gomez J., Serra A. et al. 1991 Pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* in a patient with a thoracic trauma. *Infection* 19: 46-48.
- Reisch U., Lehn N., Sanden G.N., y Loeffelholz M.J. 2001. Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J. Clin Microbiol.* 39:1963-1966.
- Rodicio M.R, y Mendoza M.C. 2004 Identification of bacteriak through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22:238-245.
- Rougier S., Galland D., Boucher S., Boussarie S., Vallé M. 2006. Epidemiology and susceptibility of bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. *Vet Microbiol.* 115:192-198.
- Savelkoul, P.H.M., Kerf, D.P.G. Willems, R.J., Mooi, F.R., vander Keijst, B.A.M. and Gaastra, W. 1996. Characterization of the fim2 y fim3 fimbrial subunit genes of *Bordetella bronchiseptica*: Roles of fim2 y fim3 fimbriae and flagella in adhesion. *Infect Im.* 64:5098-5105.
- Sebahia M., Preston A. Maskell D.J. et al. 2006. Comparison of the genome sequence of the poultry pathogen *Bordetella avium* with those of *Bordetella bronchiseptica*, *B. pertussis*, and *B. parapertussis* reveals extensive diversity in surface structures associated with host interaction. *J Bacter.*188:6002-6015.
- Scully R.E., Mark E.J., McNeely W.F. et al. 2000. Case records of the Massachusetts General Hospital. *The New England J Medicin.* 342(19):1430-1438.
- Shashidhar, B.Y. 1983. Serologic survey for *Bordetella bronchiseptica* in Nebraska specific-pathogen-free pig. *Am. J. Vet. Res.* 44:1123-1125.
- Shimoni Z., Nive M., Mosenkis M. y Greif J. 2000. Fatal pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica*. *IMAJ.* 2:402-4023.
- Shin, E-K., S., Seo, Y-S., S., Hee, H.J., y Hahn, T-W. 2007a. Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFG. *J. Vet. Sci.* 8:65-73.
- Shin E-K., Jung, R., and Hahn, T-W. 2007b. Polymorphism of pertactin gene repeat region *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs. *J.Vet.Med.Sci.* 69(7):771-774.
- Smith I.M. y Baskerville. 1979. A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. *Res Vet Sci.*

27:187-192.

-Stavevely C.V., Register K.B., Miller M.A., Brockmeimer S.L. Jessup D.A. ang S. 2003. Molecular and antigenic characterization of *Bordetella bronchiseptica* isolated from a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*) with severe suppurative bronchopneumonia. J Vet Invest. 15:570-574.

-Stefanelli P., Mastrantonio, P., Hausman, S.Z., et al. 1997 Molecular characterization of two *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from children with coughs J Clin Microbiol. 35:1550-1555.

-Stevens-Krebbbers A.H.W., Scouten M.A., Janssen J., Horrevorts A.M. 1991. Nosocomial transmission of *Bordetella bronchiseptica*. J Hosp Infect. 43:323-324.

-Spiker T., Liwienski A.A., LiPuma J.J. 2008. Identification of *Bordetella* spp in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect. 14:504-506.

-Switzer W.P., Mare C.J. Hubbard E.O. 1966. Incidence of *Bordetella bronchiseptica* in wildlife and man in Iowa. Am J Vet Res. 27:1134-1136-

-Tamion F., Girault C., Chevron V., et al. 1996 *Bordetella bronchiseptica* pneumonia with shock in an immunocompetent patient. Scand J InfectnDis. 28:197-198.

-Tenover F.C., Arber R.D., Goerin R.V., et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33(9):2233-2239.

-Torrey, J.C. y Rahe, A.H. .1913. Studies in canine distemper. J.Med.Res. 27:291-364.

-Tuomanen E., Pollack H., Parkinson A., et al. 1988. Microbiological and clinical significance of a new property of defective lysis in clinical strains of pneumococci. J. Infect. Dis. 158:36.

-Ueland k. 1990. Serological, bacteriological and clinical observations on outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. Vet. Record. 12:481-483.

-Valencia M.E., Enriquez A., Camino N., Moreno V. 2004. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia

in patients with HIV. Enferm Infecc Microbiol Clin.22: 502-503.

-Vandamme P., Heyndrickx M., Vancanneyt M., et al.1996. *Bordetella trematum* sp. Nov., isolated from wounds and ear infections in human, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and -Tang. 1983. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:849-858.

-Vandamme P., Hommmmez J., Vancanneyt M., et al. 1995. *Bordetella hinzii* sp. Nov., isolated from poultry and humans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:37-45.

-van der Zee, Groenendijk H., Peeters M., Mooi F.R., 1996 The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetics relationship. J Syst Bacteriol 46: 640-647.

-Viejo G., De La Iglesia P., Otero L.I., et al. 2002 *Bordetella bronchiseptica* pleural effusion in a patient with AIDS. Scand J Infect Dis 34:628-629.

-Villuedas M.C., Lopez A.L., Moles B., Revillo M.J. 2004 *Bordetella* spp. Infection: a 19-year experience in diagnosis by cultura. Enferm Infecc Microbiol Clin .22:212-216.

-Von Wintzingerode C.H., Schattke A., Siddiqui R.A., et al. 2001. *Bordetella petrii* sp. nov. isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. Int. J Evol Bacteriol. 51:1257-1265.

-Walet F., Perez T., Armand S., et al. 2002 Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a cystic fibrosis patient: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. J Clin Microbiol 40:2300-2301.

-Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., et al. 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov. a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol. 33:1-7.

-Winters J.L., O'Connor W.N., Broughton R.A., Noonan J.A. 1992 *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with Down's syndrome: a case report and review. Pediatrics 89:1262-1265.

53 -Woolfrey B. y Moody J. 1991 Human infections

associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol. 4:243-255.

-Wright N.G., Thompson H., Taylor D., Cornwell H.J.C. 1973. *Bordetella bronchiseptica* are -assessment of its role in canine respiratory disease. Vet Rec. November: 686-487.

-Yih W.K., Silva E.A., Ida J., et al. 1999. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. Emerg Infect. Dis.5:441-443.

-Zuabi T., Faivisevitz A., Alkan M.L. 1999 Severe pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica* (diabetes and healed TB) Harefuah 137:189-190.

Full Length Research Paper

The identification of *Bordetella bronchiseptica* from canine isolates of sequencing 16S ribosomal DNA

Molina-González María Graciela^{1,2*}, Torres-Márquez M Eugenia^{3*}, Monsalvo-Reyes Cruz Alejandro¹, De la Torre-Almaraz Rodolfo¹, Bárcenas-Morales Gabriela² and Montaraz Juan Antonio²

¹Unidad de Biotecnología y Prototipos, FESI-UNAM, Av. De los Barrios # 1 Los Reyes Iztacala Tlalnepantla Edo. México.

²Laboratorio de Inmunología FESC-UNAM. Av. Primero de Mayo S/N Col. Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli Edo. de México.

³Biochemistry Department, School of Medicine, Apdo. Postal 70-159, DF. UNAM, Mexico.

Received 20 March, 2013; Accepted 14 November, 2013

The amplification and sequencing of 16S rDNA are useful tools to identify important bacteria that cause diseases in the respiratory tracks of a variety of domestic animals. *Bordetella bronchiseptica*, one of such bacterium, has demonstrated some changes in its metabolic core, generating a greater need for identification through amplification and sequencing of 16S rDNA. We applied this methodology to eleven nasal and pharyngeal isolates from dogs to detect *B. bronchiseptica*. Eight strains were completed from which seven showed 98-99% homology; and three strains were only partially sequenced. All eleven strains sequences were deposited in the GenBank (NCBI). What we found was that the sequencing of *B. bronchiseptica* 16S rDNA is an excellent tool that certifies conventional methods of identification and avoids environmental challenges.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*, 16S rDNA, canine bacteria.

INTRODUCTION

Bordetella bronchiseptica is a commensal bacterium that has been isolated from the respiratory tracts of various domestic species, such as pigs, dogs, cats, rabbits, sheep, goats, horses, rats, hamsters and guinea pigs (Dawson et al., 2000; Abdoulaye et al., 2006; Rougier, 2006). It is associated with the clinical diseases atrophic Rhinitis in pigs (Pedersen, 1975; Ross et al., 1997) and Canine Infectious Tracheobronchitis or kennel cough

(Keil and Fenwick, 1998; Mochizuki et al., 2008). This last disease is an illness that affects dogs of all age groups whether house pets or in kennels. Crossed transferences among species, such as dogs to cats (Foley et al., 2002), or rabbits to humans (Gueirard et al., 1995), have been observed. Since *B. bronchiseptica* has also been isolated from humans who suffer from compromised immune responses (Woolfrey and Moody, 1991; Ner et al., 2003;

*Corresponding authors. E-mail: marias@unam.mx and metorres@unam.mx. Tel/Fax: 525556231225.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Table 1. Strains of *B. bronchiseptica* used in this study.

Strain	Source	Homology* (%)	GenBank access no.
151837083	Pet dog	99	JQ953661
151829626	Pet dog	99	JQ953654
Maxim	Pet dog	98	JQ953662
1518596000	Pet dog	98	JQ953656
MP1	Pet dog	99	JQ953657
231003011	Stray dog	99	JQ953652
331003011	Stray dog	98	JQ953655
361003011	Stray dog	98	JQ953663
151703011	Stray dog	98	JQ953653
78B1	Stray dog	85	JX129161
4F1	Stray dog	99	JQ953651
4617	ATCC†	ND‡	ND‡
10580	ATCC	98	JQ953658

*With respect to sequences already deposited in the GenBank. †American Type Culture Collection. ‡Not determined. The nucleotide sequences were aligned with those available in the GenBank (National Center for Biotechnology Information) data base (www.ncbi.nlm.nih.gov) using the Basic BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) software. The sequences were deposited in the GenBank, and accession numbers were issued.

Wernli et al., 2011), it is important to analyze strains that are present in dogs to determine whether they are a source of contagion for people.

B. bronchiseptica is commonly found through conventional methods, that is, colony and microscopic morphology and biochemical profiles (Rath et al., 2008). However, culture conditions may affect the phenotypic and biochemical characteristics, leading to false-negative results.

The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the identification of *B. bronchiseptica* has become more widely used. Thus, various primers such as those amplifying insertion sequences and gene coding for alcaligenin *alcA*, (Register and De Jong, 2006; Register and Sanden, 2006) and flagellin gene *flaA* (Hozbor et al., 1999) have been tested; however, the lack of specificity limits their use.

The amplification, sequencing and comparison of the gene coding for 16S ribosomal RNA (16S rDNA) have become useful in bacterial taxonomy. Essential for survival, ribosomal genes are highly conserved in bacteria, and help guarantee success as a means of identification. This genetic material is not as sensitive to environmental conditions as morphology and metabolic signatures.

In a previous work, there were partial sequencing (aprox 500 pb) for 16S rDNA *B. bronchiseptica*, canine gene isolates deposited at GenBank by our group and O'Connor SP (GeneBank Access number NR_024949). We reported a series of eight full sequences and three partial sequences (750-800 pb) after applying the 16S rDNA gene sequencing technology on *B. bronchiseptica* isolates from pet and stray dogs. The aim of this work was to provide several 16S rDNA sequences for *B.*

bronchiseptica. After identification through conventional bacteriological procedures, the amplification and sequencing methodology should provide an accurate identification of *B. bronchiseptica*.

METHODOLOGY

The isolates used in this work are listed in Table 1. From the eleven pharyngeal and/or nasal canine isolates, five were collected from pet and six from stray dogs captured by the Centers for Canine Control (CCC) in the Mexico City metropolitan area. The two reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) were 4617 and 10580.

The isolates were subjected to a panel of biochemical tests that included oxidase, catalase and gelatinase activity, as well as some metabolites such as indol (Cowan and Steel, 1974). Urease activity as well as carbohydrate fermentative metabolites were determined by means of a miniaturized BBL Crystal enteric/nonfermentative ID kit.

Isolates were grown on Brain Heart Infusion (BHI) agar for 48 h at 37°C. A bacterial suspension adjusted to 1.5×10^9 CFU/ml of PBS was centrifuged at 1000 g for one minute. The DNA was extracted using a DNAeasy Blood and Tissue kit, according to the manufacturer's instructions.

The 16S rDNA region was PCR amplified with the universal primer pair RD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) and FD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), according to Louws et al. (1999). 100 ng of total DNA from each isolate was used for the reaction. The reaction buffer contained 20 mM Tris HCl (pH 8), 2.5 mM MgCl₂, 2.5 units of Taq DNA polymerase 0.5 µmol of each primer and 0.2 mM dNTPs.

The mixture was placed in a 2720 thermocycler with an initial denaturation step for 3 min at 94°C. Then, the mixture underwent 30 additional cycles, each consisting of a denaturation for 1 min at 94°C; an annealing for 30 s at 55°C; and an extension for 2 min at 72°C. The reaction ended with a one-step extension for 7 min at 72°C, and it was stored at 4°C. PCR products (20 µl each) were

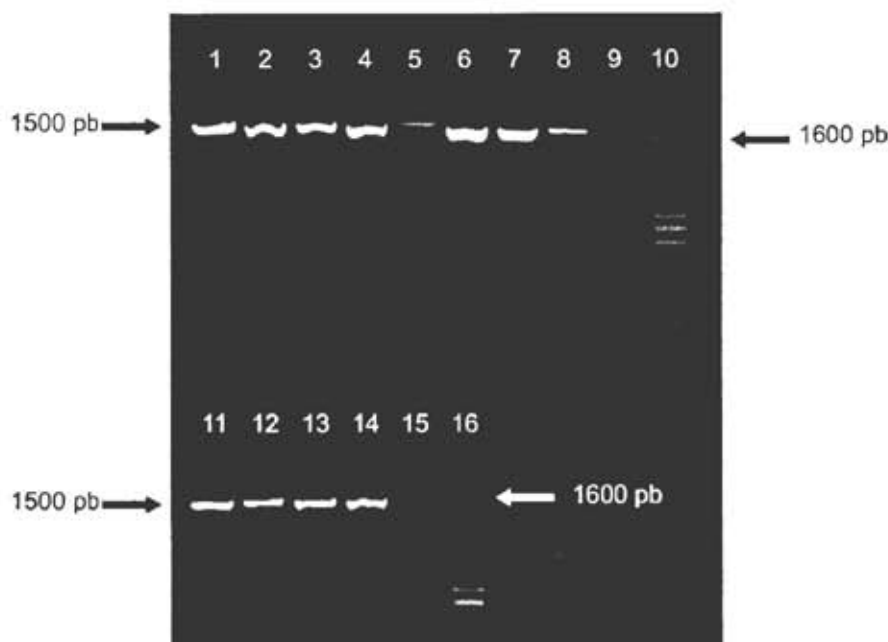


Figure 1. *Bordetella bronchiseptica* strains 16S rDNA PCR products. Lanes: 1– 231003011, 2– 151703011, 3– 331003011, 4– 361003011, 5– 10580 ATCC, 6– 78B1, 7– VIH6, 8– 151837083, 10– Biomarker 1Kb, 11– 151829626, 12– Maxim, 13– 1518596000, 14– MP1, 15– negative and 16– Biomarker 1 Kb. Lane 7 shows the PCR product from a DNA isolate that is not included in this paper.

analyzed by 1% agarose gel electrophoresis, visualized and documented.

For sequencing, the PCR products were purified with Wizard kits, according to the manufacturer's instructions. The amplicons were sequenced using a 3100 Genetic Analyzer. Nucleotide sequences were compared with those available in the GenBank (National Center for Biotechnology Information) database (www.ncbi.nlm.nih.gov) using Basic BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) software.

Comparison of 16S rDNA regions V4-V5 (Sun et al., 2013), were performed using the ClustalW software (Larkin et al., 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

All isolates, including the ATCC reference strains, were identified morphologically as *B. bronchiseptica*, this is, all showed Gram-negative coccobacillary microscopic morphology. Most of the strains, certainly the ATCC reference strains, complied with the whole metabolic pattern and the corresponding enzyme activities (Cowan and Steel, 1974). They expressed oxidase and catalase activities and degraded citrate. But, they did not ferment any of the ten carbohydrates tested (arabinose, mannose, sucrose, melibiose, rhamnose, sorbitol, mannitol, adonitol, galactose and inositol), neither did they produce indol. The strains showed urease activity, although in some isolates the activity was uncertain even after 48 h of incubation. Since this enzymatic activity is a key property that distinguishes *B. bronchiseptica* from other

species within its genus (Dénes et al., 2006), the expression was corroborated with the Christensen's tube method (MacFaddin, 2000). These measurements indeed confirmed very low quantities of urease. It is important to point out that urease activity may be regulated by culture medium composition, for example, by some $MgSO_4$ salts (Dénes et al., 2006). Urease activity is one aspect of the metabolism of *B. bronchiseptica*, which occasionally generates misleading results when using only a biochemical and metabolic criteria, raising the need of molecular identification or confirmation as described in this paper.

The 16S rDNA is a gene present in all bacteria with 1500 bp coding for a portion of the 30S ribosomal subunit. The analysis of 16S rDNA has been widely used to establish the phylogenetic relationships among bacterial groups (Garrity et al., 2005; Trüper and Schleifer, 2006). The eleven isolates of *B. bronchiseptica* and the two ATCC reference strains produced an amplicon of 1500 bp with the primer pair FD1 and RD1 described by Louws et al. (1999) (Figure 1). From the eleven isolates, eight complete sequences were obtained and submitted to GenBank for identification. The remaining three sequences were obtained with one of the primers (FD1), with average sizes of 750 to 800 bp and were also submitted. The sequences were deposited in the GenBank under the following accession numbers: JQ953661-63, JQ953651-57, JQ9536559 and JX129161 (Table 1). All but one of the whole sequences showed 98-

	516	531	546	561	576	590
JQ953652	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953653	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953656	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953657	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953661	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953662	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953663	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGG -T	GCAAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JX129161	GTGCCAGCAGCCGGG	GTAATACGTAGGGT	GCGAGCGTTAATCGG	AATTACTGGGGGTAA	AGCGTGCCGACGGCGG	
JQ953652	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCA -GGC	TT-ACCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953653	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCAAGGC	TT-ACCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953656	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCAAGGC	TTAACCCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953657	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCA -GGC	TT-ACCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953661	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCAAGGC	TTAACCCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953662	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCA -GGC	TT-ACCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953663	TTGGGAAAGAAAGAT	GTGAAATCCCA -GGC	TT-ACCTTGGAACTG	CATTTTITA -CTACCG	GGCTAGAGTGTGTCA	
JX129161	STTTGTAAGACAGAG	GTGAAATCCCA -GGC	TTCACTTGGAACTG	CCTTTGTGACTGC -A	GGCTAGAGTGTGTCA	
JQ953652	⁶⁶⁶ GAGGGAG -TGGAAAT	⁶⁶¹ GAATTCGGCGTGTG	⁶⁹⁶ GCAGTGAATGCGT -A	⁷¹¹ GATATGCGGAGGAAC	⁷²⁶ ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953653	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGT -A	GATATGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953656	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGT -A	GATATGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953657	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGT -A	GATATGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953661	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGT -A	GATATGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953662	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGT -A	GATATGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953663	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGT -A	GATATGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JX129161	GAGGGAG -TGGAAAT	GAATTCGGCGTGTG	GCAGTGAATGCGTAA	AATTTGCGGAGGAAC	ACCGATGGCGAAAGGC	
JQ953652	⁷⁴¹ AGCC -TCTGGGATA	⁷⁵⁶ GACGCTCATGCAAG	⁷⁷¹ AAGCGTGGG -GAGCA	⁷⁸⁶ ACAGGATTAGATAAC	⁸⁰¹ CTGGTTAGTCCACGC	⁸¹⁵
JQ953653	AGCC -TCTGGGATA	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JQ953656	AGCC -TCTGGGATA	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JQ953657	AGCC -TCTGGGATA	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JQ953661	AGCC -TCTGGGATA	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JQ953662	AGCC -TCTGGGATA	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JQ953663	AGCC -TCTGGGATA	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JX129161	AATC -CTTGGGCT	GACGCTCATGCAAG	AAGCGTGGG -GAGCA	ACAGGATTAGATAAC	CTGGTTAGTCCACGC	
JQ953652	⁸¹⁶ CCTTAAACGATGTCA -	⁸³¹ CTAGCTGTTGGGGCC	⁸⁴⁶ TTGGGGCCTTGGTTA	⁸⁶¹ GCGCAGCTAACGGGT	⁸⁷⁶ GAAGTTGACCGCTG	⁸⁹⁰
JQ953653	CCTTAAACGATGTCA -	CTAGCTGTTGGGGCC	TTGGGGCCTTGGTTA	GCGCAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JQ953656	CCTTAAACGATGTCA -	CTAGCTGTTGGGGCC	TTGGGGCCTTGGT -A	GCGCAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JQ953657	CCTTAAACGATGTCA -	CTAGCTG -TGGGGCC	TTGGGGCCTTGGT -A	GCGCAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JQ953661	CCTTAAACGATGTCAA	CTAGCTGTTGGGGCC	TTGGGGCCTTGGT -A	GCGCAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JQ953662	CCTTAAACGATGTCA -	CTAGCTGTTGGGGCC	TTGGGGCCTTGGTTA	GCGCAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JQ953663	CCTTAAACGATGTCA -	CTAGCTGTTGGGGCC	TTGGGG -CTTGGTTA	GCGCAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JX129161	CCTTAAACGATGTCAA	CTGGGTGTTGGGTCT	TAAGTGAAGT -A	ACGAAGCTAACGGGT	GAAGTTGACCGCTG	
JQ953652	⁸⁹¹ GGGAGTACGGTCCGA	⁹⁰⁶ AGATTA AAACTCAA	⁹²¹ GGAAATTGACGGG	⁹³²		
JQ953653	GGGAGTACGGTCCGA	AGATTA AAACTCAA	GGAAATTGACGGG			
JQ953656	GGGAGTACGGTCCGA	GA -TAAAAC TCAA	GGAAATTGACGGG -			
JQ953657	GGGAGTACGGTCCGA	AGATTA AAACTCAA	GGAAATTGACGGG			
JQ953661	GGGAGTACGGTCCGA	AGATTA AAACTCAA	GGAAATTGACGGG			
JQ953662	GGGAGTACGGTCCGA	AGATTA AAACTCAA	GGAAATTGACGGG			
JQ953663	GGGAGTACGGTCCGA	AGATTA AAACTCAA	GGAAATTGACGGG			
JX129161	GGGAGTACGGTCCGA	AGGTTGAAAAC TCAA	GGAAATTGACGGG			

Figure 2. *Bordetella bronchiseptica* V4-V5 16S rDNA alignments. Regions V4-V5 (nucleotide 516 and so on) from 16S rDNA whole sequences from *B. bronchiseptica* were aligned by ClustalW. Sequences belonging to *B. bronchiseptica* 16S rDNA from pet dogs are embedded in square boxes. Differences are marked by *.

JQ953661-63, JQ953651-57, JQ953659 and JX129161 (Table 1). All but one of the whole sequences showed 98-99% homology with *B. bronchiseptica*. The strain 78B1 showed 84% homology. The S16 rRNA has been used as a taxonomic tool because it interacts with its linking proteins and keeps the ribosome functioning. Horizontal transfer is considered to be highly unlikely for these genes; however some studies challenged that assumption (Kitahara et al., 2012). A thorough study by Sun et al. (2013) compared the intragenomic variation of the 16S rDNA with a substantial database made of

sequences from Archea and bacteria. They found that indeed 16S rDNA is a conserved gene, although its mosaic design allows for determining whether the higher variability is within the gene sequence. The fragments named V4-V5 (515-533 and 907-927, respectively) are suggested to be appropriate to analyze sequences from suspected strains from the same species (contain the least intragenomic heterogeneity). In Figure 2, we compared the regions V4-V5 from the eight full sequences and observed that seven out of eight contained variations below the higher intragenomic

was slightly under such value (86%).

The comparison of 16S rDNA sequence between pet and stray dogs seems to indicate little differences. When comparing regions V4 and V5 (Sun et al., 2013) from stray and pet dogs, we observed in three out of four cases a deletion at nucleotide 859. In two of the pet-dog sequences, we also observed insertions of adenine at nucleotide 623 and guanine at nucleotides 617 and 780. Several deletions were also found at nucleotide sites: 806, 811, 838, 908, 909, 926 and 932. Insertions of adenine were noted at nucleotide sites: 644, 673 and 830, and three sets of transitions T/C (nucleotide 886 and 888) or G/A (nucleotide 906).

The strain 78B1 was classified as *B. bronchiseptica*, despite having only 84% homology with strains previously registered in GenBank. Homology of V4-V5 region was 86%, which is only 1% below the suggested strain variation. At first the GenBank itself suggested a possible "chimeric" sequence, that is, the product of a contaminated culture. In response, the electropherogram of the strain was revised, and it was verified that there was no contamination. After the sequence was resubmitted, the strain was determined to belong to *B. bronchiseptica*. Exceptions to the established criterion of sequence homology equal to or greater than 97% for bacteria have been reported previously (Janda and Abbott, 2007; Petti, 2007). Such is the case of *Clostridium tetani* and *Clostridium innocuum*, which shows a 20% difference in the 16S rDNA gene sequence (Clarridge, 2004).

The biochemical allocation followed by a molecular analysis of 16S rDNA provides specific evidence that *B. bronchiseptica* belongs to the species. The information gathered from this work will enrich the data belonging to *B. bronchiseptica*. Rarely found in humans, *B. bronchiseptica* was isolated from an immunocompromised person who was suspected of contracting the bacteria through contact with a pet (Wernill et al., 2011). We were not able to compare pet 16S rDNA sequences to any *B. bronchiseptica* isolated from humans. There is only one partial sequence that is not long enough to contain the V4-V5 regions.

In the present study, we established the identity of *B. bronchiseptica* strains from dogs isolates first through canonical microbiological methods, which narrows the identification to species followed by 16S rDNA sequencing to guarantee the strains' identity. Such methods combined in that specific order would diminish confusion with other closely related species with strains. Furthermore these sequences widen data bank information for the *B. bronchiseptica* 16S rDNA. A rich database for 16S rDNA is necessary for gene sequence-based identification schemes, that is, MicroSeq 500 (Woo et al., 2001); which offers the best alternatives in identifying strains lacking typical biochemical profiles.

Conflict of Interests

The author(s) have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by PAPIT-UNAM IN200310-3. The authors are indebted to J. L. Mitchell for English edition of this manuscript.

REFERENCES

- Abdoulaye N, Boulanger D, Ndiaye T, Mboup S, Bada-Alambéji R, Simondon F, Ayih-Akakpo AJ (2006). Domestic animals as carriers of *Bordetella* species in Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6: 179-182.
- Clarridge III JE (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 840-862.
- Cowan ST, Steel KJ (1974). *Manual for the identification of medical bacteria.* Cambridge University Press, New York, NY. pp. 320-325.
- Dawson S, Jones D, McCreacken CM, Gaskell RM, Hart CA, Gaskell CJ, Dawson SJ (2000). *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs. *Vet. Rec.* 48: 46-48.
- Dénes AL, Rapuntean GH, Cuc C, Fin N, Nadas, G, Calina D (2006). Biochemical tests used for identification of *Bordetella bronchiseptica*. *Bul. USAMV-CN.* 63: 67-70.
- Foley JE, Rand C, Bannas MJ, Norris CR, Milan J (2002). Molecular epidemiology of feline bordetellosis in two animal shelters in California, USA preventive. *Vet. Med.* 54: 141-156.
- Gueirard P, Weber C, LeCostumier A, Guiso N (1995). Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacterial in host. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2002-2006.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (2004). Proteobacteria. In *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Garrity GM, Brenner D, Krieg NR, Noel R, Staley JT (eds) Williams & Wilkins, PA, USA, pp. 662-670.
- Hozbor D, Fouque F, Guiso N (1999). Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 150: 333-341.
- Janda MJ, Abbott SL (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2761-2764.
- Keil DJ, Fenwick B (1998). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212: 200-207.
- Kitahara K, Yasutake Y, Miyazaki K (2012). Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 19220-19225.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007). Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Louws FJ, Rademaker JLW, De Bruijn FJ (1999). Three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- MacFaddin JF (2000). *Biochemical test for identification of medical bacteria.* Lippincott Williams & Wilkins USA. p. 850.
- Mochizuki M, Yachi A, Oshima A, Ishida T (2008). Etiologic study of respiratory infections of household dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 563-569.
- Ner Z, Ross LA, Horn MV, Keen TG, MacLaughlin EF, Starnes VA, Woo MS (2003). *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* 7: 413-417.
- Pedersen KB (1975). The serology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from pigs compared with strain from other animal species. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* 83: 590-594.
- Petti CA (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Med. Microbiol.* 44: 1108-1113.
- Rath BA, Register KB, Wall J, Sokol DM, Van Dyke RB (2008). Persistent *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in an immunocompetent infant and genetic comparison of clinical isolates with kennel cough vaccine strain. *Clin. Infect. Dis.* 46: 905-908.

- Register KB, De Jong KD (2006). Analytical verification of multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.* 117: 201-210.
- Register KB, Sanden GN (2006). Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4577-4583.
- Ross RF, Switzer WP, Duncan JR (1997). Comparison of pathogenicity of various isolates of *Bordetella bronchiseptica* in young pigs. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 31: 53-57.
- Rougier S, Galland D, Boucher S, Boussarie S, Vallé M (2006). Epidemiology and susceptibility of bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. *Vet. Microbiol.* 115:192-198.
- Sun L-S, Jiang X, Wu QL, Zhou N-Y (2013). Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Appl. Environ. Microbiol* 79: 5962-5969.
- Trüper HG, Schleifer HK (2006). Prokaryote Characterization and Identification. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (Eds). *The Prokaryotes*, Springer New York, NY. pp. 58-79.
- Wernli D, Emonet S, Schrenzel J, Harbarth S (2011). Evaluation of eight cases of confirmed *Bordetella bronchiseptica* infection and colonization over a 15-year period. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 201-203.
- Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, KY, Yip KT, Fung AMY, Leung KW, Tam DMW, Que TL, Yuen KY (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1996-2001.
- Woolfrey B, Moody J (1991). Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol.* 4: 243-255.