

# Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino

## Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains from canine origin

Graciela Molina González\*   María Eugenia Rosales\*\*   Gabriela Bárcenas Morales\*\*  
Juan Antonio Montaraz Crespo\*\*\*

---

### Abstract

*Bordetella bronchiseptica* strains were isolated, identified and characterized from canine origin. With this aim, dogs with semiology of respiratory clinical signs or clinically healthy were sampled with hyssop impregnated of brain-heart infusion medium. Swabs were cultured on Mac Conkey agar plates and after 48 h incubation at 37°C; the supposed colonies of *B. bronchiseptica* were identified by motility, Gram stain, and biochemical tests. The strains were characterized by their virulence factors such as: haemolysis, haemagglutination, production of dermonecrotic toxin and the presence of pertactin. One hundred and thirty swabs were obtained during an eight months period, and 11 strains were isolated. Eleven animals displayed tract respiratory affection and six strains were isolated. None of the strains showed a clear hemolytic activity, the hemagglutination titer varied among the different strains. All but one showed dermonecrotic activity, and only four strains expressed pertactin.

**Key words:** *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*, RESPIRATORY DISEASE IN DOGS.

### Resumen

Se aislaron, identificaron y caracterizaron cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. Con ese propósito se tomaron exudados nasales de perros con semiótica de afecciones respiratorias y clínicamente sanos, con ayuda de hisopos impregnados con medio infusión cerebro-corazón. Éstos se cultivaron en agar Mac Conkey incubando a 37°C durante 48 h; las colonias presuntivas de *Bordetella bronchiseptica* se identificaron por movilidad, tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Las cepas se caracterizaron por sus factores de virulencia: hemólisis, hemaglutinación, producción de dermonecrotina y presencia de pertactina. Se tomaron 130 exudados en un lapso de ocho meses y se lograron 11 aislamientos. Once animales presentaron afecciones en vías respiratorias y se aislaron seis cepas; ninguna de éstas mostró hemólisis franca, los títulos de hemaglutinación variaron entre las diferentes cepas. Todas las cepas, menos una, mostraron actividad de dermonecrotina, y sólo cuatro produjeron pertactina.

**Palabras clave:** *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*, INFECCIÓN RESPIRATORIA EN PERROS.

---

Recibido el 22 de agosto de 2005 y aceptado el 6 de febrero de 2006.

\*Módulo de Biología Celular y Bioquímica, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Los Reyes-Iztacala, Estado de México, México.

\*\*Laboratorio de Inmunología, Coordinación de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán-Izcalli, 54700, Estado de México, México.

\*\*\*Laboratorio de Inmunología, Coordinación de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán-Izcalli, Estado de México, 54700, México, Tel/Fax: 56 23 20 53, Correo electrónico: montaraz@servidor.unam.mx

## Introduction

*Bordetella bronchiseptica* may cause disease in diverse mammal species such as: canine infectious tracheobronchitis (CITB); bronchiopneumonia in rabbits and guinea pigs; atrophic rhinitis in swine; and respiratory infections in cats, rats and horses. In humans it is found as commensal or colonist of the respiratory tract and rarely as pathogen, but it may be a predisposal factor for respiratory diseases.<sup>1</sup> It has been related to human diseases with a compromised immune state.<sup>2,3</sup>

*B. bronchiseptica* expresses the same group of virulence factors as *B. pertussis*, including hemagglutinin filaments (HAF), fimbrias, pertactin (PRN), dermonecrotxin and hemolysin cyclase adenylate (Hly/Ca).<sup>4</sup> The expression of these factors is under the control of the genes' virulence *bvg*, which is a system of signs of traduction.<sup>5</sup> Two regulatory systems have been characterized. One is called antigenic modulation, in which the activation and repression of the synthesis of virulence factors, depend on the growth conditions; another is the variation phase, which depends on mutations resulting in variants *vir*, which do not express any of the genes of virulence, regardless of the culture conditions.<sup>6,7</sup>

In spite of *B. bronchiseptica* being recognized as a respiratory tract pathogen for mammals since 1910, there are few studies about the etiological range and pathological nature of the bacteria in several animal species. In case of CITB, the diagnostic evaluation of infected animals reveals *Bordetella* as a primary etiological agent; nevertheless, in the first studies it was difficult to experimentally reproduce the disease inoculating dogs with pure cultures of the bacterium, it was concluded that *B. bronchiseptica* was only a secondary invader.<sup>8</sup> Nevertheless, more recent studies demonstrated the relation between the bacterium and acute CITB.<sup>9,10</sup> Likewise, it has been demonstrated that it can be an etiological agent, secondary to a viral infection.<sup>11,12</sup>

In Mexico, little information exists in relation to *B. bronchiseptica*'s infection in dogs; therefore, the objective of this study was to sample an heterogeneous population of dogs with the finality to isolate *B. bronchiseptica*, in order to characterize the isolates in base on the expression of some of the mentioned virulence factors.

## Material and methods

### Sampling and isolation of strains

Samples of nasal swabs were taken from 53 stray dogs used in the surgical practice of Veterinary Medicine

## Introducción

*Bordetella bronchiseptica* puede causar enfermedad en diversas especies de mamíferos, como traqueobronquitis infecciosa canina (TBIC); bronconeumonía en conejos y cuyes; rinitis atrófica en cerdos; afecciones respiratorias en gatos, ratas y caballos. En humanos se encuentra como comensal o colonizador del tracto respiratorio y raramente como patógeno, pero quizá sea un factor de predisposición para enfermedades respiratorias.<sup>1</sup> Se le ha relacionado en enfermedades de humanos con estado inmunocomprometido.<sup>2,3</sup>

*B. bronchiseptica* expresa el mismo grupo de factores de virulencia que *B. pertussis*, incluyendo filamentos de hemaglutinina (FHA), fimbrias, pertactina (PRN), dermonecrotina y adenilato ciclasa hemolisina (Ac/HLy).<sup>4</sup> La expresión de estos factores está bajo el control de los genes de virulencia *bvg*, que es un sistema de traducción de señales.<sup>5</sup> Se han caracterizado dos mecanismos de regulación. A uno se le llama modulación antigénica, donde la activación y represión de la síntesis de factores de virulencia dependen de las condiciones de crecimiento; otro la variación de fase, depende de mutaciones resultando en variantes *vir*, que no expresan cualquiera de los genes de virulencia, independientemente de las condiciones de cultivo.<sup>6,7</sup>

A pesar de que *B. bronchiseptica* se ha reconocido como patógeno del tracto respiratorio de mamíferos desde 1910, existen pocos trabajos acerca del rango etiológico y naturaleza patológica de la bacteria en varias especies animales. En el caso de TBIC, la evaluación diagnóstica de animales infectados revela a *Bordetella* como agente etiológico primario; sin embargo, en los primeros trabajos de investigación se complicó reproducir la enfermedad experimentalmente inoculando perros con cultivos puros de la bacteria, se concluyó que *B. bronchiseptica* sólo era invasor secundario.<sup>8</sup> Sin embargo, trabajos más recientes demostraron la relación entre la bacteria y TBIC aguda.<sup>9,10</sup> Asimismo, se ha demostrado que puede ser un agente etiológico secundario a una infección viral.<sup>11,12</sup>

En México existe poca información de infección de *B. bronchiseptica* en el perro; el objetivo de este estudio fue muestrear una población heterogénea de perros con el fin de aislar *B. bronchiseptica* para caracterizar los aislamientos con base en la expresión de algunos de los factores de virulencia descritos.

## Material y métodos

### Muestreo y aislamiento de cepas

Se tomaron muestras de exudados nasales de 53

and Animal Husbandry of the Faculty of High Studies-Cuautitlan, National Autonomous University of Mexico; from 33 dogs of canine training schools or kennels (CTS) and 44 from home dogs. Some sampled animals (n = 11) showed clinical signs of respiratory affection (cough, sneeze, nasal secretion, etc.), the rest were observed clinically healthy.

The nasal exudate was obtained with the help of sterile swabs moistened in brain-heart \* infusion medium, both nostrils were sampled taking care not to touch the external part of the nose. The obtained samples were taken to the laboratory, keeping them at approximately 4°C.

At the laboratory, the swabs were cultured in Mac Conkey\*\* agar medium and striated swabs were obtained by the dilution technique to facilitate the isolation of the colonies. The Petri dishes were incubated at 37°C during 48 h. Afterwards, the bacterial development was observed, analyzing the colony's morphology. The suspicious colonies of *B. bronchiseptica* were Gram stained and if they agreed with the morphology they were cultured again in Mac Conkey\*\*\* agar with the finality to obtain pure cultures; after grown, these colonies were again Gram stained and if the culture was pure it proceeded to its identification.

### **Biochemical tests for the identification of strains**

The identification was carried out by colonial and microscopic morphology, motility and by biochemical tests that included: oxidase, urease, catalase, nitrates, indole, gelatinase and fermentation of carbohydrates (mannose, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, lactose, glucose, arabinose).† The bacteria identified as *B. bronchiseptica* were conserved in liquid nitrogen for its posterior characterization.

### **Strain characterization**

The virulence factors that were analyzed for the characterization of the *B. bronchiseptica* strains were: production of hemolysin, dermonecrotxin and pertactin, and erythrocyte's agglutination. As control strains for the expression or not of the virulence factors LBF‡ and SERO1° were respectively used. These were considered as pathogen and non-pathogen strains, respectively. Also *E. coli* was used as control in the biochemical tests.

### **Hemolysin**

The isolated strains of *B. bronchiseptica* were cultured in blood agar plates at 5%, utilizing different species of erythrocytes (bovine, equine, ovine and canine)

perros callejeros empleados en las prácticas de cirugía de la licenciatura de medicina veterinaria y zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México; de 33 perros de escuelas de entrenamiento canino o criaderos (EEC) y 44 de perros de casa o particulares. Algunos de los animales (n = 11) mostraban signos clínicos de afección respiratoria (tos, estornudo, secreción nasal, etc.), el resto se observaba clínicamente sano.

Los exudados nasales se obtuvieron con ayuda de hisopos estériles humedecidos en medio de infusión cerebro-corazón,\* se muestrearon las dos fosas nasales cuidando de no tocar la parte externa de la nariz. Las muestras obtenidas se trasladaron al laboratorio, manteniéndolas a 4°C, aproximadamente.

En el laboratorio, los hisopos se sembraron en medio agar Mac Conkey\*\* y se estiraron por la técnica de dilución para facilitar el aislamiento de las colonias. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h. Después de ese tiempo se observó el desarrollo bacteriano, analizando la morfología colonial. A las colonias sospechosas de *B. bronchiseptica* se les hizo tinción de gram y si concordaba con la morfología se resembleda en agar Mac Conkey\*\*\* con la finalidad de obtener cultivos puros; a estas colonias después de crecidas se les realizó nuevamente tinción de gram, y si el cultivo estaba puro se procedía a su identificación.

### **Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas**

La identificación se llevó a cabo por morfología colonial y microscópica, movilidad y por una batería de pruebas bioquímicas que incluyeron oxidasa, ureasa, catalasa, nitratos, indol, gelatinasa y fermentación de hidratos de carbono (manosa, inositol, sorbitol, rhamnosa, sacarosa, lactosa, glucosa y arabinosa).† Las bacterias identificadas como *B. bronchiseptica* se conservaron en nitrógeno líquido para su posterior caracterización.

### **Caracterización de las cepas**

Los factores de virulencia que se analizaron para la caracterización de las cepas de *B. bronchiseptica* fueron producción de hemolisina, dermonecrotina y pertactina, y aglutinación de eritrocitos. Como cepas testigo para la expresión y no de los factores de virulencia se utilizaron la LBF‡ y SERO1°, respectivamente. Éstas

\*Bioxon, México.

\*\*Bioxon, México.

\*\*\*Bioxon, México.

†Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., EUA.

‡Wellcome Research Laboratories, Inglaterra.

°Donada por el Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM.

were incubated at 37°C for 48 h and presence of hemolysis was observed.

### Hemoagglutination

Strains were cultured in BHI agar (hart brain infusion)\* during 30 h at 37°C and were obtained with PSS (physiological saline solution),\*\* the tablet was obtained by centrifugation at 600g/15 min, washing it two times with the same solution and was adjusted to an optical density (OD) of 1 to 650 nm of wave length.\*\*\* The red blood cells (bovine, ovine, equine and canine) to test were utilized at 0.5%. The tests were performed by microtitration in plates, in serial double dilutions by duplicate of the bacterial suspension, utilizing 50 µL and adding 50 µL of the erythrocytes to test in all the wells. The plates were covered and placed in agitation during two minutes, afterwards they were incubated for 2 h at room temperature. The hemagglutination titer was obtained as the highest dilution in which complete agglutination was observed.<sup>13</sup>

### Dermonecrotxin

*B. bronchiseptica* strains were massively cultured in Mac Conkey agar and were incubated at 37°C for 48 h. Bacteria were cultured with sterile PSS and were centrifuged at 600 g during 15 min, performing two washes; the bacterial tablet was adjusted to an OD of 1 to 650 nm and the suspension was sonicated at 90 hertz per 5 min;† afterwards, supernatants were obtained by centrifugation at 1 500 g per 15 min. From each supernatant it was intradermally inoculated 0.1 mL in the loin (previously shaved) of young guinea pigs of a weight of 400 g. Skin reaction was observed (erythema, edema, induration and necrosis) in the site of inoculation, three hours after inoculation.<sup>14</sup> In order to verify the toxin's nature, the extract was submitted to the effect of temperature, 90°C during 90 min, and it was inoculated in the guinea pigs' skin just the same as the extract.

### Pertactin

Massive cultures of *B. bronchiseptica* strains were obtained from Mac Conkey agar, incubating at 37°C during 48 h and were collected with sterile PSS. Two washes were performed, centrifuging at 820 g per 15 min and the bacterial pack was re-suspended in 5 mL of sterile PSS. The bacterial suspension was subjected to sonification under the same aforementioned conditions and was centrifuged at 820 g during 15 min. The obtained supernatant was concentrated with five volumes of acetone in cold during 15 min, after which

fueron consideradas como cepa patógena y apatógena, respectivamente. También se utilizó *E. coli* como testigo en las pruebas bioquímicas.

### Hemolisina

Las cepas aisladas de *B. bronchiseptica* se sembraron en placas de agar sangre al 5%, empleando eritrocitos de diferentes especies (bovino, equino, ovino y canino), se incubaron a 37°C por 48 h, y se observó presencia de hemólisis.

### Hemaglutinación

Las cepas se sembraron en agar BHI (infusión cerebro corazón)\* durante 30 h a 37°C y se cosecharon con SSF (solución salina fisiológica),\*\* la pastilla se obtuvo por centrifugación a 600 g/15 min, lavándola dos veces con la misma solución y se ajustó a una densidad óptica (DO) de 1 a 650 nm de longitud de onda.\*\*\* Los glóbulos rojos (bovino, carnero, equino y canino) a probar se utilizaron al 0.5%. Los ensayos se realizaron por microtitulación en placas, en diluciones dobles seriadas por duplicado de la suspensión bacteriana, utilizándose 50 µL y añadiendo 50 µL de los eritrocitos a probar a todos los pozos. Las placas se cubrieron y se colocaron en agitación durante dos minutos, posteriormente se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. El título de hemaglutinación se tomó como la más alta dilución en la que se observó aglutinación completa.<sup>13</sup>

### Dermonecrotina

Las cepas de *B. bronchiseptica* se sembraron masivamente en agar Mac Conkey y se incubaron a 37°C por 48 h. Las bacterias se cosecharon con SSF estéril y se centrifugaron a 600 g durante 15 min, realizando dos lavados; la pastilla bacteriana se ajustó a una DO de 1 a 650 nm y la suspensión se sonicó a 90 hertz por 5 min;† posteriormente se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación a 1 500 g por 15 min. De cada sobrenadante se inoculó 0.1 mL intradérmicamente en el lomo (previamente rasurado) de cuyes jóvenes de 400 g de peso. Se observó presencia de reacción cutánea (eritema, edema, induración y necrosis) en el sitio de inoculación tres horas después de la inoculación.<sup>14</sup> A manera de verificar la naturaleza de la toxina, el extracto se sometió al efecto de la temperatura, 90°C durante 90 min, y se inoculó en la piel de los cuyes de igual manera que el extracto sin inactivar.

\*Bioxon, México.

\*\*Baker, México.

\*\*\*Espectronic, Milton Roy Co., Rochester, N.Y., EUA.

†Ultrasonic Cole Palmer, Chicago, Il., EUA.

it was centrifuged at 1 500 g during 15 min and the tablet was re-suspended in 3 mL of PSS to later determine the concentration of proteins by the Bradford method.<sup>15</sup>

The obtained bacterial extracts were run in electrophoresis in gels of SDS-polyacrilamide at 10% according to the Laemmli procedure.<sup>16</sup> The proteins were electrotransferred to nitrocellulose paper, administering 12 volts during 90 minutes.\* The transference lasted 90 min.

A BB07 monoclonal antibody was utilized, in liquid ascitic form, which recognizes an antigen of 68 kDa (pertactin) of *B. bronchiseptica*.<sup>17\*\*</sup>

Nitrocellulose paper with the proteins was placed in agitation in a recipient with the blocking solution (skimmed milk at 5%) during one hour. Five washes were performed with PBS-Tween 20 at 0.05%, 1.0 µL of the monoclonal antibody diluted 1:50 was added and was incubated one hour in agitation at room temperature.

Afterwards, the paper was put in contact with the peroxidized A protein and was washed on the aforementioned conditions. Later, a developer solution was added (0.03 g  $\alpha$ -chloronaphthol, 50 mL of PBS and 50 µL of hydrogen peroxide), it was incubated during 15 min and washed with PBS. The bands were violet stained.

## Results

### Sampling and isolation

Out of 130 exudates obtained, 11 strains of *B. bronchiseptica* were isolated, from these, five (45%) came from stray dogs and six (55%) from dogs of canine training schools. No strain was isolated from home dogs (Table 1).

The isolated bacteria were identified as *B. bronchiseptica* when they proved positive to the tests of: oxidase, urease, catalase, citrate and nitrate reduction, and negatives to the tests of: indole, gelatin hydrolysis and acid production, from nine sugars (glucose, saccharose, lactose, mannose, melibiose, inositol, sorbitol, rhamnose and arabinose).

The isolated strains were called according to the number of samplings, preceded by a "P" indicating their origin. Thus, we have P1, P4, P16, P18 and P98 isolated strains of stray dogs, and P30, P31, P36, P37, P38 and P54 correspond to isolations from CTS.

### Characterization by virulence factors

#### Hemolysis

Isolated strains, in this study, did not present true

## Pertactina

Se obtuvieron cultivos masivos de cada cepa de *B. bronchiseptica* en agar Mac Conkey, incubando a 37°C durante 48 h y se cosecharon con SSF estéril. Se realizaron dos lavados centrifugando a 820 g por 15 min y el paquete bacteriano se resuspendió en 5 mL de SSF estéril. La suspensión bacteriana se sometió a sonicación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente y se centrifugó a 820 g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se concentró con cinco volúmenes de acetona en frío durante 15 min, al cabo de los cuales se centrifugó a 1 500 g durante 15 min y la pastilla se resuspendió en 3 mL de SSF para posteriormente determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.<sup>15</sup>

Los extractos bacterianos obtenidos se corrieron en electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% de acuerdo con el procedimiento de Laemmli.<sup>16</sup> Las proteínas se electrotransfrieron a papel de nitrocelulosa, aplicando corriente de 12 volts durante 90 minutos.\* La transferencia se realizó durante 90 min.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal BB07, en forma de líquido ascítico, que reconoce un antígeno de 68 kDa (pertactina) de *B. bronchiseptica*.<sup>17\*\*</sup>

El papel de nitrocelulosa con las proteínas se colocó en agitación en un recipiente con la solución de bloqueo (leche descremada al 5%) durante una hora. Se realizaron cinco lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, se agregó 1.0 µL del anticuerpo monoclonal diluido 1:50 y se incubó durante una hora en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente el papel se puso en contacto con la proteína A peroxidada y se lavó en las condiciones antes mencionadas. Luego se adicionó la solución reveladora (0.03 g  $\alpha$ -cloronaftol, 50 mL de PBS y 50 µL de peróxido de hidrógeno), se incubó durante 15 min y se lavó con PBS. Las bandas se tiñeron de color violeta.

## Resultados

### Muestreo y aislamiento

De los 130 exudados obtenidos se aislaron 11 cepas de *B. bronchiseptica*; de éstas, cinco (45%) provinieron de perros callejeros y seis (55%) de perros de escuelas de entrenamiento. No se aisló ninguna cepa de perros particulares (Cuadro 1).

Las bacterias aisladas se identificaron como *B. bronchiseptica* cuando fueron positivas a las pruebas de oxidasa, ureasa, catalasa, citrato y reducción del

\*Gene blotter, Hoeffler Scientific Co., San Francisco, Cal., EUA.

\*\*Donado por Pavel Novotuy, Wellcome Research Laboratories, Inglaterra.

**Cuadro 1**

AISLAMIENTO DE *Bordetella bronchiseptica* A PARTIR DE DIFERENTES POBLACIONES CANINAS  
ISOLATION OF *B. bronchiseptica* FROM DIFFERENT CANINE POPULATIONS

| <i>Sampling population</i>   | <i>Number of samples (%)</i> | <i>Isolations per population</i> |
|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Dogs for surgery practice    | 53 (40.7)                    | 5                                |
| Canine training school (CTS) | 33 (25.3)                    | 6                                |
| Home dogs                    | 44 (33.8)                    | 0                                |
| Total samples                | 130 (100)                    | 11                               |

hemolysis, it was rather negative to the type of erythrocytes tested. The P54 strain presented complete hemolysis (beta) in the inoculum's discharge in the Petri dish of equine blood agar. The same characteristic showed in the Petri dishes of canine blood agar with the P1, P4, P18 and P54 strains. The P1, P38 and P98 strains showed incomplete hemolysis (alpha) with ovine erythrocytes. No strain lysed bovine erythrocytes.

### *Hemagglutination*

Table 2 shows the variation of the pattern of the hemagglutinant activity which presented the isolated strains; the dog's erythrocytes were agglutinated by all the bacterial strains and in less proportion horse's and ram's erythrocytes.

### *Dermonecrotxin*

The prepared extract obtained from all the strains, with exception of the P37, provoked lesions of the skin in inoculated guinea pigs. The effect began to be noticed three hours after the inoculation by reddening of the site, turning into edema, necrosis and induration 24 hours after the inoculation. As Table 2 shows, the average of the lesion's size was 1.0 +/-0.31 cm in diameter, being 0.5 cm the smallest caused by P4 strain, and the largest of 1.6 cm by the P98 strain. The extract inactivated by temperature did not cause any lesion on the animals' skin.

### *Pertactin*

Out of 11 isolated strains of this study, only four (P4, P30, P31 and P36) did not produce pertactin (Figure 1).

## **Discussion**

Canine infectious tracheobronchitis, also known as kennel cough, is considered a highly contagious dis-

nitrate, y negativas a las pruebas de indol, hidrólisis de la gelatina y producción de ácido, a partir de nueve azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa, manosa, melibiosa, inositol, sorbitol, rhamnosa y arabinosa).

Las cepas aisladas se denominaron según el número de muestreo, antecedidas de una "P" indicando su origen. Así, se tiene P1, P4, P16, P18 y P98 cepas aisladas de perros callejeros y P30, P31, P36, P37, P38 y P54 corresponde a aislamientos de EEC.

## **Caracterización por factores de virulencia**

### *Hemólisis*

Las cepas aisladas en este trabajo no presentaron hemólisis franca, más bien fue negativa con los tipos de glóbulos rojos probados. La cepa P54 presentó hemólisis completa (beta) en la descarga del inóculo en la caja de agar sangre de equino. La misma característica se presentó en las cajas de Petri de agar sangre canina con las cepas P1, P4, P18 y P54. Las cepas de P1, P38 y P98 mostraron hemólisis incompleta (alfa) con los eritrocitos de carnero. Ninguna cepa lisó los eritrocitos de bovino.

### *Hemagglutinación*

En el Cuadro 2 se observa la variación en el patrón de la actividad hemagglutinante que presentaron las cepas aisladas; los eritrocitos de perro fueron aglutinados por todas las cepas bacterianas y en menor proporción los eritrocitos de caballo y de carnero.

### *Dermonecrotina*

El extracto preparado a partir de todas las cepas, con excepción de la P37, produjo lesión en la piel de los cuyes inoculados. El efecto empezó a notarse tres horas después de la inoculación mediante enrojecimiento de la zona para evolucionar en edema,

Cuadro 2

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE Y DE LA DERMONECROTOXINA DE LAS CEPAS AISLADAS DE *Bordetella bronchiseptica*. TÍTULO HEMAGLUTINANTE EXPRESADO COMO LA MÁS ALTA DILUCIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA QUE AGLUTINA ERITROCITOS. ACTIVIDAD DERMONECRÓTICA DE EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS AISLADAS DE *Bordetella* EN PIEL DE CUYO

HEMAGGLUTINANT ACTIVITY AND DERMONECROTOXIN OF THE ISOLATED STRAINS OF *Bordetella bronchiseptica*. EXPRESSED HEMAGGLUTINANT TITER AS THE HIGHEST DILUTION OF THE BACTERIAL SUSPENSION THAT AGGLUTINATES ERYTHROCYTES. DERMONECROTIC ACTIVITY OF CRUDE EXTRACTS OF THE ISOLATED STRAINS OF *Bordetella* IN GUINEA PIG'S SKIN

| Strain codes | Titer hemagglutinate      |       |        |        |                                    |
|--------------|---------------------------|-------|--------|--------|------------------------------------|
|              | Origin of red blood cells |       |        |        | Diameter of the dermonecrotic (cm) |
|              | Bovine                    | Ovine | Equine | Canine |                                    |
| P1           | 80                        | 128   | -      | 64     | 0.9                                |
| P4           | -                         | 16    | -      | 64     | 0.5                                |
| P16          | 40                        | 16    | -      | 64     | 1.2                                |
| P18          | 40                        | 128   | 20     | 256    | 0.8                                |
| P30          | -                         | 8     | -      | 128    | 1.1                                |
| P31          | 40                        | 8     | 20     | 128    | 1.5                                |
| P36          | -                         | 16    | 20     | 64     | 0.9                                |
| P37          | -                         | 16    | -      | 256    | -                                  |
| P38          | 160                       | 20    | 8      | 256    | 1.2                                |
| P54          | -                         | 20    | -      | 256    | 1.2                                |
| P98          | -                         | -     | -      | 256    | 1.6                                |
| LBF          | 20                        | -     | -      | 16     | 1.0                                |

(-) Negative

ease of the respiratory tract that affects dogs of all ages, it has worldwide distribution; in relation to its incidence, it has been mentioned that it is part of respiratory tract's flora of dogs; therefore, the isolation of the bacterium can be a common thing.<sup>18,19</sup> In several studies, *B. bronchiseptica* has been related to CITB;<sup>9,10</sup> in the matter, Keil and Fenwick<sup>20</sup> affirm that this is the most frequent bacterium found in dogs with that disease.

The present work is a first try to study canine infection with *B. bronchiseptica* in Mexico. From all the sampled population, an isolation percentage of 8.4 points was obtained. In general, the *B. bronchiseptica* isolation's percentage that is reported in this study is similar to the ones mentioned by other authors;<sup>21,22</sup> although, contrary to the 40% of isolates described by McClandish *et al.*, from 27 animals obtaining the sample from diverse sites of the respiratory tract.

In another study carried out in Japan, 20% of incidence was observed for adenovirus type 2; for *B. bronchiseptica* it was of 9%. From only one animal *B. bronchiseptica* was isolated in pure and massive culture, without the presence of virus; for this reason, the authors do not consider *B. bronchiseptica* as a primary pathogen within the complex of kennel cough.<sup>11</sup>

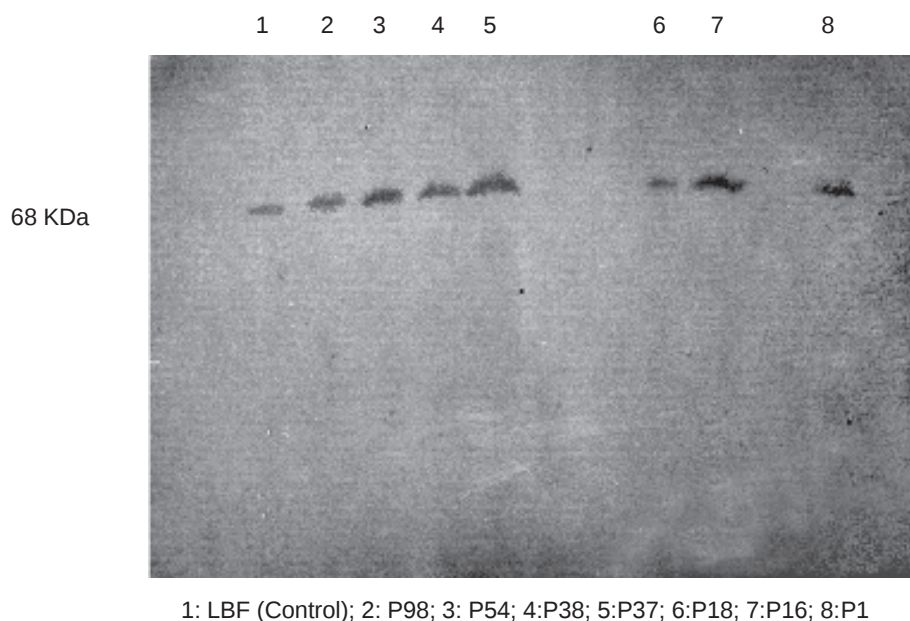
necrosis e induración 24 horas después de la inoculación. Como se muestra en el Cuadro 2, el tamaño de la lesión fue en promedio de 1.0 +/-0.31 cm de diámetro, siendo la menor de 0.5 cm causada por la cepa P4 y la mayor lesión de 1.6 cm por la cepa P98. El extracto inactivado por temperatura no causó lesión alguna en la piel de los animales.

### *Pertactina*

De las 11 cepas aisladas en este estudio, sólo cuatro (P4, P30, P31 y P36) no produjeron pertactina (Figura 1).

### Discusión

La traqueobronquitis infecciosa canina, también llamada tos de las perreras, se considera enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio que afecta a los perros de todas las edades, tiene amplia distribución mundial; con respecto a su incidencia, se ha señalado que forma parte de la flora del tracto respiratorio de perros, por lo que el aislamiento de la bacteria puede ser común.<sup>18,19</sup> *B. bronchiseptica* ha sido relacionada con TBIC en varios estudios;<sup>9,10</sup> al



**Figura 1:** Detección de la pertactina en las cepas aisladas de *Bordetella bronchiseptica* por la técnica de inmunoelectrotransferencia, empleando el anticuerpo monoclonal BB07.

**Figure 1:** Detection of pertactin on isolated strains of *Bordetella brinchiseptica* by the immunoelectrotransference technique, using the BB07 monoclonal antibody.

In this sense, the present study can not conclude if the bacterium is primary pathogen in CITB, since its isolation is only notified without taking into consideration the presence of other microorganisms [canine parainfluenza virus (CPIV), adenovirus type 2 (CAV2 and CAV1), mycoplasma and other bacterial species]. In relation to the bacterial species, the only use of Mac Conkey agar avoided the growth of other bacteria that were maybe involved in the infectious process.

A recent study reported that from 264 dogs sampled by tracheal aspiration in six years (1989-1995), 116 bacterial isolates were obtained, 12% corresponded to *B. bronchiseptica*.<sup>24</sup>

In relation to the obtained isolate percentages of the three sampled populations, it was observed that in CTS higher isolates were isolate was obtained than in stray dogs. One considerable observation that was seen in CTS's population was that in one of the schools, in respiratory tract were identified (nasal discharge, cough, elevated corporal temperature) and the animals were treated with gentamycin during three days before sampling; from that establishment 11 samples were obtained, from which five resulted with *B. bronchiseptica*.

On the other hand, it has been mentioned that *B. bronchiseptica* is part of the respiratory tract's flora of dogs,<sup>18,19</sup> which the isolation of this bacterium is a common thing, as reported in other studies concerning incidence and prevalence; the results from this study seem to contradict the latter in that only 9% of the stray dogs yielded *B. bronchiseptica*; although it is true that there was no control for this population as to precedence and health conditions of the animals.

The use of the Mac Conkey agar culture medium

respecto, Keil y Fenwick<sup>20</sup> afirman que es la bacteria más frecuente en perros con ese padecimiento.

El presente trabajo constituye un primer intento de estudiar la infección canina con *B. bronchiseptica* en México. De toda la población muestreada se obtuvo un porcentaje de aislamiento de 8.4 puntos. En general el porcentaje de aislamiento de *B. bronchiseptica* que se notifica en este estudio es similar a lo que informan otros autores,<sup>21,22</sup> aunque contrario al 40% de aislamiento que describen McClandish *et al.*,<sup>23</sup> a partir de 27 animales obteniendo la muestra de diversas áreas del tracto respiratorio.

En otro estudio realizado en Japón, se observó 20% de incidencia para adenovirus tipo 2; para *B. bronchiseptica* fue de 9%. Solamente de un animal se aisló *B. bronchiseptica* en cultivo puro y masivo, sin la presencia de virus; por este hecho los autores no consideran que *B. bronchiseptica* sea patógeno primario en el complejo de la tos de las perreras.<sup>11</sup>

En este sentido, en el presente trabajo no se puede concluir si la bacteria es patógeno primario en TBIC, dado que solamente se notifica su aislamiento sin tener en cuenta la presencia de otros microorganismos [virus de parainfluenza canina (CPIV), adenovirus tipo 2 (CAV2 y CAV1), micoplasmas y otras especies bacterianas]. Con respecto a las especies bacterianas, el uso únicamente de agar Mac Conkey evitó el crecimiento de otras bacterias que quizá estuvieron involucradas en el proceso infeccioso.

Un estudio reciente informó que de 264 perros muestreados por aspirado traqueal en seis años (1989-1995), se obtuvieron 116 aislamientos bacterianos, 12% correspondió a *B. bronchiseptica*.<sup>24</sup>

Con respecto a los porcentajes de aislamiento

in the original formulation resulted adequate for the *B. bronchiseptica*'s isolate without affecting its colonial morphology. Besides, the sampling technique used for nasal exudates, in relation to the percentages of isolate, resulted equally safe and practical, since not much time is dedicated in general anesthesia in comparison with tracheal and nasopharyngeal lavages.

In relation to the virulence factors, the majority of the isolated strains showed at least some of them. In this sense, *B. bronchiseptica* strains have been classified as virulent and non-virulent, according to the colonial morphology and hemolysis. The colonies in phase I are small, smooth, convex and virulent. The colonies of phase IV are large, rugged, have regular borders and are non-virulent.<sup>25-27</sup> So, the *B. bronchiseptica* strains can go from a virulent phase I to a non-virulent phase IV. In the matter, the description of the bacterial colonies by phases has generated confusion, since the colonies of phase I are highly unstable and transform themselves in phases II, III and IV, depending on the growth conditions. For this reason, some scientists suggest alternate schemes to characterized the *B. bronchiseptica*'s colonies. Peppler and Schrumpf<sup>28</sup> designed a system in order to describe colonial phenotypes based on the elevation of the colony, the surface's texture and hemolysis, abbreviated as Dom+ Scs+ Hly+ for its English initials, developed in Bordet Gengou agar. From the isolated bacteria of the present study, the observed colonial phenotype was that of small, smooth, concave, and non-hemolytic (Dom+ Scs+ Hly-) colonies at 48 h in blood agar of ovine, equine, bovine and canine.

On the other hand, the variation of phase was not observed in all isolated strains for the concave (Dom+) and smooth (Scs+) characteristics, since they maintained their characteristics in the subsequent subcultures from the stored vial in liquid nitrogen after its isolation. For the hemolysis characteristic, it can not be defined if it presented phase variation, since in this assay the colonies were obtained on prime isolates from Mac Conkey agar which, initially, did not give opportunity to observe the hemolytic capacity of the strains; that is to say, as the taken nasal samples were deposited, once the identified bacterium was stored in liquid nitrogen, the assays of hemolysis with the four types of erythrocytes (ovine, equine, bovine and canine) were performed six months after their isolation and storage.

Barcenas *et al.*<sup>14</sup> worked with a *B. bronchiseptica* strain of swine origin (SERO 1) that presented the same phenotypic characteristics (Dom+Scs+Hly-) than the isolated strains of this study. These authors utilized the strain LBF (which served as positive control in the present study) and observed that it presented complete hemolysis (beta); nevertheless, as

obtenido en las tres poblaciones muestreadas, se observó que en las EEC se tuvo mayor aislamiento que de los perros de vida libre. Una observación considerable que se presentó en la población de EEC fue que en una de las escuelas se identificaron problemas de afecciones en vías respiratorias (secreción nasal, tos, temperatura corporal elevada) y los animales se trataron con gentamicina durante tres días antes del muestreo, de ese establecimiento se obtuvieron 11 muestras, de las cuales cinco resultaron con *B. bronchiseptica*.

Por otra parte, se ha señalado que *B. bronchiseptica* forma parte de la flora del tracto respiratorio de perros,<sup>18,19</sup> por lo que el aislamiento de esta bacteria es común, así lo evidencian las investigaciones sobre incidencia y prevalencia que se han hecho de ella, lo que no demuestra el presente trabajo, pues se logró aislamiento de 9%, a partir de muestras tomadas de perros de vida libre o callejeros, aunque es cierto que para esta población no se tuvo control en cuanto procedencia y condiciones de salud de los animales.

La utilización del medio de cultivo agar Mac Conkey en la formulación original resultó adecuado para el aislamiento de *B. bronchiseptica* sin afectar su morfología colonial. Además la técnica de muestreo que se utilizó de exudado nasal, a decir por los porcentajes de aislamientos, resultó igualmente segura y práctica, ya que no se invierte mucho tiempo en anestesia general en comparación con los lavados traqueales y nasofaríngeos.

En cuanto a los factores de virulencia, la mayoría de las cepas aisladas registraron incidencia. En este sentido, las cepas de *B. bronchiseptica* se han clasificado como virulenta y avirulentas, de acuerdo con la morfología colonial y hemólisis. Las colonias en fase I son pequeñas, lisas, convexas y virulentas. Las colonias de la fase IV son grandes, rugosas, de borde regular y avirulentas.<sup>25-27</sup> Así que las cepas de *B. bronchiseptica* pueden pasar de una fase I virulenta a otra fase IV no virulenta. Al respecto, la descripción de las colonias de la bacteria por fases ha generado confusión, ya que las colonias de la fase I son altamente inestables y se transforman en fases II, III y IV, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Por esta razón algunos investigadores sugieren esquemas alternos para caracterizar las colonias de *B. bronchiseptica*. Peppler y Schrumpf<sup>28</sup> diseñaron un sistema para describir fenotipos coloniales basados en la elevación de la colonia, textura de la superficie y hemólisis, simbolizado como Dom+ Scs+ Hly+, por sus siglas en inglés, desarrolladas en agar Bordet Gengou. De las bacterias aisladas en el presente estudio, el fenotipo colonial que se observó fue de colonias pequeñas, lisas, cóncavas, y no hemolítica (Dom+Scs+Hly-) a las 48 h en agar gelosa sangre de ovino, equino, bovino y canino, que fueron los eritrocitos probados.

being evaluated for this capacity for ovine and bovine erythrocytes, after eight years of conservation in nitrogen, its hemolytic activity diminished.

In relation to the isolated strains, the P54 presented light complete hemolysis (beta) in equine and canine blood agar, only at the area where the inoculum discharge was performed. The same type of hemolysis was observed for the strains P1, P4 and P18 in canine blood agar. This phenomenon of mixed hemolytic and non-hemolytic colonies, predominating the hemolytic ones, was observed by Roop *et al.*<sup>24</sup> It must be mentioned that Collins and Rutter<sup>29</sup> notified the fact that the colonies in hemolytic phase I for erythrocytes of human, ape and canine origin did not originated lesions in the turbinates or caused pneumonia in experimentally infected swines, suggesting that the hemolytic activity has not been considered as a virulent factor, at least in swines.

Other factor that could have influenced in the hemolytic capacity of the strains is the concentration of red blood cells, since Roop *et al.*,<sup>25</sup> and Byrd *et al.*<sup>30</sup> used supplemented blood agar at 15% of the erythrocytes, in contrast to the utilized in this study, which was of 5%, and in a preliminary assay it was used at 3% giving a negative hemolysis result.

The hemolytic capacity of *B. bronchiseptica* is given by an hemolysin (adenylate cyclase-hemolysin), the expression of this factor can vary depending on the culture conditions; for instance, this factor is not detected in suspensions of *B. bronchiseptica* incubated at 22°C or in presence of magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) or nicotinic acid.<sup>31</sup>

In the hemagglutination assays it was found that all isolated strains agglutinated homologous erythrocytes. This pattern was not seen in isolated strains from swine, since these showed less activity of hemagglutination for erythrocytes of their own species;<sup>25</sup> nevertheless, in another report it was proposed that the differences in the hemagglutination and the high titers may be due to the species of origin of the isolates of *B. bronchiseptica*.<sup>32</sup>

The observations in this study fulfill the hypothesis of Kang,<sup>32</sup> in which the hemagglutinate activity of *B. bronchiseptica*'s isolates can be attributed to the animal species of origin (from the host it was isolated). Nevertheless, this does not agree with what has been reported by Bemis and Plotkin,<sup>13</sup> who described that isolates from dogs and swine hemagglutinated all the tested erythrocyte species (chicken, horse, sheep, dog, swine and guinea pig), with the exception of chicken's red blood cells in relation to swine's strains.

The *Bordetella* genus produces dermonecrotic toxin (DNT). In the present study, while performing the biological assays of dermonecrototoxicity on guinea pig's skin, it was observed that all isolated strains, with the

Por otra parte, la variación de fase no se observó en todas las cepas aisladas para las características de cóncavo (Dom+) y lisas (Scs+), pues mantuvieron sus características en las resiembra posteriores a partir del vial almacenado en nitrógeno líquido posterior a su aislamiento. Para la característica de hemólisis no se puede definir si presentó variación de fase, ya que en este ensayo las colonias se obtuvieron en primo-aislamiento a partir de agar Mac Conkey, lo cual no dio oportunidad a observar la capacidad hemolítica de las cepas en un inicio; es decir, al depositar la muestra tomada de las fosas nasales, pues una vez identificada la bacteria se almacenaba en nitrógeno líquido y los ensayos de hemólisis con los cuatro tipos de eritrocitos (ovino, equino, bovino y canino) se realizaron seis meses después de su aislamiento y almacenamiento.

Bárcenas *et al.*<sup>14</sup> trabajaron con una cepa de *B. bronchiseptica* de origen porcino (SERO 1) que presentaba las mismas características fenotípicas (Dom+Scs+Hly-) que las cepas aisladas en este estudio. Estos autores utilizaron la cepa LBF (que sirvió de testigo positivo en el presente trabajo) y observaron que presentaba hemólisis completa (beta); sin embargo, al ser evaluada para esta capacidad con eritrocitos de ovino y bovino, después de ocho años de conservación en nitrógeno, su actividad hemolítica disminuyó.

Con respecto a las cepas aisladas, la P54 presentó hemólisis completa (beta) ligera en agar sangre de equino y canino, solamente en el área donde se realizó la descarga del inóculo. El mismo tipo de hemólisis se observó para las cepas P1, P4 y P18 en agar sangre de perro. Este fenómeno de colonias mezcladas hemolíticas y no hemolíticas, predominando las de tipo hemolítico, fue observado por Roop *et al.*<sup>24</sup> cabe mencionar que Collings y Rutter<sup>29</sup> notificaron el hecho de que colonias en fase I hemolíticas para eritrocitos de origen humano, mono y perro no produjeron lesiones en cornete nasal o causaron neumonía en cerdos infectados experimentalmente, sugiriéndose que la actividad hemolítica no se ha considerado factor de virulencia, al menos para cerdos.

Otro factor que pudo haber influido en la capacidad hemolítica de las cepas es la concentración de glóbulos rojos, ya que Roop *et al.*<sup>25</sup> y Byrd *et al.*<sup>30</sup> utilizaron agar sangre suplementado al 15% de los eritrocitos, a diferencia del utilizado en este trabajo, que fue de 5%, y en un ensayo preliminar se utilizó al 3% dando resultados de hemólisis negativa.

La capacidad de hemolítica de *B. bronchiseptica* está dada por una hemolisina (adenilato ciclase-hemolisina), la expresión de este factor puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo; por ejemplo, este factor no se detecta en suspensiones de *B. bronchiseptica* incubadas a 22°C o en presencia de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) o ácido nicotínico.<sup>31</sup>

exception of P37, presented dermonecrotxin. Walker and Weiss<sup>33</sup> grouped the lesions according to the size of the lesion: negative; larger than 1 cm, 1+; red lesion smaller than 1 cm, 2+; lesion larger than 1 cm, 3+; black lesion larger than 1 cm, 4+; blue-black lesion 2 cm or more frequently accompanied by death.<sup>34</sup>

According to the aforementioned criteria, the majority of the isolated strains in the present investigation are sited in category 3+. The strain P4 case would be grouped in category 1+, since the size of the lesion was 0.5 cm in diameter; nevertheless, unlike the characteristics of classification of the aforementioned authors, it was observed besides the reddish area at 3 h, black spots at 6 h, and finally a clear necrotic area at 24 h. In this sense, Nakai *et al.* mention that a positive necrotic lesion is the one that measures 5 mm in diameter at 48 h after injection.

On the other hand, the strain P37 did not provoke any lesion on the guinea pig's skin; this same strain did not lysed any erythrocyte species assayed and only agglutinated the ones from sheep and dog, which would indicate that the strain is in a transition phase between stages II and III, although the morphological characteristic does not agree with the description of the bacterial colonies in such phase. The fact that they did not present both virulence factors already mentioned, hemolysis and hemoagglutination, not necessarily influences the expression of DNT, since Walker and Weiss,<sup>33</sup> utilizing mutated strains in one or two virulence factors, demonstrated that the alteration of these does not affect the production of the lesion by DNT.

The production of DNT is considered an important virulence factor for the start of turbinate atrophy in porcine atrophic rhinitis disease.<sup>25,35</sup> The role of DNT in the human disease caused by *B. pertussis* is not clear. The inoculation of mutate *B. pertussis* strains without DNT were virulent in rats and mice, although this model may not be representative for the disease in human beings. Its pathogenesis in canine infectious tracheobronchitis is not well established.<sup>36,37</sup>

Montaraz *et al.*<sup>17</sup> identified the 68 kDa protein in the membrane of *B. bronchiseptica* utilizing two monoclonal antibodies BB07 and BB05 obtained from the same study; both monoclonal antibodies present the capacity to protect mice against the bacterium. On the other hand, Novotny *et al.*<sup>38</sup> observed that non-pathogen strains of *B. bronchiseptica* lacked 68 kDa protein, but virulent strains presented it, suggesting that it may be a virulence factor. Similar results were reported by Barcenas *et al.*<sup>14</sup>

Further studies named the 68 kDa protein: pertactin, reassuring what has been said by the aforementioned authors, showing that besides being a marker of virulence it has protection effects.<sup>39,40</sup>

En los ensayos de hemaglutinación se encontró que todas las cepas aisladas a partir de fosas nasales hemaglutinaron eritrocitos de perro. Este patrón no se observó para cepas aisladas de cerdo, ya que éstas mostraron menor actividad hemaglutinante para eritrocitos de su misma especie;<sup>25</sup> pero, en otro informe se propuso que las diferencias en la hemoaglutinación y los títulos altos pueden deberse a las especies de origen de los aislados de *B. bronchiseptica*.<sup>32</sup>

Lo observado en este trabajo cumple el supuesto de Kang,<sup>32</sup> en que la actividad hemoaglutinante de aislados de *B. bronchiseptica* se puede atribuir a la especie animal de origen (a partir del portador donde se aisló). Sin embargo, esto último no concuerda con lo notificado por Bemis y Plotkin,<sup>13</sup> quienes describieron que aislados de perros y cerdos hemaglutinaron todas las especies de eritrocitos probados (pollo, caballo, carnero, perro, cerdo y cobayo), con excepción de los de pollo para las cepas porcinas.

El género *Bordetella* produce toxina dermonecrótica (DNT). En el presente trabajo, al realizar los ensayos biológicos de actividad dermonecrótica de los extractos de lisados bacterianos en piel de cuyos, se observó que todas las cepas aisladas, con excepción de P37, presentaron la dermonecrotina. Walker y Weiss<sup>33</sup> agruparon las lesiones de acuerdo con el tamaño de la lesión: negativa; más grande que 1 cm, 1+; lesión roja pequeña menor a 1 cm, 2+; lesión mayor a 1 cm, 3+; lesión negra mayor a 1 cm, 4+; lesión azul-negra 2 cm o más frecuentemente acompañada por muerte.<sup>34</sup>

De acuerdo con tales criterios, la mayoría de las cepas aisladas en este trabajo se ubican en la categoría 3+. El caso de la cepa P4 estaría agrupada en la categoría 1+, pues el tamaño de la lesión fue de 0.5 cm de diámetro; sin embargo, a diferencia de las características de clasificación de los autores ya citados, se observó además de la zona rojiza a las 3 h, puntos negros a las 6 h y finalmente a las 24 h una zona claramente necrótica. En este sentido, Nakai *et al.*<sup>34</sup> mencionan que se considera lesión necrótica positiva aquella de 5 mm de diámetro a las 48 h después de inyección.

Por otra parte, la cepa P37 no provocó ninguna lesión en la piel de cuyo; esta misma cepa no lisó ninguna especie de eritrocitos ensayados y sólo aglutinó a los de carnero y perro, lo que indicaría que la cepa está en una fase de transición entre las etapas II y III, aun cuando la característica morfológica no concuerda con la descripción de las colonias bacterianas en dicha fase. El hecho de que no presentaran los dos factores de virulencia mencionados, hemólisis y hemoaglutinación, no necesariamente influye en la expresión de la DNT, pues Walker y Weiss,<sup>33</sup> utilizando cepas mutadas en uno o más factores de virulencia, mostraron que la alteración de éstos no afecta la producción de la lesión por la DNT.

In the present study, utilizing the monoclonal antibody BB07, it was observed presence of pertactin in seven (P1, P16, P18, P37, P38, P54 and P98) of the 11 isolated strains. Analyzing the five isolated strains from one same EEC (P30, P31, P36, P37 and P38), two strains, P37 and P38, presented the 68 kDa protein; this observation confirms, one more time, the difference between the isolated strains related to one same place of sampling. In relation to the isolations from stray dogs, only the strain P4 did not produce pertactin, unlike the rest of the isolated strains proper from the same population of dogs that produced such protein.

It is to mention that five strains (P18, P37, P38, P54 and P98) in which pertactin was observed, presented the highest titers of erythrocytes' hemagglutination from dogs. This correlation is important since it has been demonstrated that pertactin, as well as HAF, are important virulence factors, above all in the bacterial adherence to the *in vitro* cultivated cells.<sup>41,42</sup> Likewise, these strains in which pertactin was detected caused larger diameter dermonecrotic lesion than the ones that did not present, with the exception of strain P36.

In conclusion, the present study documents the presence of *B. bronchiseptica* in dogs from different precedence and with clinical status. These findings allow to state future studies in order to define the role that *B. bronchiseptica* plays in canine respiratory affections; as well as the characteristics of the strains in comparison with isolates of other animal species, as pig, cat, rabbit, horse, and also human being.

## References

1. Goodnow AR. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev 1980; 44: 722-738.
2. Woolfrey BF, Moody JA. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol Rev 1991; 4:234-255.
3. Meis JF, van Griet AJ, Muytjen JL. *Bordetella bronchiseptica* bronchitis in an immunosuppressed patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9:366-367.
4. Cundell DR, Tuomanen E. Attachment and interaction of bacteria at respiratory mucosal surfaces. In: Rath JA, Wannemuehler MJ, Minion FC, editors. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Washington: American Society for Microbiology, 1995: 3-20.
5. Arico B, Scarlato V, Monack DM, Falkow S, Rappuoli R. Structural and genetic analysis of *bvg*-locus in *Bordetella* species. Mol Microbiol 1991; 5:481-491.
6. Arico B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack DM, Falkow S, *et al.* Sequence required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction protein. Proc Natl Acad Sci 1989; 86:6671-6675.
7. Scarlato U, Arico B, Domenighini M, Rappuoli R. Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. BioEssays 1993; 15:99-103.

La producción de DNT es factor importante de virulencia para la producción de atrofia del cornete nasal en rinitis atrófica porcina.<sup>25,35</sup> El papel de la DNT en la enfermedad humana causada por *B. pertussis* es poco clara. La inyección de cepas de *B. pertussis* mutadas sin DNT fueron virulentas en ratas y ratones, aunque este modelo quizá no sea representativo para la enfermedad en humanos. Su patogénesis en la traqueobronquitis infecciosa canina no está clara.<sup>36,37</sup>

Montaraz *et al.*<sup>17</sup> identificaron la proteína de 68 kDa en la membrana de *B. bronchiseptica* empleando para ello dos anticuerpos monoclonales BB07 y BB05 obtenidos en el mismo estudio; ambos anticuerpos monoclonales presentan la capacidad de proteger a ratones contra la bacteria. Por otro lado, Novotny *et al.*<sup>38</sup> observaron que cepas no patógenas de *B. bronchiseptica* carecían de la proteína de 68 kDa, pero cepas virulentas sí la presentaban, sugiriendo que tal vez fuera un factor de virulencia. Resultados similares notificaron Bárcenas *et al.*<sup>14</sup>

Estudios posteriores nombraron a la proteína de 68 kDa: pertactina, reafirmando lo encontrado por otros autores, mostrando que además de ser un marcador de virulencia tiene efectos de protección.<sup>39,40</sup>

En el presente estudio, utilizando el anticuerpo monoclonal BB07, se observó presencia de pertactina en siete (P1, P16, P18, P37, P38, P54 y P98) de las 11 cepas aisladas. Analizando las cinco cepas aisladas a partir de una misma EEC (P30, P31, P36, P37 y P38), dos cepas, P37 y P38, presentaron la proteína de 68 kDa; esta observación confirma una vez más la diferencia entre las cepas aisladas correspondientes a un mismo lugar de muestreo. En cuanto a los aislamientos a partir de perros callejeros, sólo la cepa P4 no produjo la pertactina, a diferencia de las demás cepas aisladas procedentes de la misma población de perros que sí produjeron dicha proteína.

Cinco cepas (P18, P37, P38, P54 y P98) en las que se observó pertactina, presentaron los títulos más altos de hemagglutinación de eritrocitos de perro. Esta correlación es relevante, pues se demostró que la pertactina como los FHA son factores de virulencia importantes, sobre todo en la adherencia bacteriana a las células cultivadas *in vitro*.<sup>41,42</sup> Asimismo, las cepas en que se detectó pertactina causaron lesión dermonecrotica de mayor diámetro que en las que no la presentaron, con excepción de la cepa P36.

En resumen, el presente trabajo documenta la presencia de *B. bronchiseptica* en perros de diferente procedencia y con diferente estatus clínico. Estos hallazgos permiten plantearse futuros estudios para definir con precisión el papel que juega *B. bronchiseptica* en las afecciones respiratorias caninas, así como las características de las cepas en comparación con aislamientos de otras especies animales, como cerdo, gato, conejo, caballo, incluso el hombre.

8. Thomson H, Wright NG, Cornwell HJC. Contagious respiratory disease in dog. *Vet Bull* 1975; 45:479-488.
9. Wright NG, Thompson H, Taylor D, Cornwell HJC. *Bordetella bronchiseptica* an assessment of its role in canine respiratory disease. *Vet Rec* 1973; 93:486-487.
10. Wagener JS, Sobonya R, Minnich L, Taussing LM. Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella bronchiseptica* in kennel cough. *Am J Vet Res* 1984; 47:322-327.
11. Azetaka M, Konishi, S. Kennel cough complex: confirmation and analysis of the outbreak in Japan. *J Vet Sci* 1988; 50: 851-858.
12. Thrusfield SA, Hill JR. Kennel cough syndrome in pet store. *J Am Anim Hosp Assoc* 1977;13:342-348.
13. Bemis DA, Plotkin BJ. Hemagglutination by *Bordetella bronchiseptica*. *J Clin Microbiol* 1982; 15:1120-1127.
14. Barcenas G, Rosales ME, Montaraz JA. Comparison of humoral immune responses of pig with atrophic rhinitis and pig vaccinates with *Bordetella bronchiseptica*. *Indian Vet J* 1996; 73:818-821.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
16. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 1970; 227:680-685.
17. Montaraz JA, Novotny P, Yvanyi J. Identification of 68-kilodalton protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1985; 47:744-751.
18. Clapper WE, Made GH. Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dog. *J Bacteriol* 1963; 85:643-648.
19. McKiernan BC, Smith AR, Kissil M. Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20:139-142.
20. Keil D, Fenwick B. Role *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dog. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212:200-207.
21. Appel MJG, Percy DH. SVS-like parainfluenza virus in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 156:1778-1781.
22. Wilkins RJ, Hellan DR. Antibacterial sensitivities of bacteria isolates from dogs with tracheobronchitis. *J Am Vet Med Assoc*. 1973; 162:47-50.
23. McCandlish JAP, Thompson A, Cornwell KJC, Wright NG. A study of dogs with kennel cough. *Vet Rec* 1978; 102:298-301.
24. Angus JC, Jans SS, Hirsh DC. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210:55-58.
25. Roop II, Veit MR, Sinsky HP, Veit RJ, Hewlet EL, Kornegay E. Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Infect Immun* 1987; 5:217-222.
26. Bemis DA. *Bordetella*. In: Gyles CL, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of bacterial infectious in animal*. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1988 : 137-146.
27. Baneman A, Gross R. Phase variations affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect Immun* 1997; 65:3469-3473.
28. Peppler MS, Schrupf E. Phenotypic variation and modulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1984; 44:681-702.
29. Colling LA, Rutter JM. Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine tract. *J Med Microbiol* 1985; 19:847-858.
30. Byrd DW, Roop RM, Veit HP, Schurg GG. Serum sensitivity and lipopolysaccharide characteristics in *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*. *Microbiol* 1991; 34:159-165.
31. Gueirard P, Guiso N.. Virulence of *Bordetella bronchiseptica*: Role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 1993; 61(10):4072-4078.
32. Kang BK, Koshimizu K, Ogata M. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. Agglutination test on *Bordetella bronchiseptica* infection. *Jpn J Vet Sci* 1970; 32:295-306.
33. Walker KE, Weiss AA. Characterization of dermonecrotic toxin in members of genus *Bordetella*. *Infect Immun* 1994; 62:3817-3828.
34. Nakai T, Sawata A, Tsuji M, Samejima Y, Kume K. Characterization of dermonecrotic toxin produced by serotype D of *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* 1984. 45:2410-2413.
35. Maggyar T, Chanter N, Lax AJ, Rutter JM, Hall GA. The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Microbiol* 1988; 18:135-146.
36. Cowell JL, Hewlett EL, Manclark CR. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1979; 25:896-901.
37. Pullinger GD, Adams TE, Mullan PB, Garrod T, Lax AJ. Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotoxin gene of *Bordetella* spp. *Infect Immun* 1996; 64:4163-4171.
38. Novotny P, Kobish M, Cownlwy K, Montaraz JA. Adenylate cyclase activity of a 68.000 molecular-weight protein isolated from the outer membrane for *Bordetella bronchiseptica*. *Infec Immun* 1985; 50:199-206.
39. Kobish M, Novotny P. Identification of 68-kilodalton outer membrane protein as the protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect Immun* 1990; 58:352-357.
40. Leininger E, Roberts M, Keimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, et al. Pertactin and Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991. 88:345-349.
41. Li J, Fairweather NF, Novotny P, Dougan G, Charles IG. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein p.68 from *Bordetella bronchiseptica*. *J General Microbiol* 1992; 138:1697-1705.
42. Register KB, Ackman MR. A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulation conditions. *Infect Immun* 1997; 65:5295-5300.