

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE PCR EN TIEMPO REAL
BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL
SIDEROFORO TonB DE BORDETELLA BRONCHISEPTICA A PARTIR DE
MUESTRAS DE EXUDADO NASAL DE PERROS**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

CINTHYA TORRES GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2019

Desarrollo de una plataforma de PCR en tiempo real basada en la amplificación del gen que codifica para el sideróforo TonB de *Bordetella bronchiseptica* a partir de muestras de exudado nasal de perros. Tesis presentada por la C. Cinthya Torres Guzmán, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el siguiente comité:

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO
DIRECTOR DE TESIS

DR. ENRIQUE TRASVIÑA MUÑOZ
CO-DIRECTOR

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
ASESOR

DR. JOSÉ CARLOMAN HERRERA RAMÍREZ
ASESOR

DR. SERGIO DANIEL GÓMEZ GÓMEZ
ASESOR

RESUMEN

La traqueobronquitis infecciosa canina (TIC) es una enfermedad de alta morbilidad y baja mortalidad que se reconoce como una de las causas más comunes de enfermedad respiratoria de inicio agudo en los perros (Ford, 2012). La TIC ocurre cuando un gran número de perros se encuentran confinados juntos en un área pequeña, con un cuadro clínico que se caracteriza por presentar tos seca, anorexia y depresión; siendo *Bordetella bronchiseptica* el agente bacteriano más frecuentemente aislado durante el transcurso de esta enfermedad (Chalker et al., 2003). Las bacterias del género *Bordetella spp* son de importancia primaria en la medicina humana y la medicina veterinaria debido a su habilidad para colonizar el tracto respiratorio, causando una amplia gama de infecciones pulmonares y bronquiales (Hamidou Soumana et al., 2017). El diagnóstico de esta enfermedad es complicado debido a la similitud en la sintomatología que presenta con respecto a otras enfermedades como el moquillo canino y otras infecciones respiratorias causadas por distintas bacterias. El diagnóstico de *Bordetella bronchiseptica* se logra a partir de cultivo microbiológico y caracterización bioquímica o a través de distintas plataformas de diagnóstico serológico, sin embargo; el crecimiento de bacterias contaminantes en los cultivos (Van der Zee et al., 2015) o la variabilidad en los niveles de sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas debido a la aplicación de vacunas (Aquino et al., 2011), limitan la utilidad diagnóstica de esos procedimientos. Las pruebas basadas en técnicas moleculares,

particularmente las basadas en plataformas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), se ubican hoy en día como la alternativa tecnológicamente adecuada para el diagnóstico rápido y confiable de esta enfermedad. El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una plataforma de PCR en tiempo real para *Bordetella bronchiseptica* a partir de la amplificación del gen que codifica para el receptor del sideróforo TonB de esta bacteria.

Palabras clave: *Bordetella bronchiseptica*, tos de las perreras, traqueobronquitis infecciosa canina, complejo respiratorio infeccioso canino, PCR en tiempo real.

ABSTRACT

Canine infectious tracheobronchitis (CIT) is a disease of high morbidity and low mortality recognized as one of the most common causes of acute respiratory disease in dogs (Ford, 2012). CIT outbreaks occur when a large number of dogs are confined together in a small area, with clinical symptoms characterized by dry cough, anorexia, and depression; being *Bordetella bronchiseptica* the most frequently isolated bacterial agent during the course of this disease (Chalker et al., 2003). Bacteria from the *Bordetella* spp genus are of importance in human and veterinary medicine due to their ability to colonize the respiratory tract, causing a wide range of lung and bronchial infections (Hamidou Soumana et al., 2017). The diagnosis of this disease is complicated due to the similarity of symptoms with respect to other diseases such as canine distemper and other respiratory infections caused by different bacteria. The diagnosis of *Bordetella bronchiseptica* is achieved by microbiological culture and biochemical characterization or through different serological diagnostic platforms, however, the growth of contaminating bacteria in the cultures (Van der Zee et al., 2015) or the variability in the levels of sensitivity and specificity of the serological tests due to the application of vaccines (Aquino et al., 2011), limit the diagnostic utility of these procedures. Tests based on molecular techniques, particularly those based on real-time polymerase chain reaction platforms (RT-PCR) are currently the most technologically appropriate alternative for the rapid and reliable

diagnosis of this disease. The present work has the objective of developing an RT-PCR platform for *Bordetella bronchiseptica* based on the amplification of the gene that codes for the TonB siderophore receptor of these bacteria.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, kennel cough, canine infectious tracheobronchitis, canine infectious respiratory complex, real-time PCR.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	14
REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
Antecedentes.....	16
Epidemiología.....	19
Distribución.....	21
Factores de riesgo.....	21
Prevalencia.....	23
Diagnóstico.....	23
Cultivo microbiológico.....	24
Diagnóstico serológico.....	25
Pruebas de PCR y RT-PCR.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Localización del área de estudio.....	29
Muestreos.....	29
Controles positivos para Bordetella bronchiseptica.....	30
Oligonucleótidos para el gen sideróforo TonB de Bordetella bronchiseptica.....	31
Estandarización de reactivos para el RT-PCR.....	33
Pruebas de RT-PCR.....	34

RESULTADOS.....	36
Estandarización del RT-PCR para Bordetella bronchiseptica.....	36
Desempeño de controles positivos del RT-PCR para Bordetella bronchiseptica.....	37
Resultados del RT-PCR para muestras de exudado nasal.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS.....	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen receptor del sideróforo TonB con referencia GenBank NZ_CABEET010000001.1.	33
2	Reactivos y volumen de reacción para el PCR en tiempo real de <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	34
3	Optimización de oligonucleótidos con mezcla maestra EvaGreen para el PCR en tiempo real de <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	37
4	Resultados generales y por grupo de muestras del RT-PCR para <i>Bordetella bronchiseptica</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Curvas de amplificación (A) y disociación (B) de controles positivos y negativos obtenidas durante el proceso de optimización del PCR en tiempo real para <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	38

INTRODUCCIÓN

El complejo respiratorio infeccioso canino (CRID), también conocido como tos de las perreras, es una infección que afecta a perros de todas las edades. Esta enfermedad se presenta frecuentemente cuando un gran número de perros se encuentran confinados en un área pequeña. El CRID tiene una alta morbilidad y se caracteriza por presentar tos seca, anorexia y depresión, puede avanzar a una traqueobronquitis, neumonía e incluso la muerte en casos severos. El agente bacteriano más frecuentemente aislado durante el transcurso de esta enfermedad es *Bordetella bronchiseptica* (Chalker et al., 2003). Las infecciones producidas por *Bordetella bronchiseptica* se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo y son de gran importancia en medicina veterinaria debido a su habilidad para colonizar el tracto respiratorio de diversos mamíferos produciendo infecciones pulmonares y bronquiales que bajo ciertas condiciones del medio ambiente y del hospedador pueden ser transmitirse a los humanos.

El género *Bordetella* está distribuido en diez especies conocidas, de las cuales *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica* están estrechamente relacionadas genéticamente y se les denomina “*Bordetella clásica*”. Éste grupo de tres bacterias homólogas representan un excelente sistema experimental debido a que poseen una secuencia de DNA muy similar, aunque varían en aspectos críticos como su patogénesis, incluyendo la

especificidad del hospedador, la severidad y duración de la enfermedad. Se piensa que *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, los agentes causantes de la tos ferina en humanos, han evolucionado independientemente de *Bordetella bronchiseptica* (Park et al., 2012).

El diagnóstico de *Bordetella bronchiseptica* se puede realizar a partir de cultivos bacterianos, empleando distintas plataformas de serología y más recientemente utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en sus formatos de punto final (PCR) y RT-PCR, a partir de especímenes colectados de faringe, lavado bronco alveolar o transtraqueal (Van der Zee et al., 2015; Aquino et al., 2011).

Bordetella bronchiseptica se aísla regularmente en perros clínicamente sanos a partir de cultivo microbiológico de muestras de tracto respiratorio superior y pulmones; también se ha logrado la amplificación de ADN específico para la bacteria mediante la aplicación de técnicas de PCR cuantitativo (qPCR) a partir de extractos de muestras tomadas de la mucosa de la nariz y faringe. Sin embargo, los criterios para la interpretación de un resultado positivo al qPCR obtenido de una muestra de lavado bronco alveolar aún no se han definido, ya que el qPCR tiene la capacidad de proveer resultados basados en el valor del ciclo donde inició la amplificación, pero se desconoce si estos valores son capaces de diferenciar un estado de portador de una infección patológica (Canonne et al., 2016).

Las técnicas de diagnóstico molecular para *Bordetella* basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionan niveles de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%, muy superiores a los que ofrecen

las pruebas de rutina, con la ventaja adicional de generar resultados en horas en lugar de semanas o meses que requiere el cultivo microbiológico.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo consiste en el desarrollo e instrumentación de una plataforma RT-PCR para el diagnóstico molecular de *Bordetella bronchiseptica* basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica para el sideróforo TonB, haciendo disponible una herramienta rápida y confiable que ayude a los profesionales de la salud tomar decisiones basadas en resultados confiables para la aplicación de las medidas de control de esta enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

Bordetella bronchiseptica se reconoce como el principal agente causante de enfermedades respiratorias crónicas en mamíferos no humanos, aunque con poca frecuencia se asocia a infecciones zoonóticas y ha sido aislada en cultivo microbiológico en humanos inmunocomprometidos. Sin embargo, la importancia del papel que juega *Bordetella bronchiseptica* en infecciones en humanos no está bien definido. El mecanismo de infección de *Bordetella bronchiseptica* en mamíferos es multifactorial y muy similar al que presentan otros miembros del género *Bordetella spp* (Washington et al., 2015).

El diagnóstico de esta enfermedad es complicado debido a la similitud en la sintomatología que presenta con respecto a otras enfermedades infecciosas de origen viral como el moquillo canino o de infecciones respiratorias causadas por bacterias del género *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Mycoplasma spp.*, entre otras (Priestnall et al., 2014). El diagnóstico generalmente se realiza con base en los signos que presenta el animal, los cuales son inespecíficos de la enfermedad e incluyen fiebre, tos seca o con flemas, vómito, secreción nasal u ocular, depresión, disminución en el consumo de alimento y en casos más graves es posible detectar durante la auscultación pulmonar estertores respiratorios por la acumulación de líquido; síntoma que precede a una neumonía (Lavan y Knesl., 2015).

Con base en lo anterior y ante la necesidad de contar con plataformas de diagnóstico rápidas, seguras y eficaces para el diagnóstico de *Bordetella bronchiseptica*, las pruebas moleculares, particularmente las basadas en plataformas RT-PCR, significan una alternativa tecnológicamente adecuada al diagnóstico temprano de esta enfermedad, siendo capaces de establecer un diagnóstico definitivo en unas cuantas horas, lo cual permitiría a los profesionales de la salud tomar decisiones basadas en resultados confiables para la aplicación de la terapia y tratamiento antibiótico más apropiados para cada caso particular y reducir la incidencia de esta enfermedad.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes

El complejo respiratorio infeccioso canino (CRIC) significa un desafío para los médicos clínicos dada su prevalencia generalizada, la amplitud de su etiología que incluye múltiples agentes patógenos y su aparición ocasional, sin un patrón estacional definido pero persistente en perros que fueron correctamente inmunizados contra la enfermedad (Lavan & Knesl, 2015). Aunque el CRIC es una infección de origen multifactorial se ha encontrado que *Bordetella bronchiseptica* por sí solo es capaz de ocasionar enfermedad respiratoria clínica y se considera que es el patógeno de mayor importancia dentro del CRIC y no solo que su papel es como un patógeno más asociado al síndrome (Ford, 2009).

La enfermedad producida por *Bordetella bronchiseptica* se caracteriza por ser de inicio agudo con episodios de tos seca y secreción nasal que van desde casos leves a muy graves. La mayoría de los perros afectados se recuperan de forma espontánea en un periodo de días a semanas sin necesidad de ningún tratamiento, pero también puede complicarse el cuadro si la bacteria llega a colonizar el tracto respiratorio inferior o se presenta una infección secundaria. Debido a la naturaleza altamente contagiosa de la enfermedad, los perros que viven en condiciones de hacinamiento, como

refugios y guarderías, son especialmente susceptibles a las infecciones (Buonavoglia & Martella, 2007).

Bordetella bronchiseptica es un cocobacilo Gram-negativo de las vías aéreas (Ducours et al., 2017), pleomórfico y que no produce esporas; está clasificada dentro de la familia *Alcaligenaceae* que comprende diez especies genéticamente diferentes (Kilgore et al., 2016). Las células cultivadas en medios sólidos crecen principalmente en forma cocoide y su tamaño varía de 3.0 por 0.5 micras (μm) de largo y ancho respectivamente; algunas formas filamentosas tienen una medida promedio de 0.4 por 8.0 μm . *Bordetella bronchiseptica* es un microorganismo móvil debido a que posee múltiples flagelos con un grosor de 18 a 22 nanómetros (nm) de diámetro, cada flagelo está conformado de cinco a seis hilos trenzados con un grosor de 2 nm (Van der Zee et al., 2015).

Bordetella bronchiseptica posee una pared celular compuesta por cinco capas. Las tres capas más externas le dan una apariencia lobulada al contorno de la superficie de la bacteria, con canales que van de 10 a 20 nm de ancho entre lóbulos. Todas las especies de *Bordetella spp* sintetizan al menos una toxina de lipopolisacáridos que es similar química y biológicamente a las toxinas de lipopolisacáridos de otras bacterias Gram-negativas (Goodnow, 1980).

La expresión de los determinantes de virulencia de *Bordetella spp* está controlada por un sistema de transducción de señales de dos componentes BvgS y BvgA (Boursaux-Eude y Guiso, 2000) localizados en posición adyacente uno al otro en el cromosoma bacteriano. Estos componentes de transducción se adaptan a los cambios ambientales por variación entre las fases virulentas (Bvg

+) y avirulentas (Bvg -) y se ha propuesto que la fase Bvg – es importante para la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente (Linz et al., 2016).

Los flagelos proporcionan motilidad a la bacteria, aunque se piensa que pueden tener participación en otros procesos microbianos adicionales, como la inducción de mediadores pro-inflamatorios, lo cual fue demostrado al observar que los flagelos son necesarios para iniciar y potenciar la interacción bacteria-superficie celular, lo que sugiere que los flagelos pueden tener la capacidad de identificar y diferenciar distintas especies hospedadoras (Khayer et al., 2014).

Bordetella bronchiseptica fue aislada e identificada por primera vez en 1910 con el nombre de *Bacillus bronchicanis*. El nombre fue elegido cuando este organismo fue aislado del tracto respiratorio de perros que padecían moquillo canino. Entre los años 1912-1913 fueron aislados organismos con características idénticas a aquellos que habían sido descritos en el tracto respiratorio de cobayos, monos y humanos, por lo que el organismo fue renombrado como *Bacterium bronchisepticus* (Goodnow, 1980). En los años siguientes el nombre fue cambiado a *Alcaligenes bronchisepticus* en 1925, *Brucella bronchiseptica* en 1929, *Alcaligenes bronchicanis* en 1935 y *Haemophilus bronchisepticus* por en 1946. La base de esas clasificaciones se fundamentaba en sus características bioquímicas, morfológicas y de crecimiento, las cuales coincidían en mayor o menor medida con las características de los miembros de estos géneros (Hamidou Soumana et al., 2017). Finalmente, la bacteria recibió el nombre con el que se le conoce actualmente cuando Moreno-López describió el género *Bordetella spp*, en honor a Jules Bordet, quien fue el primero en aislar el organismo causante de la

pertussis o tos ferina y las especies de *Bordetella bronchiseptica* (Goodnow, 1980). A finales de la década de 1970 fueron desarrolladas las primeras vacunas de administración parenteral que contenían bacterias enteras, así como vacunas de administración intranasal que contenían bacterias vivas modificadas para proteger a los perros de enfermedades asociadas a *Bordetella bronchiseptica* (Ellis et al., 2014).

Por muchos años, el complejo respiratorio infeccioso canino, también conocido como tos de las perreras, fue considerado una enfermedad común de esta especie animal con una significancia clínica limitada que era fácilmente controlada a través de programas de vacunación rutinaria. Durante la última década, ha resurgido el interés en los patógenos respiratorios caninos, debido en parte por la poca eficacia de las vacunas actuales para controlar brotes de enfermedades respiratorias, en particular en grandes poblaciones de perros como los que se alojan en las perreras, así como la emergencia o reemergencia de patógenos que producen cuadros clínicos más severos o incluso fatales (Priestnall et al., 2014).

Epidemiología

Las bacterias del género *Bordetella* son de importancia primaria en la medicina humana y la medicina veterinaria debido a su habilidad para colonizar el tracto respiratorio, causando una amplia gama de infecciones pulmonares y bronquiales (Hamidou Soumana et al., 2017). El patógeno normalmente vive en asociación con su hospedero y coloniza las vías respiratorias altas de los mamíferos (Book et al., 2001), tiene una gran variedad de hospedadores y es

responsable de un amplio espectro de enfermedades en animales (Cattelan et al., 2016). Aunque no es común encontrar casos de humanos infectados con *Bordetella bronchiseptica*, esta bacteria es capaz de ocasionar neumonía e infecciones de vías respiratorias altas en los dueños de mascotas caninas. La traqueobronquitis infecciosa canina se encuentra entre las causas más comunes de enfermedades respiratorias de inicio agudo en los perros y a pesar de los programas de vacunación, la inmunidad producida por la inmunización al parecer no confiere protección completa contra la infección, ni el curso clínico de la enfermedad o la diseminación del organismo, debido probablemente a que la traqueobronquitis infecciosa usualmente es resultado de la infección con el virus de parainfluenza canina, virus de influenza canina, adenovirus canino tipo II y *Bordetella bronchiseptica* (Ghasemzadeh y Namazi, 2015).

La enfermedad producida por *Bordetella bronchiseptica* es un padecimiento de alta morbilidad y baja mortalidad, con signos clínicos más severos en cachorros y en perros que no cuentan con un historial de vacunación. El periodo de incubación varía de tres a diez días y la recuperación en casos leves puede darse en cuestión de días sin la implementación de un tratamiento, aunque en ocasiones puede extenderse a un periodo de varias semanas. La presentación clínica de la enfermedad en su estado agudo inicia con tos accesos de tos seguida de vómito la cual puede empeorar con el ejercicio, aumento en la producción de moco en la tráquea, desarrollo de tos productiva, descarga nasal y ocular de carácter serosa, mucosa o mucopurulenta y estornudos. La presentación con fiebre, letargia e inapetencia

son menos comunes y generalmente se asocian a complicaciones bacterianas del tracto respiratorio bajo (Ford, 2012).

Distribución

El CRIC, también conocido como tos de las perreras o traqueobronquitis infecciosa canina (TIC) tiene una distribución mundial y se considera una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en perros (Buonavoglia y Martella, 2007). Afecta el tracto respiratorio superior e involucra por lo general a varios agentes infecciosos, provocando tos seca y descarga nasal. Es altamente contagiosa lo que hace que poblaciones grandes de perros que conviven en espacios reducidos sean más susceptibles a contraer esta enfermedad, como en el caso de los albergues de animales y guarderías para mascotas (Schulz et al., 2014). A pesar de la implementación de programas de vacunación contra *Bordetella bronchiseptica* y demás patógenos asociados, los brotes de esta enfermedad continúan reportándose en todo el mundo. Los perros de todas las edades son susceptibles a la enfermedad, aunque los cachorros son particularmente propensos a las infecciones bacterianas oportunistas. La inmunidad natural posterior a la recuperación de la infección es difícil de establecer o medir debido a que la TIC es una consecuencia de la exposición e infección con múltiples patógenos actuando de forma individual o en combinación en un sólo individuo (Ford, 2012).

Factores de riesgo

La infección por *Bordetella bronchiseptica* ocurre con frecuencia cuando un grupo de perros se mantienen confinados o conviven en algún evento, como es el caso de los espectáculos de talentos o demostración de razas de perros o eventos deportivos de campeonato. La enfermedad es irritante, auto limitante y puede progresar a una bronconeumonía. Además de sus propiedades infecciosas, esta bacteria posee múltiples factores de patogenicidad, resultando en altas concentraciones de patógenos que hacen más eficiente la exposición. Asimismo, el estrés psicológico al que son sometidos los perros por las grandes concentraciones de animales, las diferencias entre la susceptibilidad del huésped y estado inmune del mismo significan en conjunto, los factores de riesgo más importantes para esta enfermedad (Ellis et al., 2011). La infección simultánea con dos o más agentes patógenos asociados a la TIC en el mismo paciente representa un riesgo significativo en el aumento de la morbilidad entre perros susceptibles. Perros alojados en perreras privadas y comerciales, tiendas de mascotas, refugios para perros e instalaciones que alojan a muchos animales, como los hospitales veterinarios, tienen un riesgo significativamente más alto de exposición e infección y la incidencia puede ser de hasta un 50-90% (Keil & Fenwick, 1999) comparada a los perros que permanecen dentro de su casa (Ford, 2012).

Prevalencia

El CRIC tiene una alta tasa de prevalencia alrededor del mundo, particularmente en lugares donde existe una elevada densidad de animales (Ford, 2012). En un estudio realizado en los Estados Unidos durante 2015 en

once centros de control animal privados ubicados en los estados de California, Arizona, Colorado, Indiana, Florida, Pennsylvania, Virginia y Carolina del Sur; la prevalencia de *Bordetella bronchiseptica* como único patógeno del CRIC fue del 29.0%, la prevalencia de dos patógenos involucrados en los casos fue del 12.7%, la prevalencia de tres patógenos del 3.8% y con más de 4 cuatro patógenos la prevalencia fue de 2.2% (Lavan & Knesl, 2015). Es importante señalar que todos los perros que fueron incluidos en ese estudio eran asintomáticos y clínicamente sanos cuando fueron admitidos a su respectivo centro de control y su estado de vacunación era desconocido, lo que sugiere que los patógenos responsables del desarrollo del CRIC no se asocian aleatoriamente y *Bordetella bronchiseptica* estuvo presente en todos los grupos positivos. Los resultados de ese proyecto son indicativos que la presencia de *Bordetella bronchiseptica* puede facilitar las co-infecciones e incrementar la probabilidad de desarrollar un cuadro clínico CRIC (Ettinger y Kantrowitz, 2005).

Diagnóstico

El diagnóstico oportuno de infecciones causadas por *Bordetella spp* es muy importante en la vigilancia y control de la propagación de esta enfermedad, sin embargo; en la práctica de la medicina veterinaria de pequeñas especies, las infecciones de vías respiratorias se tratan regularmente aplicando terapia con antibióticos de amplio espectro sin realizar ninguna prueba o evaluación previa del estado de salud general del animal. La falta de un diagnóstico preciso basado en pruebas de laboratorio para administrar una droga o antibiótico puede ocasionar afectaciones graves para el paciente (Garbal et al., 2016). Las

herramientas de diagnóstico utilizadas en la actualidad para el diagnóstico de *Bordetella spp* incluyen el cultivo microbiológico seguido de la caracterización bioquímica (Diamini et al., 2012). Más recientemente, se ha extendido el uso de pruebas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen las plataformas de PCR y más recientemente las plataformas RT-PCR; las cuales superan algunas de las limitaciones del cultivo y los métodos serológicos para el diagnóstico de las infecciones ocasionadas por *Bordetella spp* (Tizolova et al., 2014).

Cultivo microbiológico

Los medios de cultivo de elección para el crecimiento bacteriano de *Bordetella spp* son el agar Bordet-Gengou o el agar Regan-Lowe, en los cuales se recomienda la adición de cefalexina para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes. Los platos son incubados a una temperatura de 35°C a 37°C en cámara húmeda y concentración de CO₂ del 4%. Se recomiendan periodos de incubación de hasta 12 días para obtener un nivel de sensibilidad óptimo, pero generalmente *Bordetella bronchiseptica* forma colonias visibles después de 1 a 3 días. El crecimiento de colonias debe verificarse diariamente para prevenir el desarrollo de bacterias contaminantes. Después puede ser identificada mediante reacciones bioquímicas, por aglutinación empleando sueros específicos o preferentemente empleando pruebas moleculares (Van der Zee et al., 2015). El cultivo microbiológico tiene una sensibilidad del 12-60% y una especificidad cercana al 100% y se estima que la sensibilidad del cultivo varía entre 15 y 45% cuando la muestra se obtiene durante los 21 días del inicio de

los síntomas y de 0% si se obtiene tres semanas después (Van der Zee et al., 2015; Aquino et al., 2012). El cultivo microbiológico de muestras tomadas de la nasofaringe se considera como la prueba de oro para la detección de las diferentes especies de *Bordetella spp* y a pesar de que el cultivo microbiológico es altamente específico, la sensibilidad no siempre es la óptima debido a que las bacterias del grupo *Bordetella spp* son de lento crecimiento y el desarrollo de bacterias contaminantes es frecuente (Arbefeville et al., 2014).

Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico sigue siendo una de las primeras técnicas utilizadas como apoyo para confirmar un cuadro clínico de *Bordetella bronchiseptica*, a pesar de los problemas asociados a las pruebas serológicas como el caso de la interferencia de anticuerpos si el animal posee un historial de inmunización o enfermedad previa con *Bordetella bronchiseptica*; ya que las reacciones cruzadas con otras especies de *Bordetella spp* o incluso con otras bacterias es frecuente debido a la homología de los lipolisacáridos de la membrana bacteriana, además de la variabilidad en la respuesta humoral que los animales desarrollan contra el antígeno bacteriano (Van der Zee et al., 2015).

La infección con *Bordetella bronchiseptica* produce buenas respuestas humorales con incremento en la concentración sérica de anticuerpos IgA, IgG e IgM contra múltiples antígenos bacterianos, dentro de los que sobresale la pertactina (PRN), una proteína de 69 KDa clasificada como factor de virulencia

para *Bordetella spp* y que es el antígeno más frecuentemente utilizado para la determinación serológica de la enfermedad (Ellis et al., 2014).

Existen además otras metodologías para detectar anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*, como los sistemas ELISA, pruebas de micro aglutinación, fijación de complemento, hemaglutinación indirecta e inmunotransferencia. En la actualidad, los sistemas ELISA para detección de anticuerpos son los más utilizados en la práctica clínica debido básicamente a su diseño, facilidad de utilización y estandarización y a que se encuentran disponibles comercialmente. El resto de las metodologías mencionadas tienen sus aplicaciones bajo esquemas de estudios controlados para evaluación de vacunas, nuevos tratamientos antibióticos y terapias alternativas (Ellis et al., 2014; Aquino et al., 2011).

Pruebas de PCR y RT-PCR

Se ha demostrado en varios estudios que las pruebas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen una probabilidad de dos a cuatro veces mayor de detectar *Bordetella spp* en comparación a los métodos convencionales como el cultivo microbiológico o la serología (Arbefeville et al., 2014), debido principalmente a que las técnicas moleculares poseen una mayor sensibilidad y especificidad (Martini et al., 2017). La mayoría de las pruebas basadas en el PCR se basan en la amplificación y detección de secuencias de ADN homólogas o heterólogas específicas para cada especie de *Bordetella* presentes en el genoma bacteriano, lo que permite un aumento la sensibilidad de este tipo de pruebas (Martini et al., 2017; Bottero et al., 2013). Además, las

metodologías que emplean el PCR o el RT-PCR, funcionan con protocolos de laboratorio que reducen de manera importante el riesgo de contaminación, debido a que en principio, operan dentro de un sistema cerrado en gabinetes de seguridad que una vez que los reactivos son mezclados, no se requiere un manejo posterior que implique contaminación (Van der Zee et al., 2015).

Se ha documentado que las técnicas basadas en el RT-PCR poseen una sensibilidad entre 70-99% y una especificidad entre 86-100%, esta variabilidad depende en gran medida del tipo de inhibidores presentes en la muestra de donde se realiza la extracción del ADN, del formato químico utilizado para el RT-PCR y el cálculo correcto de las temperaturas dentro de cada ciclo, aunque el factor más importante es la selección del gen y secuencia de blanco genómico definido para la prueba (Martini et al., 2017; Aquino et al., 2011). Actualmente, el diagnóstico molecular basado en técnicas RT-PCR para las distintas especies de *Bordetella spp*, son ensayos que utilizan distintos métodos de extracción de ADN, así como diversas plataformas químicas y reactivos de PCR. Antes de realizar el diagnóstico molecular de *Bordetella bronchiseptica*, es necesario diseñar y establecer una ruta crítica de protocolos de extracción y manipulación del ADN que será utilizado en las pruebas. Lo anterior, evita la incorporación de ADN en exceso, contaminantes e inhibidores del RT-PCR que pudieran formar parte de la matriz de extracción del ácido nucleico, permitiendo el desarrollo las condiciones más óptimas para que el ADN objetivo sea amplificado y posteriormente detectado (Gao et al., 2014; Aquino et al., 2011).

Algunas de las plataformas moleculares reportadas para el diagnóstico de *Bordetella bronchiseptica* en muestras provenientes de perros sospechosos

se fundamentan en la amplificación de la secuencia intergenómica específica del gen estructural que codifica para flagelina (flaA), el principal componente proteínico de los flagelos bacterianos (Khayer et al., 2014). Así mismo, distintas plataformas moleculares se basan en la amplificación y detección de secuencias de inserción (IS) presentes en múltiples copias por genoma, lo que aumenta la sensibilidad de la prueba de PCR. La IS481 e IS1001 son dos secuencias ampliamente utilizadas para la detección de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, respectivamente. Sin embargo se ha demostrado que algunos aislados de *Bordetella bronchiseptica* también albergan IS481 y/o IS1001, lo que refleja una complicación con la utilización de este gen para discriminar entre las diferentes especies de bacterias del género *Bordetella*, sin embargo; es de gran utilidad para establecer la presencia de *Bordetella spp* en un espécimen proveniente de paciente no canino (Tizolova et al., 2014).

Uno de los genes blanco más estudiados para el diagnóstico de la infección por *Bordetella bronchiseptica* en perros es el gen TonB (antes bfrZ), el cual codifica para un receptor del sideróforo de esa bacteria. Basado en la amplificación de un fragmento del gen TonB, Jinnerot y colaboradores (2015) desarrollaron y validaron un sistema RT-PCR para detección de *Bordetella bronchiseptica* en muestras de exudado nasal colectadas con hisopos nasofaríngeos de perros sintomáticos y asintomáticos de CRIC. Los resultados de ese trabajo reportan que el RT-PCR demostró niveles de sensibilidad del 96%, especificidad del 100%, eficiencia de amplificación de 95% con un límite de detección de 4×10^3 unidades formadoras de colonia por mililitro (CFU/ml) de

muestras clínica, lo cual corresponde a un valor teórico de aproximadamente 10 equivalentes genómicos por reacción de RT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo e instrumentación de una plataforma RT-PCR para el diagnóstico molecular de *Bordetella bronchiseptica*, basada en la amplificación de un fragmento del gen TonB empleando ADN extraído de muestras de exudado nasal de perros asintomáticos y con síntomas asociados al CRIC.

Localización del área de estudio

Las muestras de exudado nasal fueron colectadas en el Centro Municipal de Control Animal (CMCA) de Mexicali, Baja California; así como en una clínica de pequeñas especies de la misma ciudad. Las tareas de procesamiento de muestras, extracción de ADN y pruebas RT-PCR en tiempo real se realizaron en el área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Serología de la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico (ULADI) del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) en la ciudad de Mexicali, Baja California, México.

Muestras

Se colectaron 102 muestras de exudado nasal de las cuales 63 fueron tomadas de animales capturados por el CMCA y 39 corresponden a perros que acudieron a una clínica de pequeñas especies de la ciudad. Los muestreos se realizaron entre los meses de Febrero-Marzo y Septiembre-Octubre de 2019. Las muestras del CMCA fueron tomadas durante el procedimiento de eutanasia a que son sometidos los perros. Brevemente, los perros fueron sedados con xilacina por vía intramuscular y posteriormente sujetos a una sobredosis de pentobarbital sódico, procedimiento que produce un paro cardio-respiratorio sin sufrimiento del animal. Una vez alcanzado el plano anestésico profundo, se colectó una muestra de exudado nasal profunda utilizando hisopos a base de dacrón tipo escobetilla, depositando la muestra con el exudado en un tubo de 1.5 ml con solución salina de fosfatos estéril.

Las muestras obtenidas en la clínica veterinaria fueron tomadas de animales asintomáticos y que presentaban síntomas clínicos asociados al CRIC que acudieron a consulta, no fue necesario el uso de ningún tranquilizante ni relajante muscular, solo se utilizó un bozal y la restricción manual al momento de introducir el hisopo en la cavidad nasal profunda, recolectar la muestra y posteriormente colocarla el tubo con solución salina de fosfatos correspondiente. Las muestras de exudado nasal colectadas en el CEMCA y en la clínica veterinaria fueron almacenadas congelación a -20 °C hasta el momento de su procesamiento para extracción de ADN.

Controles positivos para *Bordetella bronchiseptica*

Como control positivo para las pruebas RT-PCR se utilizó ADN extraído de la vacuna intranasal de uso comercial *BronchiShield III* (Zoetis, México) que contiene cultivos avirulentos de *Bordetella bronchiseptica*, además de virus inactivado modificado de Parainfluenza Canina y Adenovirus Canino Tipo 2.

Oligonucleótidos para el gen sideróforo TonB de *Bordetella bronchiseptica*

La plataforma RT-PCR se fundamenta en la amplificación del gen TonB que codifica para el receptor del sideróforo de *Bordetella bronchiseptica* con número de acceso *GenBank* NZ_CABEET010000001.1. La secuencia del gen corresponde a una molécula de ADN genómico de 2 583 pares de bases publicada el 31 de julio de 2019. El gen TonB fue seleccionado debido a que solo se expresa una copia de esta secuencia en la totalidad del genoma de *Bordetella bronchiseptica* referida.

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizaron los programas *Primer3Plus* versión 2.4, disponible en <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; el programa *GenneRunner* versión 6.1, disponible en <http://www.generunner.net/> y el programa *OligoCalc* versión 3.2, disponible en: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. A partir de estos programas se diseñaron, evaluaron y seleccionaron los juegos de oligonucleótidos que cumplen con las características físicas y químicas de longitud de primers de 20 nucleótidos con un contenido de GC entre 50 y 60%, manteniendo una temperatura de fusión entre 50-65°C, evitar repeticiones >3 nucleótidos G o C continuos, verificar que las secuencias positiva y negativa no

produzcan complementariedad y evitar la formación de dímeros u otro tipo de estructuras secundarias aberrantes. Así mismo la plataforma RT-PCR se diseñó para producir un producto amplificado de 132 pb del gen receptor del sideróforo TonB de *Bordetella bronchiseptica*; cumpliendo con lo recomendado para obtener el tamaño óptimo de producto en un rango de 75 a 300 pb, ya que los productos más pequeños desarrollan mayor eficiencia.

A partir de la secuencia del gen receptor del sideróforo TonB de *Bordetella bronchiseptica* y utilizando la paquetería arriba mencionada, se generó el oligonucleótido de banda positiva 5'-CCACTTGCTGATCTTGTTGC-3' y el oligonucleótido de banda negativa 3'-GACCTGAACCTGTATTTCCAG-5'. La amplificación por RT-PCR empleando estos oligonucleótidos genera a un producto de 132 pares de bases. Las características de los oligonucleótidos se muestran en el cuadro 1.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por GenScript LTD. (Piscataway, NJ, USA), empacados y enviados liofilizados. Cada uno fue reconstituido con agua grado biología molecular. Brevemente, los tubos con el liofilizado se centrifugaron a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agregó a cada tubo 10 veces el valor de la concentración en nano moles (nM) referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micro molar (μ M). Los tubos fueron mezclados en vórtex por 30 segundos a máxima velocidad, incubados en refrigeración a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente a máxima velocidad en vórtex.

Para las pruebas PCR tiempo real, la concentración de trabajo de los oligonucleótidos se estableció en 10 μ M para lo cual se hizo una dilución de la

mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular, produciendo cinco alícuotas de 200 µl cada una. Las soluciones estándar y de trabajo de oligonucleótidos fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de las pruebas PCR en tiempo real.

Cuadro 1. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen receptor del sideróforo con referencia *GenBank* NZ_CABEET010000001.1

GenBank: NZ_CABEET010000001.1	
Oligonucleótido*	
BbronF	Sentido positivo
Secuencia:	5'-CCACTTGCTGATCTTGTTGC-3'
Inicio: 264,257	Longitud: 20 pb Tm: 54.8 °C GC: 50%
Oligonucleótido*	
BbronR	Sentido negativo
Secuencia:	3'-GACCTGAACCTGTATTTCCAG-5'.
Inicio: 264,368	Longitud: 21pb Tm: 52.9°C GC: 47.6%
Producto:	132 pb

*Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa *Primer3Plus* versión 2.4.

Estandarización de reactivos para el RT-PCR

Con el propósito de establecer las cantidades y concentraciones óptimas de reactivos para las reacciones de RT-PCR, se probaron los oligonucleótidos por triplicado a 200 nM, 400 nM y 800 nM con 1 µl, 2 µl y 3 µl de ADN template

en un volumen total de reacción de 10 µl, empleando una mezcla maestra conteniendo *EvaGreen* (Biotium, Hayward, CA, USA), una tinción fluorescente de alta afinidad para ADN de doble banda, no tóxica ni mutagénica (cuadro 3).

Cuadro 2. Reactivos y volumen de reacción para el PCR en tiempo real de *Bordetella bronchiseptica*

Reactivo	200 nM	400 nM	800 Nm
Mezcla maestra	5 µl	5 µl	5 µl
ADN template*	1-2-3 µl individual	1-2-3 µl individual	1-2-3 µ individual
Forward	0.25 µl	0.5 µl	1 µl
Reverse	0.25 µl	0.5 µl	1 µl
H ₂ O	4 µl	3 µl	2 µl
Volumen final	10 µl	10 µl	10 µl

* El ADN template fue agregado al final en una campana de seguridad diferente.

Pruebas de RT-PCR

Los extractos de ADN fueron probados por duplicado en un termociclador *BioRad* CFX96. En cada corrida se utilizaron tres controles positivos de ADN extraído de la vacuna *BronchiShield III*, tres controles negativos conteniendo mezcla maestra sin ADN template, tres controles negativos conteniendo agua grado biología molecular y tres controles negativos conteniendo aire. Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión fueron calculados

empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra. Asimismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 75°C y hasta 95°C con incremento de 0.5°C para la identificación de curvas de amplificación específica para el producto de PCR de cada gen analizado y discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del template de ADN esperado.

Los resultados de las pruebas por RT-PCR fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente logró una señal fluorescente de amplificación por del valor de corte que la paquetería CFX96 calcula en cada corrida en un máximo de 40 ciclos. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logró desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima del valor de corte en un máximo de 40 ciclos.

RESULTADOS

Estandarización del RT-PCR para *Bordetella bronchiseptica*

Para establecer las cantidades óptimas de reactivos en las reacciones de RT-PCR para *Bordetella bronchiseptica*, se probaron los oligonucleótidos en distintas concentraciones con diferentes volúmenes de mezcla maestra *EvaGreen*, condiciones que se resumen en el Cuadro 3.

Los resultados de la amplificación y la curva de disociación calculados por el CFX96 demostraron que la combinación óptima de reactivos para obtener la máxima amplificación en las muestras se logra mezclando los oligonucleótidos BbronF y BbronR a una concentración de 500 nM con 2 µl de ADN template, aplicando un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95 °C, 15 segundos de hibridación a 54.7 °C y un ciclo final de extensión de 15 segundos a 95 °C.

Desempeño de controles positivos del RT-PCR para *Bordetella*

Los controles positivos de ADN extraído de la vacuna intranasal de uso comercial *BronchiShield III* fueron probados por triplicado produciendo un valor promedio del ciclo de amplificación (Ct) de 23.97 con una temperatura de disociación (Tm) promedio de 86.8°C.

Cuadro 3. Optimización de oligonucleótidos con mezcla maestra EvaGreen para el PCR en tiempo real de *Bordetella bronchiseptica*.

Reacción ^(a)	Promedio T _m ^(b)	Promedio C _t ^(c)	Reacción ^(a)
200 nM + 1 µl	None	14.58	200 nM + 1
200 nM + 2 µl	86.5 °C	12.38	200 nM + 2
200 nM + 3 µl	86 °C	17.19	200 nM + 3
400 nM + 1 µl	None	13.17	400 nM + 1
400 nM + 2 µl	86 °C	11.68	400 nM + 2
400 nM + 3 µl	86.5 °C	15.45	400 nM + 3
800 nM + 1 µl	None	13.35	800 nM + 1
800 nM + 2 µl	87 °C	10.08	800 nM + 2
800 nM + 3 µl	86.5 °C	16.57	800 nM + 3

(a) Concentración de oligonucleótidos + µl de ADN en muestras por triplicado

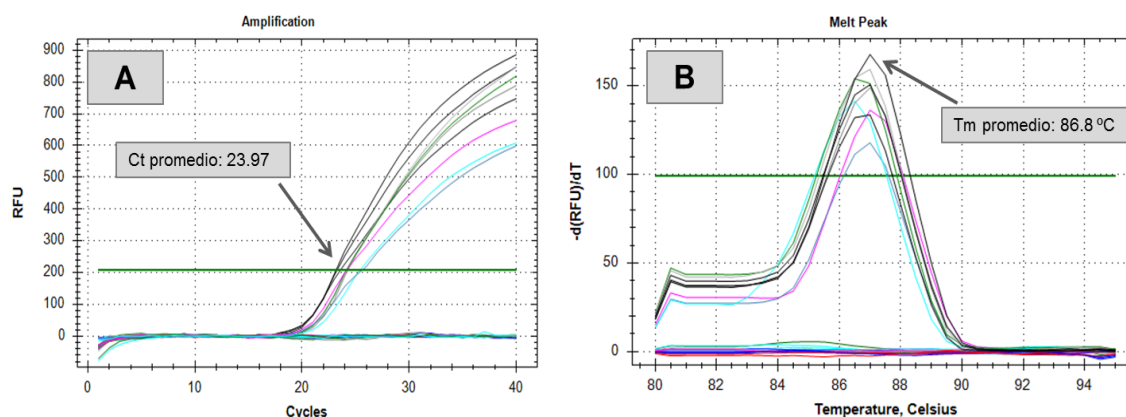
(b) T_m = Temperatura de disociación

(c) C_t = Ciclo de amplificación

Los controles negativos, consistentes en tubos con mezcla maestra sin ADN template, tubos con agua grado biología molecular y un tubo con aire no

mostraron evidencia de amplificación alguna en los 40 ciclos de cada corrida correspondiente (Figura 1).

Figura 1. Curvas de amplificación (A) y disociación (B) de controles positivos y negativos obtenidas durante el proceso de optimización del PCR en tiempo real para *Bordetella bronchiseptica*.



Resultados de RT-PCR para muestras de exudado nasal

Se probaron por duplicado un total de 102 muestras de exudado nasal de perros capturados por el CMCA (n=63) y 39 muestras provenientes de perros atendidos en una clínica veterinaria particular de Mexicali. Los resultados generales de las pruebas RT-PCR indican que 28 muestras (27.5%) desarrollaron una amplificación por encima del valor de corte establecido por el software CFX96 y fueron consideradas como positivas (Cuadro 4).

Para el caso del grupo de 63 muestras de ADN extraído de exudado nasal de perros capturados por el CMCA de Mexicali, los resultados de las

pruebas RT-PCR indican que 25 especímenes (39.7%) desarrollaron una amplificación por encima del valor de corte establecido por el software CFX96 y fueron consideradas como positivas. De igual forma, para el grupo de muestras de ADN extraído de exudado nasal de perros atendidos en una clínica de pequeñas especies privada de Mexicali, los resultados de las pruebas RT-PCR indican que 3 de las 39 muestras analizadas (7.7%) lograron una amplificación por encima del valor de corte establecido por el software CFX96 y fueron consideradas como positivas. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados generales y por grupo de muestras del RT-PCR para *Bordetella bronchiseptica*.

Origen de la muestra	Número de muestras (%)	RT-PCR Positivo	RT-PCR Negativo
CEMCA	63 (61.8%)	25 (24.5%)	38 (37.3%)
Clínica privada	39 (38.2%)	3 (7.7%)	33 (32.4%)
Total	102 (100%)	28 (27.5%)	71 (69.6%)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se reporta el desarrollo e instrumentación de un sistema RT-PCR para el diagnóstico molecular de *Bordetella bronchiseptica* a partir de ADN extraído de muestras de exudado nasal de perros atendidos en una clínica veterinaria particular (n=39) y perros callejeros capturados por el CMCA (n=63) que presentaron síntomas y sin síntomas de enfermedad asociada al CRIC.

El sistema RT-PCR aquí descrito, se fundamenta en la amplificación de un fragmento de ADN de 132 pb del gen sideróforo TonB de *Bordetella bronchiseptica*; dicho gen interactúa con los receptores de superficie de las células del epitelio respiratorio encargados de la absorción y transferencia de hierro, un elemento crítico para la colonización de *Bordetella* en el tracto respiratorio (Oviedo et al., 2019). Genéticamente, el gen TonB es altamente conservado entre las distintas especies patógenas de *Bordetella* (Martini et al., 2017; Linz et al., 2016; Jinnerot et al., 2015; Khayer et al., 2014), lo cual permite una alta especificidad en la detección de *Bordetella bronchiseptica* a través de plataformas moleculares como la aquí descrita.

Es importante mencionar que para la etapa de estandarización y optimización de reactivos de la plataforma de RT-PCR se utilizaron controles positivos de ADN extraídos de la vacuna *Bronchi-Shield III* (Zoetis, México), un biológico diseñado para la prevención de tos de las perreras que contiene cultivos atenuados de *Bordetella bronchiseptica*. La extracción de ADN a partir

de este biológico y su utilización como control positivo de referencia, proporciona evidencia de la correcta amplificación del fragmento de ADN correspondiente al gen TonB de *Bordetella bronchiseptica* en las muestras que resultaron positivas y puede ser fácilmente adaptado para su uso como control positivo de referencia en plataformas de diagnóstico molecular del gen TonB o cualquier otro gen con valor diagnóstico de esta bacteria en particular.

La plataforma RT-PCR para *Bordetella bronchiseptica* también incluyó la aplicación del análisis de la curva de disociación, la cual consiste en medir la temperatura específica a la que una molécula de ADN de doble banda se desnaturaliza y se separa en dos moléculas de banda sencilla independientes. El análisis de la curva de disociación representa una técnica sencilla de ejecutar, sensible, económica, rápida y altamente comparable con las técnicas de secuenciación de nueva generación (Seeb et al., 2011). Para el caso específico del producto amplificado de 132 pb del gen TonB, se genera una curva de disociación a una temperatura promedio de 86.8 °C, la cual es específica para el fragmento objetivo del RT-PCR, convirtiendo a esta plataforma en una herramienta sensible, rápida y precisa para el diagnóstico de *Bordetella bronchiseptica* asociada a CRIC en perros.

Tradicionalmente, las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos tanto en humanos como en animales, han dominado las plataformas de diagnóstico para *Bordetella* bajo el argumento de que las técnicas moleculares son inferiores debido al efecto de inhibidores del ADN polimerasa presentes en las muestras de sangre (Lavan et al., 2015; Ellis et al., 2014). Sin embargo, la utilización de reactivos de última generación para

extracción de ADN, como los empleados en este trabajo, permiten la obtención de ácido nucleico prácticamente libre de inhibidores del ADN polimerasa, resultando en un mejor desempeño de las pruebas y la obtención de curvas de amplificación bien definidas tanto para los controles positivos y negativos como para las muestras analizadas.

Los resultados de este trabajo muestran que aproximadamente 3 de cada 10 perros se encontraban infectados con *Bordetella bronchiseptica*. Estos datos representan el primer reporte que confirma la presencia de esa bacteria en las poblaciones de perros con dueño y perros callejeros para esta región de Baja California, aplicando una metodología altamente sensible y específica. Si bien el número de muestras analizadas en este trabajo no permite establecer una tasa de prevalencia para *Bordetella bronchiseptica* en la región, es evidente que la población de perros callejeros significa el principal reservorio de la enfermedad, contabilizando 25/63 casos positivos, mientras que de las muestras provenientes de perros con dueño atendidos en una clínica veterinaria particular solo 3/36 arrojaron un resultado positivo. Lo anterior significa que es 7.89 veces más probable ($p < 0.001$) que ocurra un caso de *Bordetella bronchiseptica* en perros callejeros que en perros con dueño que normalmente viven en una casa.

Asimismo, está ampliamente documentado que los perros callejeros funcionan como reservorios para una gran cantidad de enfermedades infecciosas, muchas de ellas zoonóticas, las cuales son transmitidas a los humanos a través de aerosoles, saliva, distintas secreciones del sistema respiratorio, urinario y heces. La transmisión zoonótica de *Bordetella*

bronchiseptica ocurre principalmente a través de aerosoles provenientes de perros infectados (Ghasemzadeh y Namazi, 2015) y se reconoce que el incremento en las poblaciones de perros callejeros y perros que aunque tienen dueño y viven en una casa habitación se les permite deambular libremente en zonas urbanas residenciales, implican mayor riesgo de contraer y transmitir distintas enfermedades infecciosas (Ghasemzadeh y Namazi, 2015; Chomel, 2014).

En México, los reportes de infección por *Bordetella bronchiseptica* en perros son sumamente escasos, sin embargo, existe evidencia de la presencia de esta bacteria como parte del CRIC en perros provenientes de una escuela de entrenamiento canino y perros callejeros de la zona central de México, donde se logró el aislamiento microbiológico de 11 casos de *Bordetella bronchiseptica* a partir de 130 muestras de exudado nasal para una tasa de infección del 8.5%. De esos aislamientos, 5/11 (45%) provenían de muestras de perros callejeros y 6/11 (55%) de canes que asistían a una escuela de entrenamiento (Molina-González et al., 2006). Esta única referencia que reporta infección por *Bordetella bronchiseptica* en dos poblaciones distintas de perros, difiere de los resultados obtenidos en este trabajo, donde la mayoría de los casos (25/28) fueron detectados en perros callejeros, con una mínima proporción en perros de casa. De igual forma, la tasa de infección general (8.5%) es menor a un tercio de la obtenida en este trabajo, debido probablemente a que las técnicas moleculares son más sensibles y requieren de solo unas cuantas moléculas de ADN para detectar la presencia de

Bordetella bronchiseptica en las muestras analizadas (Martini et al., 2017; Bottero et al., 2013).

En otro estudio realizado en la India cuyo objetivo consistía en establecer la presencia de *Bordetella bronchiseptica* en perros aparentemente sanos y con síntomas de CRIC, se analizaron 185 muestras de exudado nasal y suero sanguíneo empleando PCR de punto final. Los resultados de ese estudio produjeron 14/185 resultados positivos para una tasa de infección del 7.6% y 100% de concordancia entre amplificación por PCR a partir de muestras de suero y de exudado nasal (Singh et al., 2015). No obstante, se emplearon técnicas moleculares en dos tipos de muestras, en esa investigación no se especifica si las muestras provenían de perros callejeros o perros de casa, aunque es evidente que la tasa de infección es baja comparada con la obtenida para las poblaciones de perros en el municipio de Mexicali reportadas en el presente estudio.

En un estudio más reciente realizado en los Estados Unidos de América, cuyo objetivo consistió en investigar la presencia de *Bordetella bronchiseptica* y otros patógenos de origen bacteriano y viral asociados al CRIC en perros con síntomas y sin síntomas de enfermedad respiratoria, se probaron 559 muestras de exudado nasal mediante una plataforma RT-PCR múltiple. Los resultados demostraron la presencia de *Bordetella bronchiseptica* en 51/559 muestras analizadas para una tasa de infección del 10% en ese grupo de animales (Maboni et al., 2019). Al igual que los trabajos mencionados previamente, la tasa de infección por *Bordetella bronchiseptica* es relativamente baja (10%) comparada con la obtenida en nuestro estudio, aunque es importante

mentonar, que los agentes virales investigados en el trabajo referido, resultaron con prevalencias más elevadas; debido posiblemente a una situación eco-epidemiológica particular de la zona donde se realizó dicho estudio.

La mayoría de los estudios sobre la presencia de *Bordetella bronchiseptica* en perros reportan prevalencias menores al 10%, sin embargo; también existen reportes donde esta bacteria está presente en un elevado número de casos de CRIC. Tal es el caso de un estudio realizado en Alemania en 61 perros con síntomas de CRIC y 90 perros aparentemente sanos donde se probaron muestras de exudado nasal por técnicas RT-PCR. Los resultados de ese estudio demostraron la presencia de *Bordetella bronchiseptica* en el 78.7% de las muestras analizadas por RT-PCR, principalmente en perros con síntomas de CRIC, aunque también se detectó la presencia de la bacteria en perros aparentemente sanos (Schulz et al., 2014). Los resultados de ese estudio superan 3:1 la tasa de infección reportada para las poblaciones de perros del municipio de Mexicali y demuestran que la infección por *Bordetella bronchiseptica* puede extenderse a un número importante de perros en una región particular.

La utilización de una plataforma de PCR en tiempo real como la aquí descrita para la detección temprana de *Bordetella bronchiseptica* puede convertirse en una herramienta valiosa para el diagnóstico rápido y certero tanto de infección en casos individuales como en situaciones de brotes epidémicos de esta enfermedad o bien, para establecer el diagnóstico diferencial con brotes de otras enfermedades del tracto respiratorio asociadas al CRIC.

La prevención de enfermedades zoonóticas transmitidas por perros, especialmente por perros callejeros, recae en gran medida en la capacidad de los especialistas en salud de educar a la población en temas que incluyan la importancia de estas poblaciones de animales como vectores de distintas enfermedades, las medidas de prevención y control de las mismas y sobre la tenencia responsable de mascotas, enfatizando en el papel que juegan en la transmisión y perpetuación de estas enfermedades.

Como estrategia de acción contra la infección zoonótica de *Bordetella bronchiseptica* que utiliza al perro como reservorio y son transmitidas a través del contacto directo con animales infectados, se sugiere adoptar la perspectiva de una sola salud para abordar el problema de las zoonosis transmitidas por perros domésticos y callejeros en nuestra región, lo cual puede lograrse promoviendo y compartiendo el conocimiento y la habilidad para reconocer la existencia de este grupo de enfermedades por las profesiones encargadas de la medicina humana y veterinaria, creando grupos de investigación con miembros de ambas profesiones en búsqueda de ampliar el conocimiento sobre esta problemática de salud, su epidemiología, distribución geográfica y patogénesis; y en conjunto, desarrollar pruebas de diagnóstico sensibles y eficaces junto con sistemas de vigilancia epidemiológica que ayuden a profundizar en el conocimiento de las interacciones entre mascotas y animales peri-domésticos que pudieran tener una participación determinante en la epidemiología de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino y sus implicaciones hacia la salud humana.

CONCLUSIONES

La plataforma RT-PCR desarrollada en este trabajo es una herramienta confiable, sensible y precisa para la detección de *Bordetella bronchiseptica* en perros.

El número de muestras que resultaron positivas (28/102) a la plataforma RT-PCR aquí referida no puede ser extrapolada a la población canina de la región, sin embargo; sugiere una amplia distribución de *Bordetella bronchiseptica* en la población de perros callejeros del municipio de Mexicali.

Se requiere de estudios epidemiológicos adicionales, con un tamaño de muestra estadísticamente apropiado, que incluya poblaciones de perros callejeros y domésticos provenientes de zonas geográficas representativas de la región para conocer la magnitud real del problema de *Bordetella bronchiseptica* en la población canina de la región y las posibles implicaciones zoonóticas de la enfermedad.

La educación como base fundamental para la comprensión de los riesgos asociados a la presencia de perros domésticos o callejeros infectados con *Bordetella bronchiseptica* debe ser propuesta como estrategia para la

detección, tratamiento y prevención oportuna de esta enfermedad y otras patologías zoonóticas transmitidas por los perros.

REFERENCIAS

- Aquino Andrade, A., Martínez Leyva, G. & De Colsa Ranero, A. (2011). Aspectos genómicos de *Bordetella pertussis* y el camino hacia el nuevo estándar de oro en el diagnóstico de la tos ferina. Microbiología molecular para el clínico. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. Vol. 24, No. 96, pp. 139-146.
- Arbefeville, S., Levi, M.H. & Ferrieri, P. (2014). Development of a multiplex real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a single tube reaction. Journal of Microbiological Methods. Vol. 97, pp. 15-19.
- Book, A. & Gross, R. (2001). The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. Journal of Medical Microbiology. Vol. 291, pp. 119-130.
- Bottero, D., Griffith, M.M., Lara, C., Flores, D., Pianciola, L., Gaillard, M.E., Mazzeo, M., Zamboni, M.I., Spoletti, M.J., Anchart, E., Ruggeri, D., Sorhouet, C., Fiori, S., Galas, M., Tondella, M.L. & Hozbor, D.F. (2013).

Bordetella holmesii in children suspected of pertussis in Argentina. *Epidemiol Infect.* Vol. 141, pp. 714-717.

Boursaux-Eude, C. & Guiso, N. (2000). Polymorphism of Repeated Regions of Pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infection and Immunity*. Vol. 68, No. 8, pp. 4815-4817.

Buonavoglia, C. & Martella, V. (2007). Canine respiratory viruses. *Veterinary Research*. Vol. 38, pp. 355-373.

Canonne, A.M., Billen, F., Tual, C., Ramery, E., Roels, E., Peters, I. & Clerex, C. (2016). Quantitative PCR and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Dogs with *Bordetella bronchiseptica* Infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 30, pp. 1204-1209.

Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O.M. & Deora, R. (2016). *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *FEMS Pathogens and Disease*. Vol. 74, No. 1, pp. 1-8.

Chalker, V., Toomey, C., Opperman, S., Brooks, H.W., Ibuoye., M.A. Brownlie, J. & Rycroft, N. (2003). Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to *Bordetella bronchiseptica* Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical Respiratory

Symptoms. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 10, No. 3, pp. 352-356.

Chomel, B. B. (2014). Emerging and Re-Emerging Zoonoses of Dogs and Cats. *Animals: an open access journal from MDPI*, 4(3), 434-445.

Diamini, N.R., Bhamjee, A., Levick, P., Uniacke, E., Ismail, H. & Smith, A. (2012). Spontaneous bacterial peritonitis and pneumonia caused by *Bordetella bronchiseptica*. J Infect Dev Ctries. Vol. 6, pp. 588-591.

Ducours, M., Rispal, P., Danjean, M.P., Imbert, Y., Dupont, E., Traissac, E.M. & Grosleron, S. (2017). *Bordetella bronchiseptica* infection. Med Mal Infect.

Ellis, J., Anseeuw, E., Gow, S., Bryan, H., Salb, A., Goji, N., Rhodes, C., La Coste, S., Smits & J. & Kutz, S. (2011). Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and *Bordetella bronchiseptica* infectious in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities. Can Vet J. Vol. 52, pp. 861-868.

Ellis, J., Rhodes, C., Lacoste, S. & Krakowka, S. (2014). Antibody responses to *Bordetella bronchiseptica* in vaccinated and infected dogs. Can Vet J. Vol. 55, pp. 857-864.

Ettinger, S.J. & Kantrowitz, B. (2005). Diseases of the trachea. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine, Volume II, 6th edn. Eds S.J. Ettinger and E.C. Felman. Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA. pp. 1217-1232.

Ford, R.B. (2009). *Bordetella bronchiseptica*: beyond kennel cough. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Eds J.D. Bonagura, D.C. Twedt. Saunders-Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 646-649.

Ford, R.B. (2012). Canine Infectious Respiratory Disease. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, Chapter 6, 4th edn. Eds. Greene C.E. Saunders-Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp. 55-61.

Gao, F., Mahoney, J.C., Daly, E.R., Lamothe, W., Tullo, D. & Bean, C. (2014). Evaluation of a Multitarget Real-Time PCR Assay for Detection of *Bordetella* Species during a Pertussis Outbreak in New Hampshire in 2011. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 52, No. 1, pp. 302-306.

Garbal, M., Adaszek, L., Lyp, P., Frymus, J., Winiarczyk, M. & Winiarczyk, S. (2016). Occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in domestic cats with upper respiratory tract infections. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. Vol. 19, No. 2, pp. 353-358.

- Ghasemzadeh, I. & Namazi, S.H. (2015). Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *Journal of Medicine and Life*. Vol. 8, pp. 1-5.
- Goodnow, R.A. (1980). Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*. Vol. 44, No. 4, pp. 722-738.
- Hamidou Soumana, I., Linz, B. & Harvill, E.T. (2017). Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Frontiers in Microbiology*. Vol, 8, Art. 28.
- Jinnerot, T., Malm, K., Eriksson, E., Johansson-Wensman, J. (2015). Development of a Taqman Real-Time PCR Assay for Detection of *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*. Vol. 1, pp. 14-20.
- Keil, D.J. & Fenwick, B. (1999). Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and ribotyping. *Veterinary microbiology*. Elsevier. Vol. 66, pp. 41-51.
- Khayer, B., Magyar, T. & Wehmann, E. (2014). Flagellin typing of *Bordetella bronchiseptica* strains originating from different host species. *Veterinary Microbiology*. Elsevier. Vol, 173, pp. 270-278.

- Kilgore, P.E., Salim, A.M., Zervos, M.J. & Schmitt, H.J. (2016). Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. Vol. 29, No. 3, pp. 449-486.
- Lavan, R. & Knesl, O. (2015). Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *Journal of Small Animal Practice*. Vol. 56, pp. 572-576.
- Linz, B., Ivanov, Y.V., Preston, A., Brinkac, L., Parkhill, J., Kim, M., Harris, S.R., Goodfield, L.L., Fry, N.K., Gorringer, A.R., Nicholson, T.L., Register, K.B., Losada, L. & Harvill, E.T. (2016). Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC Genomics*. Vol. 17, pp. 767.
- Maboni, G., Seguel, M., Lorton, A., Berghaus, R., & Sanchez, S. (2019). Canine infectious respiratory disease: New insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. *PloS one*, 14(4), e0215817-e0215817.
- Martini, H., Detemmerman, L., Soetens, O., Yusuf, E. & Piérard, D. (2017). Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR. *PLOS ONE*.

- Molina-González G., R. M. E., Bárcenas-Morales, G., Montaraz-Crespo, J.A. (2006). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. *Veterinaria Mexico*, 37(3), 13.
- Oviedo, J. M., Surmann, K., Gorgojo, J. P., Valdez, H., Dhople, V. M., Lamberti, Y., et al. (2019). Shotgun proteomic analysis of *Bordetella parapertussis* provides insights into the physiological response to iron starvation and potential new virulence determinants absent in *Bordetella pertussis*. *Journal of Proteomics*, 206, 103448.
- Park, J., Zhang, Y., Buboltz, A.M., Zhang, X., Schuster, S.C., Ahuja, U., Liu, M., Miller, J.F., Sebaihia, M., Bentley, S.D., Parkhill, J. & Harvill, E.T. (2012). Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics*. Vol. 13, pp. 1471-2164.
- Priestnall, S.L., Mitchell, J.A., Walker, C.A., Erles, K. & Brownlie, J. (2014). New and Emerging Pathogens in Canine Infectious Respiratory Disease. *Veterinary Pathology*. Vol. 51, pp. 492-504.
- Seeb, J.E., Pascal, C.E., Grau, E.D., Seeb, L.W., Templin, W.D., Harkins, T. & Roberts, S.B. (2011). Transcriptome sequencing and high-resolution melt analysis advance single nucleotide polymorphism discovery in duplicated salmonids. *Mol Ecol Resour*, Vol. 11, No. 2, pp. 335-48.

- Sigh, P.L., S. B., Monika Bhardwaj Prassanvadhana, Sinha DK, Nongthombam Bobby, Agrawal RK, Pawde AM. (2015). Detection of *Bordetella bronchiseptica* in serum of apparently healthy and clinically sick pet dogs. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 3(2).
- Schulz, B.S., Kurz, S., Weber, K., Balzer, H.-J. & Hartmann, K. (2014). Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *The Veterinary Journal*. Elsevier. Vol. 201, pp. 365-369.
- Tizolova, A., Brun, D., Guiso, N. & Guillot, S. (2014). Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol. 78, pp. 347-351.
- Van der Zee, A., Schellekens, J.F.P. & Mool, F.R. (2015). Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 28, No. 4, pp. 1005-1026.
- Washington, M.A., Agee, W.A., Kajiura, L Hawley-Molloy, J.S., Staeger, C.M. & Barnhill, J.C. (2015). A Case of *Bordetella bronchiseptica* at a Military Medical Facility in Hawaii: Phenotypic and Molecular Testing of an Uncommon Human Pathogen. *Hawaii Journal of Medicine & Public Health*. Vol. 74, No. 7, pp. 230-233.