


Características fenotípicas de *Bordetella bronchiseptica* bajo almacenamiento en refrigeración

Briano Ortiz Uriel¹, Martínez García Martha¹, Monsalvo Reyes Alejandro Cruz¹, López Alcántara Ruth², Molina González María Graciela^{1*}

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México.

²Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Investigaciones Biomédicas, Av. Agustín Melgar S/N, Col Buenavista, CP 24039, Campeche, México.

Autor de correspondencia: marias@unam.mx

ORCID* : 0000-0003-0876-7428

Recibido:
28/mayo/2023

Aceptado:
04/noviembre/2023

Palabras clave:
Refrigeración y conservación,
Bordetella bronchiseptica,
cambios bioquímicos

Keywords:
Refrigeration and conservation,
Bordetella bronchiseptica,
biochemical changes

RESUMEN

El cambio en la temperatura ambiente es una de las principales tensiones a las que se enfrentan las bacterias, ya que, entre otros efectos, influye en la viabilidad y características fenotípicas y genotípicas. El propósito de este trabajo fue evaluar los cambios fenotípicos de cepas de *Bordetella bronchiseptica* que estuvieron almacenadas en refrigeración desde 2019 a 4°C. Se utilizaron pruebas bioquímicas y morfológicas, para comprobar la viabilidad se realizó la resiembra de las cepas en agar BHI. Siete cepas de las 21 utilizadas, fueron viables y con diferencias en las características bioquímicas. La conservación bajo las condiciones utilizadas, en las 7 cepas, afectó el metabolismo, tanto así que las características no corresponden al género *Bordetella*, que inicialmente se ubicaron como *B. bronchiseptica*.

ABSTRACT

The change in ambient temperature is one of the main stresses that bacteria face, since, among other effects, it influences viability and phenotypic and genotypic characteristics. The purpose of this work was to evaluate the phenotypic changes of *Bordetella bronchiseptica* strains that were stored in refrigeration since 2019 at 4°C. Biochemical and morphological tests were used; to check viability, the strains were reseeded on BHI agar. Seven strains of the 21 used were viable and with differences in biochemical characteristics. Conservation under the conditions used, in the 7 strains, affected the metabolism, so much so that the characteristics do not correspond to the genus *Bordetella*, which were initially placed as *B. bronchiseptica*.

Introducción

La evolución es algo que no es exclusivo de los seres pluricelulares, sin embargo, no es tan sencillo como el modelo estándar al que estamos acostumbrados, en donde, por alguna razón el lugar donde se encuentran se ve afectado y sobrevivirá el de mejor fenotipo y genotipo. En organismos donde la reproducción es muy rápida, su evolución depende de 2 factores importantes: mantenimiento de la información genética (baja tasa de mutación) y variación genética que le permitirá conquistar nuevos ambientes de forma más eficiente, teniendo así, la clave para su evolución y supervivencia. En el momento en que los microorganismos se encuentran en alguna situación de estrés; antibióticos, luz ultravioleta, falta de nutrientes o cambios de temperatura, por mencionar algunos, su tasa de mutaciones incrementa generando resistencia a condiciones poco favorables para ellas, por consiguiente, se crea una nueva cepa con características más favorables (Galán *et al.*, 2006).

La variación de la temperatura es uno de los principales factores que interviene en el “estrés” bacteriano, influye en la fluidez de la membrana citoplásmica y en la función de las envolturas celulares (Mansilla *et al.*, 2004). Sánchez y Corrales (2005) mencionan que en las bacterias existen diversas estrategias de adaptación al verse expuestas a condiciones de frío extremo, como la producción de enzimas resistentes al frío, aumento de ácidos grasos y sistemas de transporte adaptados. Esto resulta relevante al momento de almacenar o conservar cepas bacterianas por la técnica de congelación o enfriamiento, para los laboratorios dedicados a la conservación.

En el laboratorio de la Colección de Cultivos Bacterianos, de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores (CCBIZTA), utilizamos la congelación a -70°C , como técnica de almacenamiento a largo plazo, con criopreservantes suero fetal bovino (SFB) o glicerol, es una técnica que permite viabilidad de 10 años, por lo menos para *Escherichia coli* (Perez y Sosa 2010). En nuestra experiencia, cepas conservadas de más de 10 años, las hemos recuperado, entre ellas *Bordetella bronchiseptica*.

B. bronchiseptica, es un cocobacilo Gram negativo, móvil gracias a sus flagelos peritricos, no fermentativa, ureasa positiva, produce indol y es estrictamente aeróbica. Es una bacteria patógena, causante de enfermedades respiratorias, que evolucionó para adaptarse a diferentes ambientes, diversas especies de animales, humano, y una diversidad de nichos con condiciones ambientales diferentes.

Lo que se deduce, que este patógeno, tiene la capacidad de sobrevivir en distintos ambientes por un largo periodo de tiempo a pesar de estar en constante estrés (Porter *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2019; Fingerhann, 2011; Badhai y Das, 2021; Bridel *et al.*, 2022).

Passerini *et al.* (1995) demostraron que existen condiciones que no permiten expresiones de virulencia en *B. bronchiseptica*, entre las cuales están las bajas temperaturas, provoca el cambio fenotípico llamado “modulación antigénica” y variación fenotípica. Una investigación más actual, demostró que existen cambios en la composición de ácidos grasos y fluidez de membrana en respuesta temperaturas, 24 y 16°C , para *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Esta última expresó todos sus factores de virulencia probados cuando se desarrolló a 24°C , siendo 37°C la temperatura óptima de crecimiento (Seydlova *et al.*, 2017). Porter *et al.* (1993), mostraron que cepas de *B. bronchiseptica* pudieron crecer en amortiguador de fosfatos y en agua salina, después de almacenamiento a -70°C y glicerol como crioprotector. Stübs *et al.* (2005) identificaron la inhibición de la expresión del gen *cpsB* que pertenece a proteínas de estrés por frío (CSP). Los autores mencionan que, si bien no es la causante de alguna estrategia ante las bajas temperaturas, tiene una relación con el crecimiento, dado que a menor temperatura menor crecimiento. Las UFC de *B. bronchiseptica*, primo aislamiento, aún cuando decrementaron después de almacenarla 24h a 4°C en fluido de lavado broncoalveolar (BALF) estéril, presentó viabilidad, en comparación con 25 y 37°C que tuvieron un mayor número de células, pero con el inconveniente que hubo crecimiento de otras bacterias (Curran *et al.*, 2020).

Las condiciones de estrés, además de inducir cambios fenotípicos, puede ocasionar malas interpretaciones y tener consecuencias en la salud o equivocaciones en investigación. También origina que lleguen al estado Viable No Cultivable, perdiendo así su cultivabilidad. La importancia de conocer las mutaciones radica en poder tomar mejores estrategias para su conservación, y por consiguiente no perder parte de la colección y saber que repercusiones a la salud llega a tener el hecho de someterlas todo el tiempo a condiciones de estrés y que después estas muten (Orruño *et al.*, 2016). En este sentido, por causas ajenas al trabajo en el laboratorio de la CCBIZTA, diversas cepas identificadas como *Bordetella bronchiseptica* en primo aislamiento, se recuperaron de congelados y se conservaron a 4°C sin preservantes desde 2019. Aprovechando esta situación, queremos saber si la temperatura tuvo efecto en la viabilidad y característica fenotípicas de las cepas, a sabiendas que no es una condición que asegure el mantenimiento, pero con conocimiento que se ha aislado de ambientes extremos.

En el caso de tener presencia de crecimiento, poder incorporarlas nuevamente en la colección mediante técnicas de recuperación descritas por Oscares y Castro (2020). Por lo que nos planteamos la pregunta ¿Las cepas de *B. bronchiseptica* del laboratorio de Colección de Cultivos Bacterianos de la FES Iztacala presentaron cambios fenotípicos debido al almacenamiento de 4 años estando a 4°C sin protectores?

Metodología

Cepas utilizadas y condiciones de mantenimiento

Se utilizaron 21 cepas de *B. bronchiseptica*, de origen canino, que pertenecen al laboratorio de colección de cultivos bacterianos de la FES Iztacala (CCBIZTA), mismas que estuvieron almacenadas a 4°C desde 2019 con 8 días a temperatura ambiente. Cepas control *Salmonella* y *Bordetella bronchiseptica* LBF, almacenadas a -80°C con criopreservante suero fetal bovino (SFB).

Recuperación para viabilidad

Las cepas fueron recuperadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y/o agar BHI, y se colocaron en la incubadora a 32°C por 24h. Las bacterias que crecieron, se consideraron como viable la cepa. Después de una resiembra masiva en agar MacConkey, a partir de una UFC, después de 24h a 32°C, se procedió a tener cultivos de trabajo por resiembra en agar BHI pico de flauta y se agregó glicerol como preservante. A partir de los cultivos en agar MacConkey, se revisó la morfología microscópica por tinción Gram y se resguardaron las cepas en la colección de cultivos bacterianos usando glicerol con temperaturas escalonadas, a partir de 4°C, -20°C y finalmente a -80°C.

Caracterización fenotípica

A partir de cultivos en pico de flauta, se realizó una resiembra en agar soya tripticasa, después de 24h a 37 °C, se verificó la pureza y nuevamente morfología microscópica por tinción Gram. Las pruebas bioquímicas que se contemplaron para el estudio fueron: tipo de metabolismo óxido - fermentación en 2 tubos, utilizado aceite mineral para crear un ambiente anaerobio, citrato como única fuente de carbono, fermentación de lactosa, glucosa y sacarosa por utilizar el medio Kligler, presencia de indol en el medio SIM. Después de realizar las siembras, se dejaron por 24h en la incubadora, posterior a eso, se agregó reactivo Kovac al medio SIM para revelar el anillo de indol. Se demostró la presencia o ausencia de las enzimas ureasa, catalasa utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato, gelatinasa y oxidasa. La colocación de los cultivos en gelatina a 4°C comprobó si fueron pruebas positivas o negativas.

Para el control de medios se utilizaron las cepas control *B. bronchiseptica* LBF y *Salmonella* sp.

Resultados y discusión

Recuperación y viabilidad

De veintiun cepas, 7 con los códigos: ENP5a, N119B, 39003, 106b, ENT83, ENT2B y 78B1 fueron viabilidad, cuatro cepas se procesaron para la fenotipificación. La alta mortalidad pudo deberse a varios factores, pero consideramos que tres fueron cruciales, el tiempo, la temperatura y la plasticidad de cada bacteria. Los cambios bruscos de temperatura, ocasionan daño oxidativo (Pérez y Sosa, 2010; Sánchez y Corrales, 2005), las cepas estuvieron a temperatura ambiente durante 8 días y posteriormente a 4°C. Otra posibilidad es que, al cambio a 4°C, ya no estaban viables, las cepas crecen en 24-48h, y tal vez los nutrientes se agotaron en 24h, a pesar del medio enriquecido (Caycedo, Corrales y Trujillo, 2021).

El hecho de que las cepas ENP5a, N119B, 39003, 106b, ENT83, ENT2B y 78B1, crecieran, se debe posiblemente a una condición propia de la bacteria, presenten una plasticidad fenotípica debido a la limitación de nutrientes. Se ha demostrado en *E. coli* que se expresan genes promotores de asimilación, en condiciones de limitación de nitrógeno y carbono (Bren *et al.*, 2013). La cepa ENP5a, no se recuperó después de almacenada tres años, a -21°C, en agar MacConkey y en Caldo BHI (datos no publicados).

Características fenotípicas

Al realizar la tinción de Gram, se encontró que todas las bacterias presentaban forma de cocos y Gram negativo. Las características bioquímicas, fueron diferentes para todas las cepas (Figura 1 y Tabla 1). En el registro interno de la CCBIZTA la actividad de ureasa fue positivo y también citrato, en primo aislamiento, pero perdieron esta característica bajo las condiciones de almacenamiento mencionadas en este trabajo, caso particular de la cepa ENP5a.



Figura 1. Pruebas bioquímicas (OF, Citrato, Kligler, SIM, Urea, Gelatina y Catalasa) de *Salmonella* y las cepas 1) N119B, 2) ENP5a, 3) 106b, 4) *Salmonella* y 5) 39003.



Figura 2. Crecimiento colonial de las cepas ENP5a, ENT2B, ENT83, 78B1, N119B, 106b y 39003.

Tabla 1. Resultados de las tinciones de Gram y pruebas bioquímicas de cepas viables almacenadas a 4°C.

Bacteria	Salmonella	ENP 5a	N11 9B	106 b	390 03	78 B1	ENT 83	ENT 2B	LBF
Forma	Bacilos	Cocos							Cocobacilo
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad (SIM)	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Prueba Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metabolismo Oxidativo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metabolismo Fermentativo	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SH2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Citrato	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+

El cambio de 28°C a 4°C, pudo disminuir la actividad enzimática. Las temperaturas no apropiadas, obstruyen los procesos enzimáticos de los que dependen las bacterias para sobrevivir (Fey *et al.*, 2024). La conservación de cepas a -196 y -85°C, son las temperaturas que reducen las probabilidades de algún cambio (Molina *et al.*, 2019).

Aunque la forma característica de una especie bacteriana permanece sin cambios durante un gran número de generaciones, se producen variaciones periódicas a lo largo de la división celular y los ciclos de vida, y estas variaciones pueden verse influenciadas por las condiciones ambientales (Van Teeseling, de Pedro y Cava, 2017). Como se puede observar en la Figura 2, La morfología colonial de las cepas son diversas, en el caso de las cepas 78B1, ENP5a y 106b tienen 2 tipos de morfología, irregular, ondulado, convexo y puntiforme entera convexa, por otro lado, las formas irregulares, onduladas y convexas están presentes en 39003, ENT83, ENT2B y finalmente para N119B dos morfologías pueden distinguirse. En todas las cepas la superficie es lisa y textura cremosa, exceptuando la cepa 78B1, que presenta una superficie brillante. Las formas específicas son consecuencia de presiones adaptativas que optimizan la condición bacteriana. Por lo tanto, la morfogénesis debe verse como un importante proceso evolutivo y adaptativo que contribuye a la ubicuidad y versatilidad procariota.

Haciendo uso de las tablas de Barrow & Feltham (1993) sobre Gram negativo de bacterias anaerobia y aerobia (Tabla 1), y con base a las características bioquímicas, el ejercicio llevo a ubicar las cepas presuntamente en el género *Neisseria*, por otro lado, para la cepa 106b, no se llegó a ninguna conclusión sobre su ubicación taxonómica, otras pruebas bioquímicas son necesarias para completar la descripción y con la secuenciación de 16sRNA nos acercaremos con mayor acierto. Jofré *et al.* (2005) mencionan un estudio en el cual el 18% de las muestras obtenidas se encontraron varios microorganismos, dentro de los cuales se encontraba *Neisseria sp.* De la misma forma, Suárez *et al.* (2018) mencionan que *Neisseria* es comensal de la mucosa bucofaringea de perros y gatos sanos, también, reportan la presencia en mordidas de dichos animales. Cabe señalar que las cepas estudiadas en este trabajo, provienen de exudados nasales o faringeos de perros.

El problema de identificar géneros se hace más frecuente debido al almacenamiento no adecuado de las cepas. Es preciso recordar que se aprovechó las condiciones de manejo de las 21 cepas para explorar el efecto de la temperatura en la conservación. Las cepas trabajadas, se ubicaron taxonómicamente en el género *Bordetella*, en primo aislamiento, mismas que se encuentra criopreservadas a -85°C. Las condiciones de estrés a las que fueron sometidas durante 4 años pudieron derivar en mutaciones, lo cual dificulta su identificación por pruebas bioquímicas.

Conclusiones

Se presentó un 66% de cepas no recuperadas, 7 sobrevivieron (ENP5a, N119B, 39003, 106b, ENT83, ENT2B y 78B1). Los cambios en las características metabólicas y morfología colonial fueron evidentes en las 7 cepas que se sometieron al escrutinio de fenotipificación. Todas fueron cocobacilos Gram negativos. El efecto de la temperatura y tiempo fueron factores críticos en la viabilidad y características fenotípicas de las cepas trabajadas.

Para complementar el trabajo, es necesario realizar más pruebas bioquímicas y genéticas para establecer el género y especie, y determinar acuciosamente el efecto de la temperatura en las cepas.

Referencias

- Badhai, J., Das S. (2021) Genomic plasticity and antibody response of *Bordetella bronchiseptica* strain HT200, a natural variant from a thermal spring. *FEMS Microbiol Lett.* 2021 Apr 22;368(6): fnab035. doi: 10.1093/femsle/fnab035. PMID: 33856450. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33856450/>
- Betancor, L., Gadea, M. y Flores, K. (2006). Genética bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Uruguay: Instituto de higiene, departamento de bacteriología y virología. 59-80pp. Recuperado de: <http://cmap.unavarra.es/rid=1NQMW86S-1N93KN5-R6/GeneticaBacteriana.pdf>
- Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D., Alon, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst Biol*, 7, 27. Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-27>
- Brickman, T. & Armstrong, S. (2018). The *Bordetella bronchiseptica* nic locus encodes a nicotinic acid degradation pathway and the 6-hydroxynicotinate-responsive regulator BpsR. *Molecular Microbiology*. 108(4), 397-409. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.13943>
- Bridel S, Bouchez V, Brancotte B, Hauck S, Armatys N, Landier A, Mühle E, Guillot S, Toubiana J, Maiden MCJ, Jolley KA, Brisse S. (2022). A comprehensive resource for *Bordetella* genomic epidemiology and biodiversity studies. *Nat Commun.* 2022 Jul 1;13(1):3807. doi: 10.1038/s41467-022-31517-8. PMID: 35778384; PMCID: PMC9249784. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35778384/>
- Caycedo, L, Ramírez, L., Constanza, L., Marcela, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49- 94. Recuperado de: <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Curran M, Boothe DM, Hathcock TL, Lee-Fowler T. (2020). Analysis of the effects of storage temperature and contamination on aerobic bacterial culture results of bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Intern Med.*, 34(1),160-165. doi: 10.1111/jvim.15686. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31860163/>
- Chen, Y., Yang, L., Erchao, S., Song, J., Wu, B. (2019). Characterisation of a newly detected bacteriophage infecting *Bordetella bronchiseptica* in swine. 164: 33-40. *Archives of Virology*. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-018-4034-0>
- Fei Wang, Chan Yu, Hui Li, Sae Jung Chang, Ruth E. Blake. (2020). Effect of microbial growth rate on temperature and metabolic water recorded in 180/160 ratios of PO4 in DNA, *Chemical Geology*, 533: 119439. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009254119305686>
- Fingermann, M. (2011). Caracterización molecular y funcional de la respuesta de la acidez en *Bordetella bronchiseptica*: Posible rol en la infección persistente. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Recuperado de: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2743/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Galán, J., Baquero, M., Morosini, M., Baquero, F. (2006). Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *Asociación Colombiana de Infectología*, 10 (1), 22-29. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922006000100004&lng=en&tlng=es.
- Gutiérrez, J., Luna, L., Mendoza, M., Díaz, G., Burguete, J., Feliciano, M. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562015000200007&lng=es&tlng=es
- Jofré M., Leonor, Perret P., Cecilia, Abarca V., Katia, Solari G., Verónica, Olivares C., Roberto, & López Del P., Javier. (2006). Recomendaciones para el manejo de mordeduras ocasionadas por animales. *Revista chilena de infectología*, 23(1), 20-34. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.4067/S071610182006000100002>

- Mansilla M. C., Cybulski L. E., Albanesi D., and de Mendoza D. (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* 186: 6681–6688. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC522199/>
- Molina, M., Marín, A., Rodríguez, M. (2019). Análisis fenotípico de *Pseudomonas fluorescens* crio preservada en diésel: aislada de humano. Universidad Nacional Autónoma de México, Colección de Cultivos Bacterianos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Disponible en: <http://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/7789>
- Orruño, M., Kaberdin, V., Arana, I. (2016). Respuesta bacteriana al estrés. SEM@FORO. Facultad de medicina. Universidad de Oviedo. Dpto. Biología Funcional-Microbiología. Disponible en: https://www.semiconbiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/11_RespBactEstres.pdf
- Oscars, Y., Castro, J. (2020). Preservación de microorganismos por congelación. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA. Ministerio de Agricultura. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67167/NR42413.pdf?sequence=1>
- Passerini, B., Friedman, L., Darnaud, S., Torres, R., Franco, M. (1995). Caracterización de Cepas Virulentas de *Bordetella pertussis* y *Bordetella bronchiseptica* aplicables a la Producción de Vacunas. 14 (4), 257-71. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/14/4/LAJOP_14_4_1_5_3HD9191711.pdf
- Pérez, D. & Sosa, A. (2010). Evaluación de la tolerancia a la crioconservación de dos cepas de *Escherichia coli* K12 de uso frecuente en biotecnología. 72(2), 15-18 *Asociación Bioquímica Argentina*. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2010000200003&lng=es&tlng=es
- Porter, J., Parton, R., Wardlaw, A. (1991). Growth and Survival of *Bordetella bronchiseptica* in Natural Waters and in Buffered Saline without Added Nutrients. *American Society for Microbiology*. 59(4), 1202-1206. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182868/pdf/aem00057-0320.pdf>
- Sánchez, L. & Corrales, L. (2005) Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Bogotá, Colombia*. 3(3): 109-113 Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/411/41130312.pdf>
- Seydlova, G., Belanova, J., Bibova, I., Dienstbier, A., Drzmisek, J., Masin, J., Fiser, R., Konopasek, I., Vecerek, B. (2017). The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *Journal of Biological Chemistry*. 292(19): 8048–8058. Recuperado de: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)41898-8/fulltext#seccestitle90](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)41898-8/fulltext#seccestitle90)
- Sisti, F. (2004). El lipopolisacárido de *Bordetella bronchiseptica* como componente esencial en la colonización y persistencia de este patógeno en el hospedador. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2254>
- Staveley, C. M., Register, K. B., Miller, M. A., Brockmeier, S. L., Jessup, D. A., & Jang, S. (2003). Molecular and antigenic characterization of *Bordetella bronchiseptica* isolated from a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*) with severe suppurative bronchopneumonia. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 15(6): 570-574. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14667021/>
- Stübs, D., Fuchs, T., Schneider, B., Bosserhoff, A., Gross, R. (2005). Identification and regulation of cold-inducible factors of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology Society*. 151(6): 1895–1909. DOI 10.1099/mic.0.27785-0. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15941997/>
- Suárez, A., Ruiz, P., Sánchez A. 2018. Infección de herida por mordedura de gato. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 36(3): 194-195. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X16303184?via%3Dihub>
- Van Teeselin, M.C.F., de Pedro M.A. (2017). Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities from antimicrobial targeting. *Front Microbiol*, 8(12):1-18. doi: 10.3389/fmicb.2017.01264. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28740487/>
- Valladares, B., Ortega, C., Velasquez, V., Zamora, J., Peñuelas, C., Castro, J., Talavera, M., Alonso, M., Zaragoza, A. (2011). *Bordetella bronchiseptica* como un riesgo importante de salud pública. Estudio clínico patológico en conejos REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 12(10): 1-12, Veterinaria Organización Málaga, España Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63621921007.pdf>