



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DETECCIÓN DE *Chlamydophila spp* EN REBAÑOS
CAPRINOS DEL ESTADO DE MICHOACÁN
MEDIANTE TÉCNICA INMUNODIAGNÓSTICA
ELISA Y AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

CNIDIA LAZCANO ARREVILLAGA

ASESORES: DRA. CRISTINA ESCALANTE OCHOA

DR. ANDRÉS DUCÖING WATTY



México D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Dios que me dio la fuerza de terminar este trabajo, y a mi abuelita que me cuida desde el cielo.

DEDICATORIAS

A mis padres, por su amor, confianza y apoyo en la realización de mis estudios.

A mis hermanas Paola, Mayela y Diana, por la complicidad y el amor que nos mantiene unidas.

A toda mi familia por todo su apoyo.

A Alfredo por su amistad incondicional, eres como un hermano para mí.

A mis amigos: Sergio, Carolina, Vero y Dinorah.

A Cristina por que más que mi asesora eres una gran amiga, y un ejemplo de aprendizaje.

A la Familia Chanona. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, y la FMVZ por permitirme ser parte de esta valiosa institución.

A mis maestros, a lo largo de toda la licenciatura.

A mi jurado, por todo su apoyo

Al Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, y a todas las personas que forman parte de él y que en el camino me encontré, gracias.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero otorgado por el CONACYT a través del proyecto 40504-Z, con número de becario 8586.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Generalidades de <i>Chlamydomphila spp.</i>	2
1.2. Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes (AEPR).....	4
1.2.1 Antecedentes	4
1.2.2 Patogenia del AEPR.....	6
1.2.3 Signos clínicos y cambios patológicos.....	7
1.2.4 Epizootiología.....	8
1.3 Queratoconjuntivitis.....	9
1.4 Diagnóstico de <i>Chlamydomphila spp.</i>	9
1.5 Objetivo general.....	12
1.5.1 Objetivos Específicos.....	12
1.6 Hipótesis.....	12
1.7 Justificación.....	12
2.- Material y Métodos.....	14
2.1 Diseño y Análisis Estadístico.....	21
3.- Resultados.....	22
4. Discusión.....	44

5. Conclusión.....	47
6. Referencias.....	48
Anexo 1.....	53

RESUMEN

LAZCANO ARREVILLAGA CNIDIA. Detección de *Chlamydophila spp.* en rebaños caprinos del estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica de ELISA y aislamiento bacteriológico. (Bajo la dirección de MVZ.PhD Escalante Ochoa Cristina, y MVZ.PhD Ducöing Watty Andrés Ernesto)

Chlamydophila (C.) spp es una bacteria intracelular causante de enfermedades como el Aborto Enzótico en Pequeños Rumiantes (AEPR) (*C. abortus*), y queratonconjuntivitis (*C. pecorum*), entre otras. En nuestro país el AEPR está considerado como una enfermedad exótica, a pesar de que desde hace más de dos décadas existe la importación de pequeños rumiantes provenientes de países donde el AEPR es enzoótico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de *Chlamydophila spp.* en rebaños caprinos de los Grupo Ganadero de Validación y Transferencia de Tecnología (GGAVATT) "Caprinocultores de Ecuandureo SPR de RL" y "Caprinocultores de La Piedad SPR de RL" del municipio de Ecuandureo en el Estado de Michoacán. Se muestrearon 12 hatos caprinos de ambos GGAVATTs, 4 de la Piedad y 8 de Ecuandureo, con un total de 209 animales. Se realizó el diagnóstico serológico de *C. abortus* en todos los animales mediante prueba de ELISA, y el aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de 200 muestras fecales utilizando cultivo celular e inmunofluorescencia. Se encontró un 20.11% de serorreactores positivos a *C. abortus* y un 84.5% de aislamientos de *Chlamydophila spp.* Así mismo se aisló a *Chlamydophila spp* a partir de fetos abortados y cabritos muertos. Estos resultados demuestran el contacto entre *Chlamydophila spp* y caprinos en México, y su participación en procesos de aborto, así como la presencia de infecciones subclínicas mixtas de *C. abortus* y *C. pecorum* Es necesario profundizar en estos estudios para poder determinar con precisión el impacto que *Chlamydophila spp* tiene en pequeños rumiantes.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades de *Chlamydophila spp*

Chlamydophila spp pertenece al orden de los *Chlamydiales*, familia *Chlamydiaceae*. Comprende 6 especies: *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*, y *C. caviae*. Previo a 1999, las últimas 4 especies eran consideradas diferentes cepas de *Chlamydia psittaci* ⁽¹⁾.

El género *Chlamydophila spp* comprende bacterias intracelulares obligadas, que presentan un ciclo único de desarrollo que involucra una fase extracelular infectante, el cuerpo elemental (CE), y una fase intracelular multiplicativa, el cuerpo reticular (CR) ⁽²⁾. El CE es estable en el medio ambiente, lo que le permite permanecer viable en agua o alimento hasta por 7 días. El CR es osmóticamente frágil, por lo que no es estable en el medio ambiente. *Chlamydophila spp* es considerada un parásito energético, ya que depende del ATP de la célula huésped para poder replicarse ^(3, 4, 5).

Las fases del ciclo de desarrollo son:

- Adhesión e internalización a la célula huésped susceptible.- El CE se adhiere a la membrana de la célula huésped, induciendo su propia internalización en una vacuola que no se fusiona con los lisosomas.
- Conversión de CE a CR.- Dentro de la vacuola el CE se convierte en CR, observándose entre otros cambios que la pared del CE, de ser rígida y con muchas capas, cambia a una pared celular más delgada.
- Multiplicación del CR. Se lleva a cabo por fisión binaria, ocasionando un crecimiento exponencial que varía en tiempo de acuerdo a la especie que se esté replicando.
- Reorganización de CR a CE. Después de un cierto tiempo variable de multiplicación bacteriana, ocurre una reorganización de CR a CE.
- Liberación de la nueva progenie.- Ocurre por la lisis de la célula, permitiendo la liberación de cuerpos elementales infecciosos aptos para infectar otras células o animales susceptibles ^(5, 6).

Chlamydophila spp puede provocar abortos, infertilidad, enteritis, encefalomiелitis, poliartritis, conjuntivitis y enfermedades respiratorias en diversas especies animales como rumiantes, aves, felinos, koalas, ratones y llamas ^(1,3,7) pudiendo ser transmitida al hombre ⁽⁸⁾. Particularmente, las especies de este género asociadas a procesos infecciosos en los ovinos y caprinos son *Chlamydophila pecorum* y *Chlamydophila abortus*. Estos procesos se pueden clasificar en 3 estadios:

- Infecciones subclínicas inaparentes, generalmente en intestino,
- Infecciones localizadas en epitelios de superficies mucosas, mismas que son la principal puerta de entrada hacia procesos sistémicos como: enteritis, conjuntivitis, mastitis e infecciones genitales como epididimitis y orquitis. Y finalmente,
- Infecciones sistémicas que desencadenan abortos, neumonías, poliartritis y encefalomiелitis ⁽⁴⁾.

Chlamydophila abortus es la especie que en rumiantes ocasiona abortos. *Chlamydophila pecorum*, por otra parte, se encuentra asociada a abortos, conjuntivitis, encefalomiелitis, enteritis, neumonías y poliartritis en rumiantes ⁽¹⁾. En ovinos y caprinos, la infección generalmente se vincula a problemas de queratoconjuntivitis, infecciones intestinales subclínicas y ocasionalmente a abortos ⁽⁴⁾. Previo a 1993, cuando se propone y acepta la especie *Chlamydia pecorum* ⁽⁹⁾, (hoy reconocida como *Chlamydophila pecorum* ⁽¹⁾), las infecciones se atribuían a *Chlamydia psittaci* serotipo 2 ⁽⁹⁾, habiendo reportes de las afecciones que ocasiona desde 1953 ^(4,7).

A continuación, se describirán someramente los aspectos relacionados a los procesos infecciosos en caprinos con principal énfasis en la patología del aborto por la enfermedad AEPR, y en menor grado queratoconjuntivitis, por el impacto económico que representan.

1.2 Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes (AEPR).

1.2.1 Antecedentes

Esta enfermedad fue descrita por primera ocasión en 1936 por Greig, quien la nombró Aborto Enzootico Ovino (AEO) por ser en esta especie animal donde ocurrieron los abortos. Greig creyó que la enfermedad sucedía a causa de factores ambientales y deficiencias en la dieta principalmente, siendo Stamp, en 1950, quien demostró que ocurría por el agente infeccioso que causaba el linfgranuloma venéreo psitacoso ⁽¹⁰⁾.

En 1971, Storz reconoce al agente etiológico del AEO como *Chlamydia psittaci* serotipo 1 (hoy *Chlamydophila abortus*). A partir de 1977, se reconoció en EUA como un proceso infeccioso que también afectaba a las cabras, denominándosele Aborto Enzoótico en Pequeños Rumiantes (AEPR) ⁽¹¹⁾. En 1983, Appleyard *et al* describen un brote en Edimburgo, donde se indican particularidades del proceso infeccioso en los caprinos que lo diferencian en algunos aspectos con el proceso en ovinos ⁽¹²⁾. Entre 1978 y 1992, en Canadá, Papp *et al* publican que este microorganismo era el responsable del 46.8% de todos los abortos estudiados en ese período en ese país ⁽¹³⁾. En 1989, se estimó que el AEPR afectaba al 8.6% de los rebaños del Reino Unido, dañando a 1.5 millones de pequeños rumiantes anualmente, y ocasionando pérdidas de 20 millones de libras anuales ⁽¹⁴⁾. Liao *et al*, en 1993 elaboraron el primer reporte en Taiwán de casos de aborto en diferentes rebaños caprinos, donde lograron aislar de tejido placentar a *Chlamydia psittaci* serotipo 1. Hacia 1997, la incidencia de los abortos en este país había aumentado de un 10 a un 87% debido a *Chlamydophila abortus* ⁽¹⁵⁾. En Estados Unidos de América, en un estudio efectuado en la Universidad de California se encontró a *Chlamydophila abortus* como el principal causante del 23% de los 217 abortos remitidos a la universidad entre 1991-1998 ⁽¹⁶⁾. Para 1999, *C. abortus* se reconoce como una de las principales causas de pérdidas de rebaños ovinos y caprinos en Bulgaria, España, EUA, Francia, India, Japón, Reino Unido, Grecia y Túnez ⁽¹⁷⁾. En 2002, se reporta en Suiza a *C. abortus* como responsable del incremento en abortos de ovinos y caprinos entre 1996 y 1998, así como de ocasionar el 50% de los abortos caprinos ocurridos durante la temporada de partos en los años 2000 y 2001 ⁽¹⁸⁾.

Durante las décadas de los 80's y 90's, diferentes autores ^(8,19,20) elaboraron reportes referentes a *Chlamydomphila spp* en los cuales se resaltaba la importancia de *Chlamydomphila abortus* como riesgo zoonótico. Para 1997, en el Reino Unido, ya se habían reportado 11 casos de mujeres gestantes que después de tener contacto con cabras y ovejas gestantes infectadas con esta bacteria, abortaron espontáneamente ⁽²⁰⁾. En ese mismo año, en Estados Unidos se reportó un caso de una mujer embarazada que abortó como resultado de haber estado en contacto con rebaños de ovinos y caprinos infectados con este microorganismo⁽¹⁹⁾. En 2002, Pospichil *et al* reportaron que mujeres embarazadas en contacto con cabras que habían abortado debido a *C. abortus* desarrollaron infecciones generalizadas y abortos ⁽²¹⁾.

En México, durante la década de los 90's, diversos estudios evidencian la presencia de *Chlamydomphila spp* en procesos infecciosos en ovinos del altiplano⁽²²⁾, y en aves de ornato ⁽²³⁾. En 1997, Escalante *et al.* presentaron el primer reporte de aislamiento de *C. psittaci* (hoy *C. abortus*) en abortos caprinos de animales sometidos a procesos experimentales no relacionados con *Chlamydomphila spp.* ⁽²⁴⁾. En el 2001, se demuestra la participación de *Chlamydomphila spp* en un proceso zoonótico en nuestro país a partir de ganado caprino infectado con este agente ⁽²⁵⁾.

1.2.2 Patogenia del AEPR.

Los animales susceptibles a *C. abortus* se infectan ingiriendo o inhalando la bacteria, que se encuentra contenida en descargas vaginales, membranas placentarias de cabras que hayan abortado, o por ingestión de agua o alimento contaminado ^(13,26). En 1985, Appleyard *et al* estudiaron la transmisión venérea de *C. abortus*, encontrándolo asociado únicamente a un déficit en la calidad del semen en machos ⁽²⁷⁾.

Una vez dentro del animal, el microorganismo se puede alojar en tonsilas y epitelio intestinal, generalmente causando una infección subclínica ^(28,29). Cuando hay un cambio en el sistema inmunológico, el microorganismo se disemina a partir de estos órganos por sangre o linfa para

alcanzar órganos de colonización secundaria como hígado, bazo y pulmón, donde el procarionte permanecerá en estado latente ⁽¹³⁾.

Los cambios fisiológicos derivados de la gestación inducen una segunda clamidemia, y a partir de los órganos de colonización secundaria el microorganismo llega a células endometriales, infectando toda esta pared entre los días 40 y 50 de gestación. Entre los días 60 y 90 de gestación *C. abortus* infecta al feto a través de los placentomas, provocándose el aborto entre el día 125-140 de gestación ^(3,4,30,31).

Alternativamente, las hembras pueden parir cabritos prematuros muy débiles cuyo promedio de vida generalmente no va más allá de los 11 a 14 días ⁽³²⁾. Los cabritos nacidos de cabras infectadas, y aquéllos amamantados por cabras que han abortado o parido cabritos muertos, es muy probable que estén infectados aunque no presenten sintomatología ⁽¹⁰⁾.

1.2.3 Signos clínicos y cambios patológicos.

Previo al aborto o el parto de cabritos débiles, no hay signos clínicos que evidencien el proceso infeccioso por el que está cursando la hembra, salvo un aumento en la temperatura corporal 38 a 40° C ⁽²⁰⁾. Una vez que sucede el parto, las membranas placentarias aparecen engrosadas y con una coloración entre amarillenta y rojiza. De igual forma pueden presentar retención placentaria, metritis y vaginitis. En algunos casos, la hembra puede tener pérdida de la condición corporal pudiendo llegar a morir. Sólo en algunos casos, hay espasmos de tos y queratoconjuntivitis ^(4,10,20,30,31).

Una vez que el aborto ha tenido lugar, se observa dentro de los 14 días siguientes que las hembras tienen descargas vaginales de color amarillento café un poco sanguinolentas, las cuales contienen importantes cantidades del microorganismo; posteriormente, las hembras se recuperan. En los fetos de cabritos abortados las membranas fetales pueden presentar necrosis, y a pesar de que el feto se observa bien desarrollado, en algunos casos pueden presentar edema en cavidad abdominal, y hematomas en esta región ⁽²⁰⁾. El hígado de los cabritos se puede observar

congestionado con puntos grises de necrosis focal; en algunos casos, ésto se ha descrito como un signo patognomónico del proceso abortivo ocasionado por *C. abortus*, cabe mencionar que *C. pecorum* se ha reportado como poco patógena para la placenta a pesar de poder llegar a ocasionar abortos ^(4,17,33), y en los abortos ocasionados por esta bacteria, se pueden llegar a encontrar petequias en mucosa oral, conjuntiva, timo y nódulos linfáticos. ^(30,32).

1.2.4 Epizootiología

En hatos donde el microorganismo se encuentra infectando por primera vez, el porcentaje de abortos puede variar desde un 30% hasta un 90%. Después de este brote explosivo, el porcentaje de abortos debido a *C. abortus* en las siguientes temporadas de gestaciones oscilará entre un 10% a un 30% en cabras en producción. Así, durante los 2 ó 3 años subsecuentes a la primoinfección se aprecia un bajo porcentaje de cabras que abortan, tras los cuales, al cuarto o quinto año puede volver a manifestarse en el hato un porcentaje muy elevado de abortos ^(4,10). Diversos estudios indican que si por 2 períodos consecutivos un mismo animal presenta aborto, la cabra debe de cursar con una infección crónica y probablemente nunca parirá un cabrito que viva más de dos semanas ^(4,20,30,34).

1.3 Queratoconjuntivitis

En los inicios de la década de los 80's se consideraba en Gran Bretaña a *Mycoplasma conjunctivae* como el agente primario de la conjuntivitis. Sin embargo, en un brote en 1983 el único agente aislado fue *Chlamydia pecorum*, estableciéndose como el segundo agente etiológico de este problema ⁽³⁵⁾, reportándose que esta bacteria ingresa al rebaño por introducción de animales portadores, generalmente asintomáticos. La morbilidad de esta infección puede llegar hasta un 90%. ⁽²⁰⁾.

Los signos clínicos que acompañan a esta enfermedad son hiperemia de la conjuntiva y esclerótica (conjuntivitis), secreción lagrimal de color hialino a amarillento, hiperplasia linfocelular en la conjuntiva y en la membrana nictitante, queratitis. Si la enfermedad progresa se desarrollan folículos hiperplásicos en los linfonódulos, generalizándose la inflamación por toda la esclerótica llegando hasta la córnea, donde el exudado comienza a ser purulento, desarrollándose por último y en raras ocasiones úlceras. La enfermedad es más común en caprinos adultos que en los jóvenes ⁽³⁾.

1.4 Diagnóstico de *Chlamydia spp.*

La detección de infecciones causadas por *Chlamydia spp* puede efectuarse mediante el aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas adecuadas contenidas en descargas vaginales, sangre, heces o tejidos obtenidos a la necropsia entre otras, así como por pruebas serológicas e inclusive técnicas moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Un diagnóstico presuntivo se puede elaborar con base en los signos clínicos y el reconocimiento de los cuerpos elementales o inclusiones citoplasmáticas con tinciones como Giemsa, Jiménez y Machiavello, aunque éstas tienen la desventaja de ser poco específicas, por lo que deben de realizarse junto con algún otro tipo de prueba diagnóstica definitiva para evitar errores en la interpretación ^(4,20,30).

Las pruebas serológicas en las cuales se ha basado principalmente el diagnóstico de *Chlamydiae* son la técnica de Fijación del Complemento, Inmunoelectrotransferencia, Ensayo Inmunoabsorbente de Unión de Enzimas (ELISA), e Inmunofluorescencia.

La técnica de Fijación del Complemento ha sido ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos clamidiales contra antígenos específicos de género como el lipopolisacárido (LPS). Para asegurar el diagnóstico por medio de esta prueba es necesario trabajar con sueros pareados, tomando una muestra de sangre 15 días antes de la fecha aproximada del parto, y otra 15 días después de ocurrido éste, o bien, del aborto ^(13,20,30).

Inmunoelectrotransferencia.- Esta técnica permite el reconocimiento de antígenos protéicos de género y especie de las diferentes especies de *Chlamydophila* spp. Algunos autores la utilizan tras una prueba positiva de Fijación del Complemento para la identificación del procariote a nivel de especie ^(3,4,17,20).

A continuación se comentarán brevemente las técnicas utilizadas en este trabajo.

ELISA.- Se basa en la detección de antígenos o anticuerpos inmovilizados sobre una matriz plástica (microplacas de poliestireno de 96 pozos). Debido al desarrollo de este tipo de pruebas, el diagnóstico de *Chlamydiae* se puede realizar por medio de pruebas comerciales. La prueba se basa en una reacción inmunoenzimática que se puede evidenciar mediante un espectrofotómetro. Esta técnica permite el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo. En 1994, se estandarizó una prueba de ELISA, basada en un epítoto altamente inmunogénico específico de *Chlamydomphila abortus*, localizado en una región de una proteína de 80 a 90 kDa que no presenta reacción cruzada con *C. pecorum*, lo cual ha significado un importante avance en el diagnóstico del agente causal de los procesos abortivos ^(36,37).

Inmunofluorescencia.- Permite la identificación tanto de anticuerpos contra *Chlamydomphila spp* (prueba indirecta), como de las bacterias mismas (prueba directa) a través de la detección de las inclusiones citoplasmáticas características de estos microorganismos. La prueba más utilizada para el análisis de muestras clínicas ha sido la directa ^(4,17,20).

Aislamiento de *Chlamydomphila spp*.- Se debe aislar mediante el uso de medios biológicos, tales como embrión de pollo, o en líneas celulares como L929, McCoy, HeLa; baby hamster o células Vero. Los tejidos celulares generalmente crecen en botellas de poliestireno, vidrio o poliuretano, que contienen cubiertas que ayudan al crecimiento y fijación de los monoestratos ^(3,4,17).

1.5 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la presencia de *Chlamydophila spp.* en rebaños caprinos de los Grupos Ganaderos de Validación y Transferencia de Tecnología (GGAVATTs) “Caprinocultores de Ecuandureo SPR de RL” y “Caprinocultores de La Piedad SPR de RL” en el municipio de Ecuandureo en el Estado de Michoacán.

1.5.1 Objetivos Específicos.

1. Realizar aislamiento de *Chlamydophila spp.* a partir de muestras clínicas de rebaños caprinos de los GGAVATTs “Caprinocultores de Ecuandureo SPR de RL” y “Caprinocultores de La Piedad SPR de RL” en el municipio de Ecuandureo, en el Estado de Michoacán.
2. Estimar la prevalencia de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* en sueros de los animales previamente mencionados mediante pruebas de ELISA y establecer, en su caso, la correlación correspondiente hacia los hallazgos de aislamiento bacteriano.

1.6 HIPÓTESIS.

Chlamydophila spp se encuentra presente en rebaños caprinos del municipio de Ecuandureo del Estado de Michoacán.

1.7 JUSTIFICACIÓN.

En México se tienen reportes sobre la existencia de *Chlamydophila spp* en cabras bajo condiciones experimentales ajenas a esta bacteria. El aborto enzootico en

cabras está considerado oficialmente como una enfermedad exótica para México, a pesar de existir reportes que evidencian la presencia de estas bacterias en ovinos y caprinos ^(22,24,25). De acuerdo a la información obtenida de algunos productores, en el transcurso de la última década ha existido la importación de cabras de lugares donde el microorganismo es endémico, por lo cual es altamente probable que varios de ellos hayan adquirido animales portadores asintomáticos de *Chlamydophila spp.* Estos animales han sido movilizados por varios estados de la República Mexicana, incluyendo el municipio de Ecuandureo en el estado de Michoacán.

A finales del 2003 y principios del 2004, varios caprinocultores de dicho municipio agrupados en GGAVATTs, detectaron un aumento importante de abortos con características sugerentes de clamidiosis. Entre estas características se encontraban abortos en el tercer tercio de gestación, ausencia de signos clínicos en las hembras que abortaban, así como coloración inusual en membranas placentarias al momento de ocurrido el aborto, concordantes con una infección por *Chlamydophila spp.* Por lo tanto, es de gran importancia realizar pruebas diagnósticas que permitan evaluar certeramente la presencia de *Chlamydophila spp* con su posible participación en procesos infecciosos de cabras en el municipio de Ecuandureo, Michoacán.

2. MATERIAL y MÉTODOS.

Población animal a muestrear:

Se muestrearon un total de 209 cabras de 12 rebaños pertenecientes a los GGAVATTs “Caprinocultores de Ecuandureo SPR de RL”, (8 granjas), y “Caprinocultores La Piedad”, (4 granjas) (**Cuadro 1**). Las cabras muestreadas pertenecen a diferentes categorías y etapas productivas: cabras primaras de entre 7 meses a 1.5 años, cabras adultas mayores a 1.5 años, cabras gestantes y no gestantes; cabras entre 3 y 7 meses de edad, y cabritos de hasta 3 meses.

Cuadro 1. Granjas caprinas en GGAVATTs del estado de Michoacán del municipio de Ecuandureo en México, para análisis de *Chlamydophila spp.*

GGAVATT	COMUNIDAD	No. GRANJA	TOTAL ANIMALES
La Piedad	La Esperanza	1	150
		2	350
	Ojo de Agua	3	45
	La Campana	4	27
Ecuandureo	La Barranca	5	168
		6	121
		7	109
		8	263
		9	67
	Las Fuentes	10	365
		11	131
		12	100

Obtención de datos y registros

La obtención de los datos generales referentes de la estructura de las granjas agrupadas en GGAVATTs se realizó mediante la aplicación de dos cuestionarios a los productores o encargados de las granjas pertenecientes a estos grupos **(anexo 1)**.

El primer cuestionario se enfocó hacia los aspectos zootécnicos generales de la granja sobre: genética, reproducción, alimentación, manejo, instalaciones y sanidad.

El segundo cuestionario se enfocó a datos particulares de cada animal muestreado con la finalidad de destacar los problemas de aborto posiblemente relacionados con *Chlamydophila spp* e identificar las probables variables asociadas a éstos. Los datos son: número de identificación, edad, número de gestaciones a término, antigüedad en la granja, abortos previos (número, fecha, tratamientos administrados).

Para el análisis de los datos se clasificó a los animales con base en: a) edad y antigüedad en la granja y b) etapa productiva al momento del muestreo.

- Edad y antigüedad en la granja, es decir, si habían pertenecido a la explotación desde su nacimiento o durante más de una temporada de partos al momento del muestreo.

Categoría	Clave	Característica.
Adulto	A	Hembra mayor a 1.5 años, perteneciente a la granja por más de una gestación.
Adulto Nuevo	AN	Hembra mayor a 1.5 años, ingresada a la granja durante el último año. Se desconocen sus antecedentes abortivos.
Desarrollo	D	Hembra entre 3 y 7 meses de edad, nacidos en la granja, la madre se encuentra clasificada como adulto.
Primalas	P	Hembra menor a 1.5 años que ha tenido un solo parto, o está próxima a parir por primera vez.

- La etapa productiva al momento del muestreo.

Categoría	Clave	Característica
Cabrito	C	Animal de 0 a 3 meses de edad.
Desarrollo	D	Hembra de 3 a 7 meses de edad.
Gestante	G	Hembra gestante, mayor a 7 meses de edad
Vacía	V	Hembra no gestante, mayor a 7 meses de edad.

Muestras clínicas para la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus*

a) Suero:

Se tomaron 10 ml de sangre de la vena yugular en condiciones asépticas, por medio de tubos Monovette[®] y agujas S-Monovette[®] de 0.8X25mm estériles. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a 4° C por 5 minutos para la separación de los

componentes sanguíneos y del suero, mismos que fueron transferidos en volúmenes de 1 ml a tubos eppendorf estériles y mantenidos a -20° C hasta su utilización.

Muestras para el aislamiento e identificación de *Chlamydophila spp.*

a) *Heces.* Se tomó aproximadamente 1 g de heces directamente del recto de los animales colocándose en recipientes estériles con solución sucrosa fosfato glutamina (SPG) [suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina, 50 µg/ml gentamicina)]. Las muestras se transportaron a 4° C al laboratorio y se mantuvieron a -70° C hasta su procesamiento.

b) *Órganos.* Al encontrarse durante el muestreo fetos abortados en el último tercio de gestación o cabritos muertos en el transcurso de los primeros 15 días de edad, que no tuvieran más de 24 horas de ocurrido el deceso, se procedió a coleccionar muestras para su estudio. Se obtuvo el hígado de 3 cabritos y las carúnculas de una hembra durante la necropsia; así como muestras entregadas por los productores que consistían en 3 hígados, 2 de cabritos muertos en los primeros días de vida y un hígado de un aborto ocurrido en diciembre del 2004, mismas que se encontraban en SPG a -20° C. Las muestras se transportaron al laboratorio en recipientes estériles con SPG a 4° C. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron a -70°C hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

a) *Heces.* Se mezcló y maceró 1 g de heces con 9 ml de SPG, se centrifugó a 3000 x g por 30 minutos a 4° C y posteriormente se decantó el sobrenadante,

agregándosele SPG (relación 50:50) y se centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas, repitiendo este proceso dos veces más. Se transfirieron 5 ml de sobrenadante a viales estériles y se mantuvieron a -70° C hasta su utilización.

b) *Órganos*. El hígado y las carúnculas muestreadas se maceraron con SPG. Posteriormente, cada uno se centrifugó a 800 x g por 20 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se le agregó SPG (relación 50:50), repitiendo el proceso de centrifugación 2 veces más. 5 ml de sobrenadante final se transfirieron a viales estériles a -70° C hasta su utilización.

Detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* por ELISA.

Se utilizó la prueba comercial SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF *Chlamydophila abortus* BY ELISA METHOD INSTITUT POURQUIER®, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Esta prueba se basa en la detección de una proteína específica de 80-90 kDa del LPS de *Chlamydophila abortus*, la cual está adsorbida en los 96 pozos de poliestireno de las microplacas que utiliza esta prueba comercial.

Aislamiento e identificación de *Chlamydophila spp* en cultivo celular.

Se propagaron monoestratos celulares de fibroblastos de ratón de la línea L-929 en botellas de poliestireno de 25 cm³ y 75 cm³ (In vitro, S. A) con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM), suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) y antibióticos (gentamicina 50 µg/ml, estreptomycin – penicilina 100 µg/ml), L-glutamina 1%, aminoácidos no esenciales 1%, (MEM completo), en condiciones de 37° C y 5% CO₂, de acuerdo a Escalante *et al* ⁽²⁴⁾

Previo a la infección, se prepararon monoestratos celulares en microplacas de poliestireno de 96 pozos, tanto conteniendo cubreobjetos de vidrio de 5 mm de diámetro para la posterior identificación de *Chlamydophila spp*, como sin cubreobjetos con la finalidad de hacer pases ciegos en caso de ser necesario. La concentración en la que se sembraron las microplacas fue de 0.12×10^5 células/150 µl/pozo, hasta obtener 70-80% de confluencia celular.

El proceso de infección se realizó de la siguiente forma:

Una vez obtenida la confluencia celular deseada en las microplacas, se retiró el MEM completo y se hicieron 2 lavados de 1 minuto con 100 µl/PBS(pH 7.4). /pozo Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 20 µl de los inóculos previamente preparados. Cada inóculo se utilizó sin diluir, y en diluciones de 1:10 y 1:100. Las microplacas se incubaron en una incubadora orbital (MRC®) durante 1 hora a 37°C, a 50 rpm en atmósfera húmeda. Posterior a ese tiempo se adicionaron 130 µl/pozo de MEM completo. Las microplacas se incubaron, a 37°C con 5% de CO₂ durante 72 horas.

Al finalizar la incubación, las microplacas que no contenían cubreobjetos se llevaron directamente a -70° C. En las microplacas con cubreobjetos, el medio de los cultivos celulares se retiró de las microplacas con cubreobjetos y los monoestratos celulares se lavaron 2 veces con PBS estéril, cada lavado con una duración de 3 minutos, siendo inmediatamente fijadas con metanol absoluto frío por 10 min. Posteriormente, se retiró el metanol y los monoestratos celulares fueron lavados 3 veces en la misma forma previamente mencionada. Finalmente,

los monoestratos se dejaron secar al aire y las microplacas selladas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su utilización ⁽²²⁾.

Para la identificación de las inclusiones citoplasmáticas producidas por *Chlamydophila spp* se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa con la prueba comercial IMAGEN *Chlamydophila* (Novo Nordisk Diagnostics LTD®), de acuerdo a Vanrompay *et al* 1994 ⁽³⁸⁾, sobre los monoestratos infectados ya fijos. Los cubreobjetos ya preparados se montaron sobre portaobjetos limpios con medio de montar Vectashield®. La observación de las preparaciones se realizó utilizando microscopio de luz ultravioleta con objetivo de 40x.

La prueba utilizada, se basa en la detección del antígeno de género (LPS) mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos.

En el caso de no visualizar inclusiones citoplasmáticas en la primer lectura, se realizaron pases ciegos a partir de las microplacas sin cubreobjetos que se encontraban en -70° C. Esta microplacas se descongelaron y congelaron al menos 5 veces para lisar las células y liberar a *Chlamydophila spp*. Los procesos de infección de nuevas células y posterior identificación del microorganismo se efectuaron en la forma previamente descrita, utilizando como inóculo 30 µl/pozo del sobrenadane de los lisados mencionados. Una muestra se dió como negativa si tras la realización de 2 pases ciegos, no se detectaron inclusiones intracitoplasmáticas.

2.1 Diseño y análisis estadístico.

Se estimó la seroprevalencia de *Chlamydophila abortus* en los grupos de animales estudiados. La variable a medir en el diagnóstico serológico fue la frecuencia de individuos seropositivos. En el caso de aislamientos la variable a medir fue la frecuencia de la presencia del microorganismo.

Con la información obtenida se realizaron tablas de clasificación cruzada, con el programa JMP Versión 5.1 (SAST Institute Inc., 1989-2003) y se estimaron los totales de seropositivos a *Chlamydophila abortus* por rebaño, grupos de edad, edad y antigüedad en la granja, antecedentes de abortos en el período inmediato anterior, y abortos previos a este período. Así mismo, mediante la estadística Ji cuadrada y en su caso, Exacta de Fisher, se determinaron las relaciones entre las variables medidas ^(39,40).

3. RESULTADOS.

Resultados del cuestionario sobre aspectos zootécnicos de las granjas.

1) Razas.

En el GGAVATT La Piedad las razas que se manejan son Sannen (SN), Alpina Francesa (AF) y cruza de SN y AF. En el GGAVATT Ecuandureo las razas son SN, AF, y Toggenburg (T).

2) Manejo Reproductivo:

En ambos GGAVTTs se maneja empadre controlado durante la época reproductiva. Generalmente entre agosto y diciembre, teniendo un parto al año. No utilizan sincronizador alguno para las hembras. Las cabras paren en los corrales o en el campo. Los machos sólo se encuentran en la granja en las épocas de empadre, siendo las únicas ocasiones en que tienen contacto con hembras.

3) Alimentación:

En ambos GGAVATTs la alimentación se basa en un sistema mixto; ésto es, durante el día las cabras pastorean, mientras que al pernocte y ordeña, la alimentación está basada principalmente en granos.

En el GGAVATT La Piedad los granos con que alimentan a las cabras son maíz rolado, maíz molido, cánola, semilla de garbanzo, sorgo, alimento comercial

(rastrojo de maíz y soya), mientras que en el GGAVATT Ecuandureo los granos utilizados son sorgo, paja de maíz, garbanzo, milo, maíz molido, maíz rolado.

La vegetación que se encuentra en el campo son árboles de Huizache, (*Acacia farnesiana*), Guamúchil, (*Pithecellobium dulce*) y lo que los productores reportan como pasto verde.

4) Manejo:

Ambos GGAVATTs tienen un sistema de producción mixto, pastoreo durante el día y corrales para el pernocte, con excepción de una granja en Ecuandureo que tiene un sistema totalmente estabulado. La pradera es compartida, por lo que los rebaños llegan a tener contacto, principalmente en los lugares donde hay agua. En La Piedad se encontró que el 75% de las granjas muestreadas (granja 1, 2 y 4) no tienen separadas a las cabras por corrales; el otro 25% de las granjas (granja 3), separa las cabras en corrales. El parámetro en el que se basa para separarlas es por etapa productiva, considerando únicamente las que se encuentran en etapa de lactación y las que se encuentran secas, indistintamente de la edad de los animales. En Ecuandureo el 25% (granjas 8 y 12) de las granjas separa a sus animales en corrales de acuerdo al siguiente criterio: las que se encuentran en desarrollo (3 a 7 meses), hembras lactantes con sus cabritos y hembras adultas secas.

5) Instalaciones:

En La Piedad las granjas están separadas por mallas ciclónicas. No todos los animales se encuentran identificados por número de arete; esto sucede porque en

las granjas 1 y 2 no llevan registros de producción, sólo libretas de campo con las fechas de los nacimientos. En las granjas 3,4 y 5 si hay registros y la mayoría de los animales se encuentran aretados. Los machos no se encuentran en la granja, salvo en épocas de empadre. Durante el año 2004 se introdujeron animales de otros rebaños, de los cuales no tienen registros.

En Ecuandureo, los perímetros de las granjas se encuentran bien delimitados por mallas ciclónicas y bardas, por lo que los animales no tienen contacto con rebaños vecinos. Todos los animales cuentan con identificación y se llevan registros de cada uno de ellos. Los machos no se encuentran en la granja salvo en época de empadre. No se reporta introducción de animales nuevos a las granjas.

6) Sanidad:

Desde el 2004, en ambos GGAVATTS los productores reportan un aumento en el número de abortos. Todos los animales se encuentran vacunados contra *Brucella* y la bacterina triple, utilizada para prevenir: ántrax, edema maligno y septicemia hemorrágica. Desparasitan cada 6 meses con ivermectinas.

En La Piedad, que es donde se introdujeron animales nuevos, no se practica la cuarentena. En la última temporada de partos algunos signos clínicos adicionales a los abortos fueron:

<u>Granja</u>	<u>Signo clínico</u>
1	Secreción mucopurulenta verde por ollares
2	El 50% del rebaño presentó conjuntivitis
3	Aumento de mortalidad del 5% y el 15% del rebaño. En época de lluvias un brote de neumonías y conjuntivitis en cabritos.

4 Problemas de mastitis y fertilidad en todo el rebaño

En Ecuandureo, en la última temporada de partos algunos signos clínicos adicionales a los abortos son:

Granja	Signo clínico
5	Conjuntivitis ligera (lagrimeo sin color)
6	Problemas de fertilidad
7	Neumonías en cabritos. En hembras que presentaron aborto se reportó que hubo retención placentaria, encontrando un feto con edema, la placenta se encontraba con gran cantidad de pus.
8	Sin datos
9	Problemas de fertilidad,
10	Problemas de fertilidad y un macho con epididimitis,
11	Conjuntivitis
12	Queratoconjuntivitis severa principalmente en hembras en desarrollo

Resultados de datos particulares de los animales muestreados

A continuación se presentan los datos más representativos obtenidos de acuerdo al segundo cuestionario, enfocado hacia datos particulares de los animales muestreados.

- Las edades encontradas en las cabras muestreadas oscilaron entre los 3 meses y los 8 años
- Antigüedad en la granja de acuerdo al número de gestaciones ocurridas en la explotación. Principalmente se tenían animales adultos que han pertenecido a la granja por más de una gestación (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Total de caprinos muestreados en relación a su edad y antigüedad en las granjas que conforman los GGAVATTs Ecuandureo y La Piedad en el Estado de Michoacán.

Categoría	Clave	Total de animales con registro
Adulto	A	114
Adulto Nuevo	AN	10
Desarrollo	D	9
Primala	P	71

- Etapa productiva en la que se encontraban en el momento del muestreo. Los datos obtenidos se muestran en el **Cuadro 3**, habiéndose muestreado en las granjas principalmente cabras adultas vacías.

Cuadro 3. Total de caprinos muestreados en relación a su etapa productiva en las granjas que conforman los GGAVATTs Ecuandureo y La Piedad en el Estado de Michoacán.

Categoría	Clave	Total de animales con registro
Cabrito	C	2
Desarrollo	D	9
Gestante	G	86
Vacías	V	113

Resultados de muestras clínicas.

Se obtuvieron un total de 200 muestras de heces, 50 del GGAVATT La Piedad y 150 del GGAVATT Ecuandureo, así como 209 sueros, 49 del GGAVATT La Piedad y 160 del GGAVATT Ecuandureo. La distribución de las muestras obtenidas se presenta en la (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Distribución de las muestras por granjas y GGAVATT de Michoacán, México, para el diagnóstico de *Chlamydophila spp.*

GGAVATT	COMUNIDAD	GRANJA (No. animales)	MUESTRAS DE HECES (n=200)	MUESTRAS SANGUÍNEAS (n=209)
La Piedad	La Esperanza	1 (n=150)	21	19
		2 (n=350)	5	5
	Ojo de Agua	3 (n=45)	17	16
	La Campana	4 (n=27)	7	9
Ecuandureo	La Barranca	5 (n=168)	19	25
		6 (n=121)	19	19
		7 (n=109)	20	20
		8 (n=263)	24	24
		9 (n=67)	22	25
	Las Fuentes	10 (n=365)	28	29
		11 (n=131)	10	10
		12 (n=100)	8	8

Resultados de la prueba de ELISA.

Al analizar los 209 sueros en la prueba de ELISA, se obtuvo un 20.11% ($42/209$) de seropositividad a *Chlamydophila abortus*.

Al analizar estos resultados por GGAVATT en la prueba de ELISA, se encontró que en La Piedad hay un 7.67% ($16/209$) de seropositividad a *C. abortus* del total de las muestras obtenidas y en "Ecuandureo" un 12.44% ($26/160$), sin encontrarse diferencias significativas entre ellos.

Particularmente, en el GGAVATT La Piedad (n=49) hay un 32.65% ($16/49$) de seropositividad, sin encontrarse diferencias significativas entre las granjas que lo conforman (**Figura 1**).

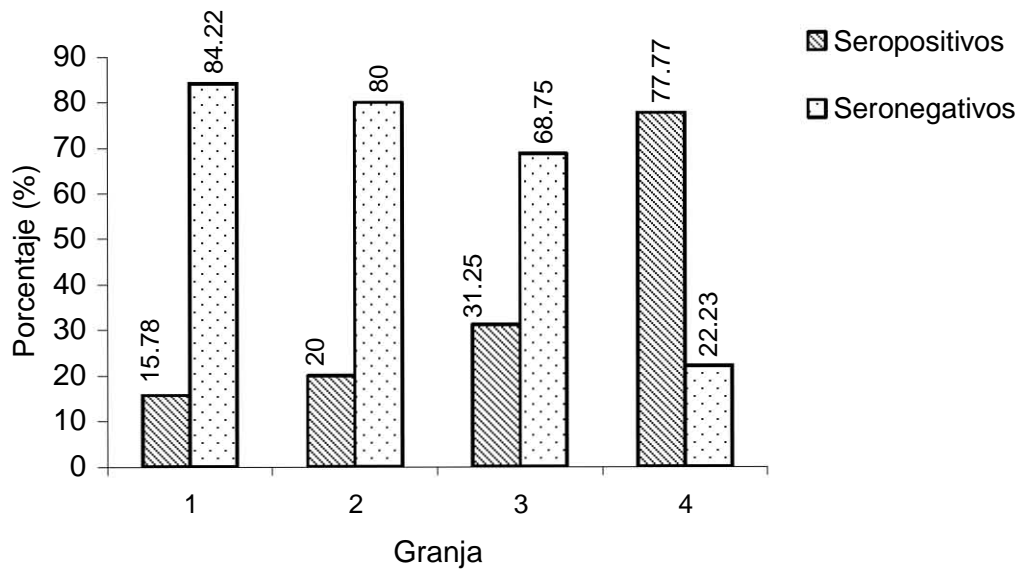


Figura 1. Detección de *Chlamydomphila abortus* mediante la prueba de ELISA en ganado caprino del GGAVATT La Piedad, en el municipio de Ecuandureo, Michoacán.

En relación al GGAVATT Ecuandureo (n=160) se encontró un 16.25% ($\frac{26}{160}$) de seropositividad a *C. abortus* sin encontrarse diferencias significativas entre las granjas que lo conforman (**Figura 2**).

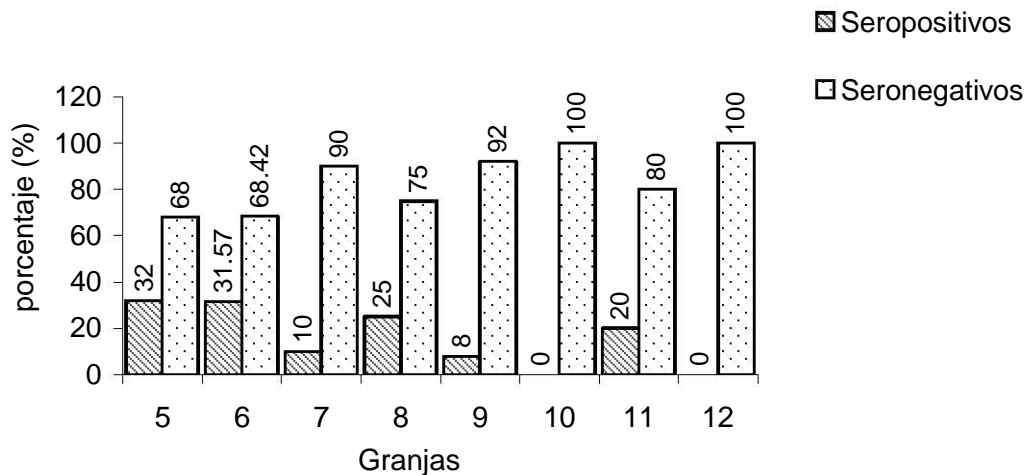


Figura 2. Detección de *Chlamydomphila abortus* mediante la prueba de ELISA en ganado caprino del GGAVATT Ecuandureo, en el municipio de Ecuandureo, Michoacán.

Asociaciones entre datos obtenidos de los cuestionarios y los resultados serológicos.

Una vez obtenidos los resultados generales de la prueba de ELISA se realizaron asociaciones entre los datos encontrados en los cuestionarios previamente realizados. Es importante mencionar que no se obtuvieron los datos para todas las variables, debido a que o bien la persona que contestó el cuestionario desconocía los datos, o bien no había registro de los animales. Estas asociaciones se elaboraron de acuerdo a lo siguiente:

Edad y antigüedad en la granja.

Al analizar los resultados serológicos obtenidos en relación a la edad y la antigüedad de las cabras en la granja se obtuvo el registro de 198 animales, de los

cuales se encontró en las primíalas un 10.11% ($\frac{20}{198}$) de seropositividad a *C. abortus* en tanto que las adultas nuevas mostraron el 2.03% ($\frac{4}{198}$) de seropositividad a *C. abortus* (**Figura 3**).

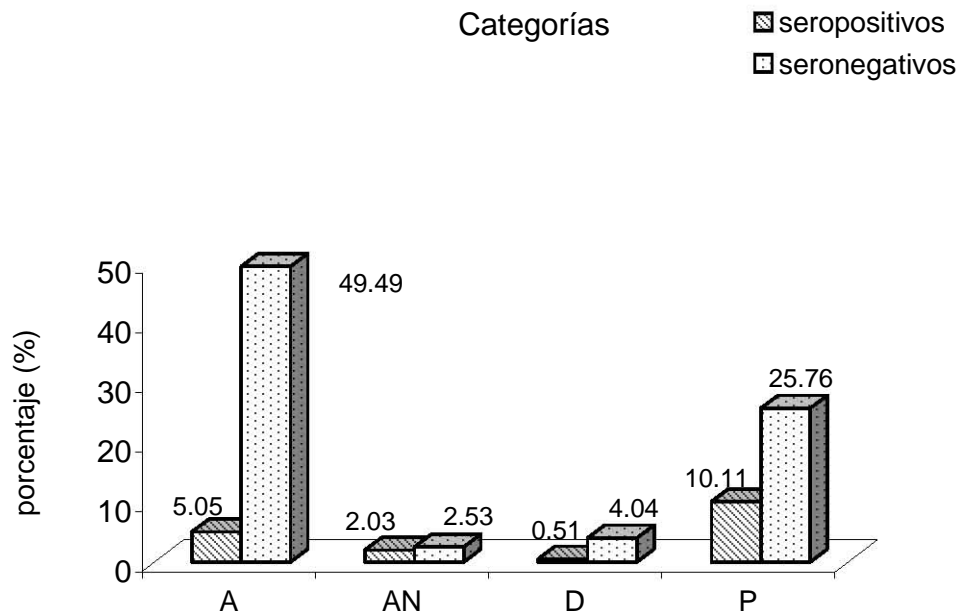


Figura 3. Relación entre la edad y la antigüedad de caprinos de los GGAVATTs La Piedad y Ecuandureo, Michoacán y la serorreactividad a *Chlamydomphila abortus* mediante ELISA. A= adulto, AN= adulto nuevo, D=desarrollo, P= primíalas.

Etapa productiva

Al analizar los resultados serológicos en relación a la etapa productiva de 203 registros obtenidos, la mayor cantidad de serorreactores positivos a *C. abortus* se

encontró en los animales vacíos con un 11.33% ($^{23}/_{203}$), siguiendo las gestantes con un 6.34% ($^{13}/_{203}$) (**Figura 4**).

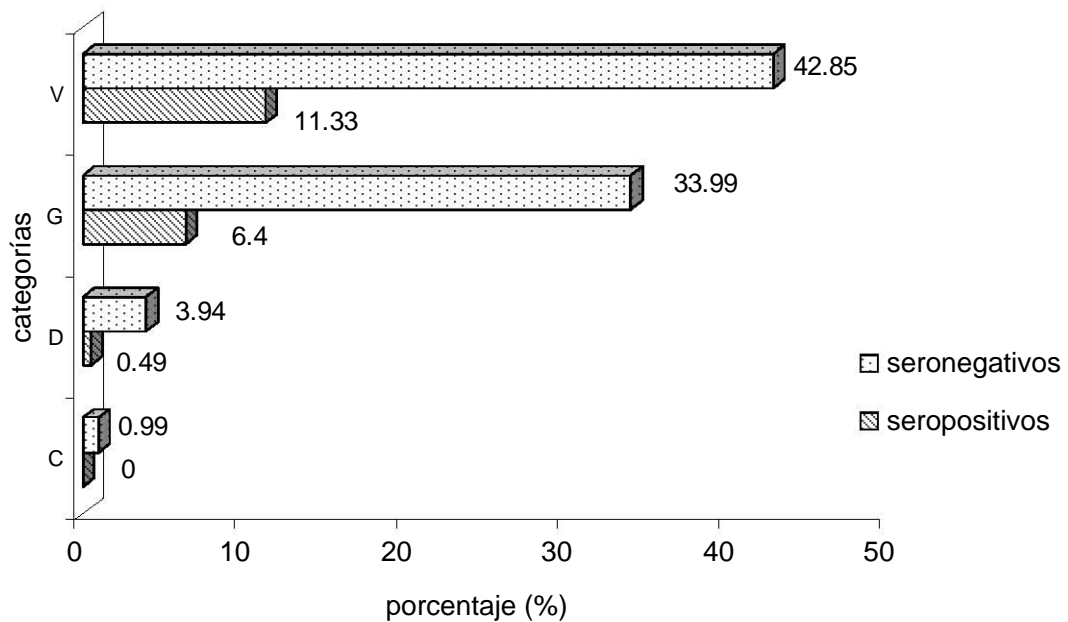


Figura 4. Relación entre la edad y la antigüedad de caprinos de los GGAVATTs La Piedad y Ecuandureo, Michoacán y la serorreactividad a *Chlamydophila abortus* mediante ELISA. C=cabrito, D= desarrollo, G=gestante, V= vacías

Aborto en el período inmediato anterior.

Al analizar los resultados serológicos en relación a la manifestación de abortos ocurridos en el período inmediato anterior de partos, se obtuvieron datos de 192 cabras. 86 animales presentaron aborto en el periodo inmediato anterior obteniendo el 22.09% ($^{19}/_{86}$) de seropositividad a *C. abortus*. 106 cabras no presentaron aborto en el periodo inmediato anterior, y se encontró el 16.03% ($^{17}/_{106}$) de seropositividad a *C. abortus*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) (**Figura 5**).

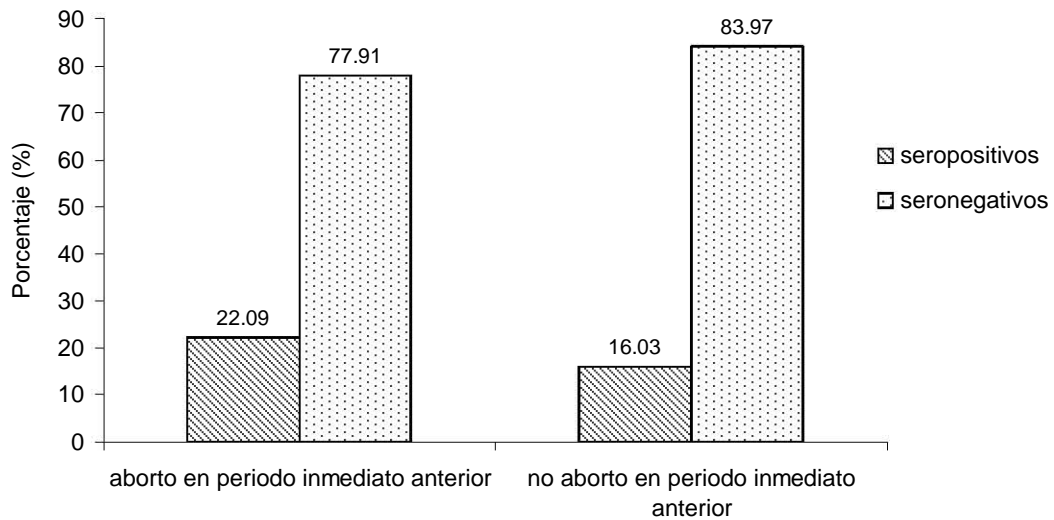


Figura 5. Relación entre la presentación de aborto en el periodo mediato anterior de caprinos de los GGAVATTs La Piedad y Ecuandureo y la serorreactividad a *C. abortus* mediante ELISA.

Abortos previos al periodo de partos inmediato anterior.

Al analizar los resultados serológicos obtenidos en relación a los abortos previos al periodo de partos inmediato anterior (registros de 165 cabras). Se encontró que las cabras que no tienen abortos previos registraron un mayor porcentaje de seropositivos con el 13.34%.

No se observó diferencia significativa ($p=0.25$) entre el número de abortos y el porcentaje de seropositivos a *C. abortus* (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Relación entre abortos ocurridos previo al periodo de partos inmediato anterior en caprinos de los GGAVATT La Piedad y Ecuandureo, Michoacán, y la serorreactividad a *Chlamydophila abortus* mediante ELISA.

Abortos previos en número	Seropositivos		Negativos	
	No.	% total muestras	No.	% total muestras
0	22	13.34	82	49.70
1	6	3.63	39	23.64
2	3	1.82	8	4.85
3	0	0	3	1.82
4	1	0.61	1	0.61

Resultados de Aislamientos de *Chlamydophila spp.*

Heces

Chlamydophila spp se aisló en el 84.5% ($^{169}/_{200}$) de los 200 animales muestreados a partir de heces, correspondiendo el 22.5% ($^{48}/_{200}$) al GGAVATT La Piedad, y el 62% ($^{124}/_{200}$) al GGAVATT Ecuandureo. No se encontraron diferencias significativas entre GGAVATTs ($p>0.05$).

A nivel GGAVATT, *Chlamydophila spp* se aisló en el 90% ($^{45}/_{50}$) de los animales en La Piedad, sin encontrarse diferencias significativas entre las granjas que conforman el GGAVATT (**Figura 6**).

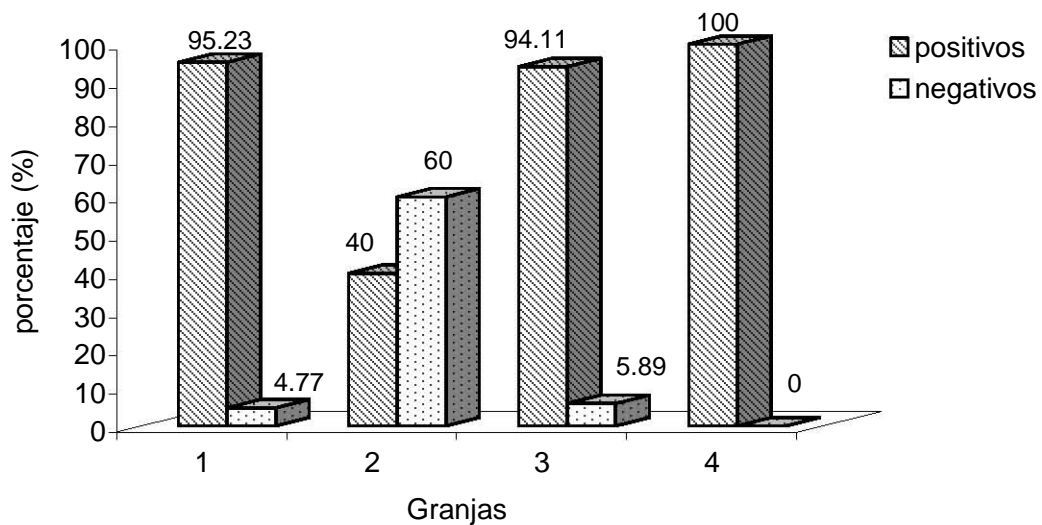


Figura 6. Aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de heces de cabras del GGAVATT La Piedad, Michoacán.

En el GGAVATT Ecuandureo se aisló *Chlamydophila spp* en el 84% ($^{124}/_{150}$) de las cabras, no se encontraron diferencias significativas entre las granjas que conforman el GGAVATT (**Figura 7**).

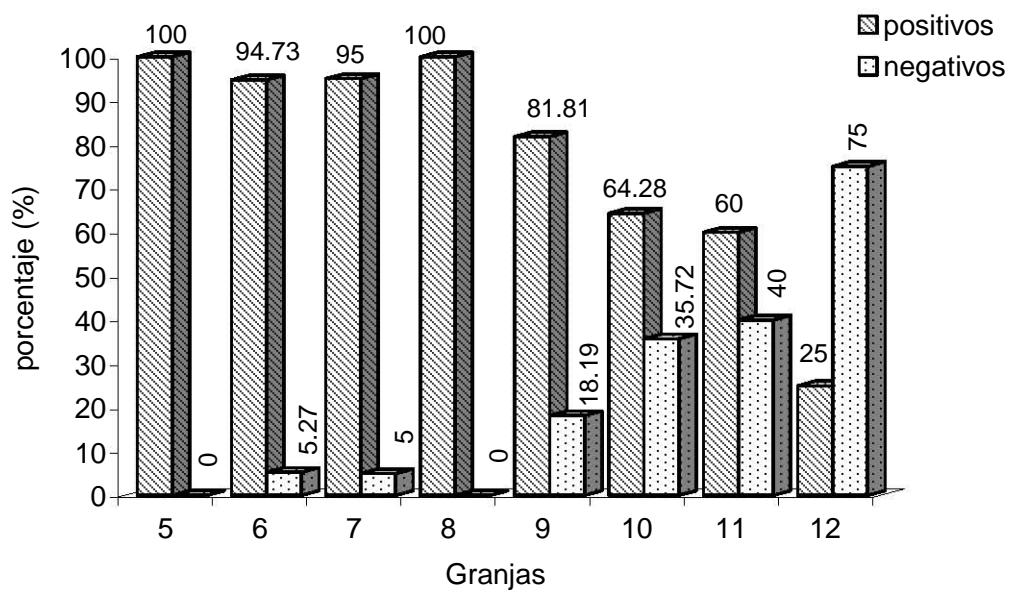


Figura 7. Aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de heces de cabras del GGAVVATT Ecuandureo, Michoacán.

Edad y antigüedad en la granja

Al analizar los resultados obtenidos en el aislamiento de *Chlamydophila spp* con relación a la edad y antigüedad de las cabras, se obtuvo información de 190 cabras. El mayor porcentaje de seropositivos se observó en las cabras adultas pertenecientes al rebaño durante más de una gestación (A), con el 45.26% ($^{86}/_{190}$), y las cabras primaras (P), con el 31.05% ($^{59}/_{190}$). En los adultos nuevos (AN) introducidos a los rebaños durante el año anterior al momento del muestreo se detectó 100% de positividad en el aislamiento (**Figura 8**).

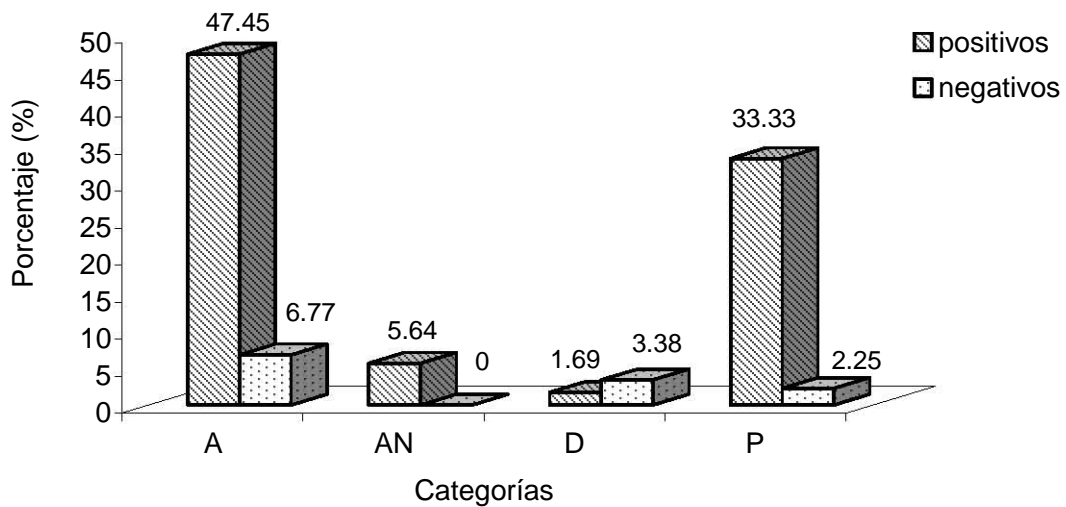


Figura 8. Relación entre la edad y antigüedad de caprinos de los GGAVATTs La Piedad y Ecuandureo, Michoacán, y el aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de heces. A= adulto, AN= adulto nuevo, D= desarrollo, P= primaras

Etapa productiva

Al analizar los hallazgos del aislamiento de *Chlamydophila spp* en referencia a la etapa productiva de los animales de los cuales se obtuvo información de 177 animales. Se observó que el mayor porcentaje de animales positivos al aislamiento bacteriano se encuentra dentro del grupo de los vacíos con el 45.65%, siguiendo en orden descendente el grupo de las gestantes con el 35.87% (**Figura 9**).

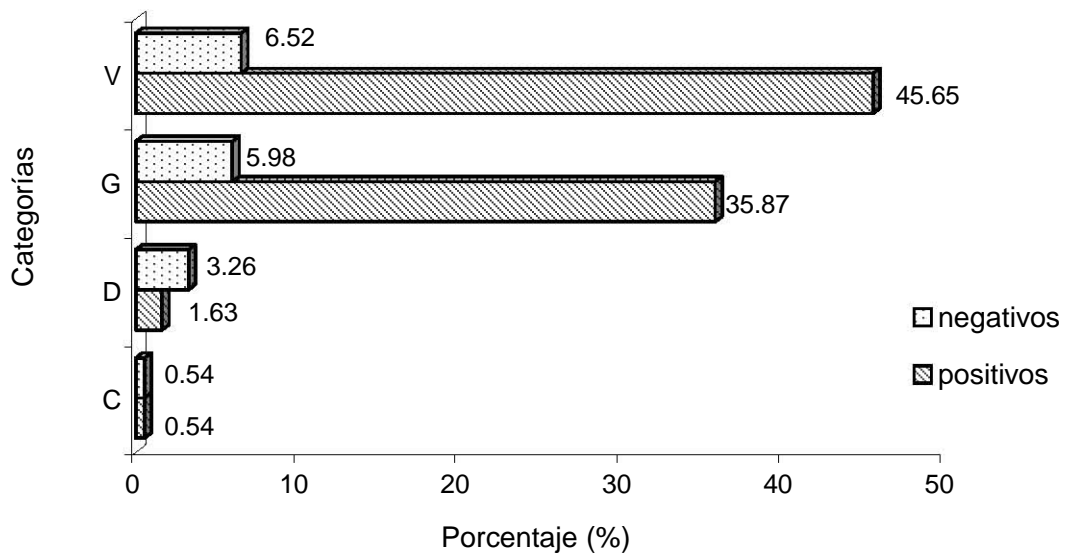


Figura 9. Relación entre la etapa productiva de caprinos de los GGVATTs La Piedad y Ecuandureo, Michoacán y el aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de heces. C=cabrito, D= desarrollo, G= gestante, V= vacía.

Abortos en el periodo inmediato anterior

Al analizar los aislamientos de *Chlamydophila spp* en relación a la ocurrencia de abortos en el periodo inmediato anterior, se evaluaron 179 cabras, de las cuales 80 abortaron y 99 no. *Chlamydophila spp* se aisló de animales de ambos grupos no observándose diferencias significativas entre los animales que presentaron o no aborto en el periodo mencionado (**Figura 10**).

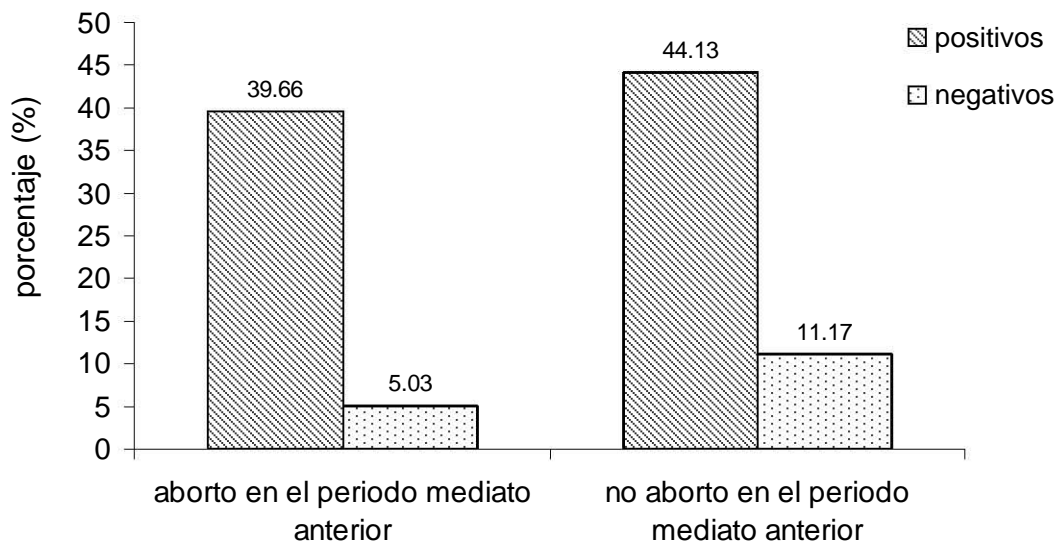


Figura 10. Relación entre la ocurrencia de abortos en el periodo de partos inmediato anterior en caprinos de los GGAVATTs La Piedad y Ecuandureo, Michoacán de *Chlamydophila spp* a partir de heces.

Abortos previos al periodo de partos de partos inmediato anterior

Finalmente, al analizar los aislamientos de *Chlamydophila spp* en relación a la ocurrencia de abortos en gestaciones previas al periodo inmediato anterior, con la información obtenida de 155 cabras, abarcando animales sin historia de abortos previos y animales que habían presentado de 1 a 4 abortos con anterioridad, *Chlamydophila spp* fue aislado en cabras de cada uno de los diferentes grupos mencionados, observándose un mayor número de animales infectados en aquellos que no habían presentado abortos con un 55.48%. En el resto de los animales se aisló a *Chlamydophila spp*, indistintamente del número de ellos (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Relación entre abortos en gestaciones previas al periodo de partos inmediato anterior en caprinos de los GGAVATT, La Piedad y Ecuandureo, Michoacán, México, y el aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de heces.

Abortos previos en #	Aislamientos positivos		Aislamientos negativos	
	No.	% total muestras	No.	% total muestras
0 (n=95)	86	55.48	9	5.81
1 (n=45)	36	23.23	9	5.81
2 (n=10)	8	5.16	2	1.29
3 (n=3)	3	1.94	0	0
4 (n=2)	2	1.29	0	0

Asociaciones entre serología y aislamientos

Los resultados de la prueba de ELISA en relación a los aislamientos de *Chlamydophila spp* a partir de muestras de heces, con la información de 188 animales, se muestran en la (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Relación entre la prueba de ELISA y el aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de heces de los GGAVATT La Piedad y Ecuandureo, Michoacán, México.

Aislamientos	Prueba de ELISA	
	Positivos (n=35)	Negativos (n=153)
Positivos (n=158)	34 18.08%	124 65.96%
Negativos (n=31)	1 0.53%	30 15.43%

El análisis de dichos hallazgos muestra aproximadamente un 84.04% ($^{158}/_{188}$) de animales que están infectados con *Chlamydophila spp*. Cabe señalar que tan solo un 18% de los animales donde se aisló el microorganismo presentó anticuerpos específicos a *Chlamydophila abortus*, lo que indica la existencia de infecciones subclínicas mixtas por *C. abortus* y *C. pecorum* en los hatos estudiados.

Resultados de aislamientos de *Chlamydophila spp.*

Órganos

Chlamydophila spp se aisló en el 50% de los hígados de cabritos muertos en los primeros 15 días de vida (**Figura 11**). Así mismo, *Chlamydophila spp* se aisló a partir del hígado fetal remitido (**Figura 12**). No se encontraron inclusiones citoplasmáticas en tejido placentario (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Aislamiento de *Chlamydophila spp* a partir de órganos de cabritos y de cabras de los GGAVATT La Piedad y Ecuandureo, Michoacán, México.

Aislamiento de órganos	Positivos	Negativos
Hígados cabrito (n=6)	3	3
Hígado fetal (n=1)	1	0
Caruncúlas (n=1)	0	1

n=8

4. DISCUSIÓN.

El AEPR se ha reportado en varios países del mundo. Sin embargo, en México está considerado oficialmente como una enfermedad exótica en cabras. Este trabajo utilizó una prueba de ELISA específica para *Chlamydophila abortus*, el agente etiológico del AEPR, encontrándose un 20.11% de seropositividad en la presencia de anticuerpos específicos hacia esta bacteria, demostrando que el ganado caprino del país ha estado en contacto con este microorganismo.

Al evidenciar la presencia de anticuerpos hacia *C. abortus* en los GGAVATTs del municipio de Ecuandureo, Michoacán, se demuestra su participación en procesos infecciosos de estos animales. De acuerdo a lo reportado por los productores durante el muestreo, en el transcurso de las últimas décadas se han introducido a nuestro país animales provenientes de áreas donde el AEPR es enzootico. Estos animales llegaron sin registro de enfermedades a nuestro país, mismos en los que no se practicó la cuarentena y posiblemente, como portadores asintomáticos de *Chlamydophila spp*, siendo movilizados por varios estados de la República, entre ellos el Estado de Michoacán. Sin embargo, más relevante que el poder determinar la fuente de infección original, el hecho es que *C. abortus* esté presente en hatos caprinos de nuestro país.

Al tratar de establecer asociaciones entre las principales características obtenidas de los cuestionarios aplicados, sobre los animales muestreados y los resultados del análisis serológico, se observa, entre otras cosas, que el mayor porcentaje de seropositividad a *C. abortus* se encuentra en las cabras primaras (entre 7 meses y

1.5 años), lo cual coincide con lo reportado por Amin y Wilsmore ⁽³⁸⁾. Es importante resaltar, que de acuerdo a lo reportado por Appleyard *et al*, hembras primíparas infectadas recientemente con esta bacteria tienen una mayor posibilidad de abortar durante su primera gestación que aquellas hembras que se hayan infectado en otro momento y otra etapa productiva ⁽¹²⁾

Dentro de los resultados obtenidos en la ocurrencia del aborto en el periodo inmediato anterior, observamos que la seropositividad a *C. abortus* de algunos animales es indistinta a haber presentado o no el aborto; con 9.9% y 8.86% respectivamente. De acuerdo a los registros obtenidos, los animales seropositivos del primer grupo mencionado, presentaron el aborto en un lapso no mayor a 3 semanas previas al momento del muestreo. Esto puede indicar que en estos animales este presente una infección activa ⁽¹³⁾. En contraste, el hecho de que animales seropositivos no hayan abortado en el último periodo de partos no descarta la posibilidad de que estos animales pudieran presentar abortos causados por *Chlamydophila abortus* en próximas gestaciones, dado que los animales ya han sido infectados por este microorganismo.

En los resultados referentes a los aislamientos a partir de heces, encontramos un muy alto porcentaje de cabras infectadas con *Chlamydophila spp* lo cual es similar con un 84.5% a lo reportado previamente en un estudio realizado en ovinos en nuestro país ⁽²²⁾. Esto demuestra la presencia de *Chlamydophila spp* en el tracto gastrointestinal, tanto de cabras que han presentado aborto, como de cabras que no lo han presentado.

Debido a que la prueba para la detección del microorganismo utilizada es específica de género, y por lo tanto no discrimina entre especies, cabe la

posibilidad de que tanto *C. abortus* como *C. pecorum*, se encuentren ocasionando infecciones subclínicas intestinales en los animales ⁽³⁶⁾, y por ende, se encuentre excretándose en heces, lo cual se ha reportado también, con otros estudios ^(3,4). Esto adquiere una mayor relevancia si consideramos que la colonización a partir del intestino a la placenta por *Chlamydophila spp* se ve favorecida por parásitos e infecciones de otros géneros bacterianos ⁽⁴¹⁾.

Los hallazgos obtenidos en ambas pruebas, demuestran la presencia de *Chlamydophila spp*, en los hatos caprinos estudiados y ponen de manifiesto el contacto específico de *C. abortus* con estos animales, existiendo asociación con los abortos ocurridos.

Los porcentajes de abortos presentados en los hatos estudiados, de acuerdo a la información de los productores, no sugieren una primoinfección por *Chlamydophila spp*, ya que se sabe que la progresión de las manifestaciones clínicas de la infección dependen del estado reproductivo en el que se encuentre el animal, y que la manifestación de altos porcentajes de aborto en hatos caprinos infectados con *C. abortus* puede ser cíclica ^(4,10), aunado a esto el hecho de que más del 50% de los animales sin historia de abortos albergan a esta bacteria en su organismo, y que una cuarta parte de las cabras primaras analizadas han estado o están en contacto con *C. abortus*, es factible que de no tomarse las medidas preventivas adecuadas y darse seguimiento a los animales de estas granjas, se presente una alta incidencia de abortos en las mismas en el transcurso de los próximos años.

Los hallazgos de la serología hacia *C. abortus* y el aislamiento de *Chlamydophila spp* realizado, muestran en conjunto que el 84.57% de los animales estudiados ha

estado en contacto con estos microorganismos. Es importante resaltar, que en el 21.5% donde se detectaron anticuerpos específicos hacia *C. abortus* también se detectó *Chlamydophila spp.* en heces, mientras que en el 0.32% de los animales analizados donde no se aisló a *Chlamydophila spp.* se detectaron anticuerpos contra *C. abortus*. La presencia de infecciones mixtas por estos microorganismos en México ha sido previamente reportado para el caso de ovinos ⁽⁴²⁾.

Es importante señalar que en un animal muestreado se detectaron anticuerpos contra *C. abortus* pero no se aisló a *Chlamydophila spp.*, si bien indica que la cabra no mantiene infecciones subclínicas intestinales ni por *C. pecorum* ni por *C. abortus*, no se descarta el hecho de que *C. abortus* pueda estar alojada en algún órgano de infección secundaria.

Amin y Wilsmore reportan que se necesitan de varios factores principalmente involucrados en aspectos como manejo, instalaciones, y medicina preventiva, para que una cepa poco virulenta pueda alcanzar la colonización placentaria y posterior infección de la madre al feto, provocando el aborto o la debilidad del cabrito recién parido y su muerte posterior, y de acuerdo a la información obtenida, varios de estos factores se aprecian en el GGAVATT La Piedad.

5. CONCLUSIÓN.

Este estudio demuestra la presencia de *Chlamydophila spp.* en los hatos caprinos estudiados, indicando infecciones mixtas por *C. abortus* y *C. pecorum*, las cuales pueden estar tanto en forma subclínica en el epitelio intestinal de los animales como asociados a problemas de aborto. Es necesario realizar estudios más

amplios enfocados por un lado a la caracterización de las cepas de *Chlamydophila* spp aisladas en México y por otro lado a la evaluación de la presencia de estos microorganismos en hatos caprinos de diferentes regiones del país, así como de su impacto económico en la industria pecuaria y su repercusión en salud pública.

6. REFERENCIAS.

1. Everett KD, Bush R, Andersen A. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae.*, each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standars for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415-440.
2. Nichols LR, Manire GP. *Chlamydia*. In: Davis BR, Dulbecco R, Eisen HN and Ginsberg HS, editors. *Tratado de Microbiología*. 3ª ed. Salvat Editores de México1984:632-639.
3. Nietfeld JC. Chlamydial infections in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17:301-314.
4. Rodolakis A, Salinas J, Papp J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res* 1998; 29:275-288.
5. Escalante OC, Ducatelle R, Haesebrouck F. The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell?. *FEMS Microbiol Rev* 1998;22:65-78.
6. Moulder JW. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol Rew* 1991;55(1):143-190.
7. Schachter I. Chlamydial Infections – past, present, future. *J Am Vet Med Assoc* 1989;195: 1501-1506.
8. Buxton D. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet Rec* 1986;118:510-511.
9. Fukushi H, Hirai K. *Chlamydia pecorum* – The fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol Immunol* 1993;37(7):515-522.
10. Entrican G, Buxton D, Longbottom D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *J R Soc Med* 2001;94:273-277.

11. Storz J, Page L. Taxonomy of the *Chlamydiae*: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia* family *Chlamydiaceae*, in separate order, *Chlamydiales* ord. nov. Int J Syst Bacteriol 1971;21:332-334.
12. Appleyard WT, Aitken ID, Anderson I. Outbreak of Chlamydial abortion in goats. Vet Rec 1983;113:63.
13. Papp JR, Shewen PE, Gartley CI. *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. Can J Vet Res 1993;57:185-189
14. Aitken ID, Clarkson MI, Linklater K. Enzootic abortion of ewes. J Small Anim Pract 1990;125:136-138.
15. Liao YK, Chain CY, Lu YS, Li NJ, Tsai HJ, Liou PP. Epizootic of *Chlamydia psittaci* infection in goats in Taiwan. J Basic Microbiol 1997;37:327-333.
16. Moeller RB Jr. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991-1998). J Vet Diagn Invest 2001;13:265-270.
17. Rodolakis A. Recent advances in goats diseases Chlamydiosis in goats. Tempesta M. (Ed.) International Veterinary Information Service. [cited 2001 Jan 16]. Available from: URL:<http://www.ivis.org>.
18. Chanton GH, Thoma R, Corboz L, Borel N, Pospischil A. Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with especial regard to chlamydial abortions. Schweiz Arch Tierheilkd 2002;144:483-492.
19. Jorgensen DM. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. Emerg Infect Dis 1997;3:191-194.
20. Aitken ID. Chlamydial abortion. In WB Martin and Aitken ID. Diseases in sheep. Oxford: Blackwell Science 2000:81-86.
21. Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Zimmermann D, Gebbers Jo. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). Swiss Med Wkly 2002;132:64-66.

22. Escalante OC, Rivera FA, Trigo TF and Romero MJ. Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep through cell culture isolation. Rev Latinoam Microbiol 1996; 38: 17-23.
23. Rojas MAM. Aislamiento de *Chlamydia psittaci* en aves de ornato mediante cultivo celular y la prueba de inmunofluorescencia indirecta. (tesis de licenciatura). México, D.F. FMVZ UNAM. 1996.
24. Escalante OC, Díaz AE, Segundo ZC and Suárez GF. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: First Report. Rev Latinoam Microbiol 1997;39:117-121.
25. Escalante OC, Lazcano AC and Soberón MA. *Chlamydia* spp. Como agente zoonótico en México: Reporte de un caso. Memorias de la XXXVII Reunión Nacional de investigación Pecuaria; 2001 octubre 9-12; Tuxtla Gutiérrez (Chiapas) México 2001:41.
26. Blewett DA, Gisemba F, Miller JK, Johnson FWA, and Clarkson M. Ovine enzootic abortion: the acquisition of infection and consequently abortion within a single lambing. Vet Rec 1982;111:499-501.
27. Appleyard WT, Aitken ID, Anderson IE. Attempted venereal transmission of *Chlamydia psittaci* in sheep. Vet Rec 1985;116:535-538.
28. Jones GE, Anderson IE. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? Research in Vet Science 1988;44:260-261.
29. Buxton D, Rae AG, Maley SW, Thomson KM, Livingstone M, Jones GE, Herring AJ. Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. Comp Path 1996;114:221-230.
30. Shewen PE. Chlamydial infection in animals: a review. Can Vet J 1980; 21:2-11.

31. Kerr K, Entrican G, McKeever D, Longbottom D. Immunopathology of *Chlamydophila abortus* infection in sheep and mice. *Research in Vet Science* 2005;78:1-7.
32. Buxton D, Barlow RM, Finlayson J, Anderson IE, Mackellar A. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* Infection of pregnant sheep. *J Comp Path* 1990;102:221-237.
33. Rekiki A, Bouakane A, Hammami S, El Idrissi AH, Bernard F, Rodolakis A. Efficacy of live *Chlamydophila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and foetuses against strains of *Chlamydophila pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet Microbiol* 2004;99(3-4):295-299.
34. Amin JD, Wilsmore AJ. Studies on the early phase of the pathogenesis of ovine enzootic abortion in the non-pregnant ewe. *Br Vet J* 1995;151(2):141-151.
35. Wilsmore AJ, Dagnall GJR, Woodland RM. Experimental conjunctival infection of lambs with a strain of *Chlamydia psittaci* isolated from the eyes of a sheep naturally affected with keratoconjunctivitis. *Vet Rec* 1990;127:229-231.
36. Souriau A, Salinas J, De Sa C, Layachi K, Rodolakis A. Identification of subspecies and serotype 1-specific epitopes on the 80-90 kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *Am J Vet Res* 1994;55:510-514.
37. Souriau A, Rodolakis A. Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goats by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Vet Microbiol* 1986;11:251-259.
38. Vanrompay D, Van Nerom, Ducatelle R, Haesebroek F. Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J Clin Microbiol* 1994;32(6):1470-1474.
39. Leach C. Introduction to statistics. A nonparamedic approach for the social sciences. 1st ed. Great Britain: John Wiley and Sons press, 1979.

40. Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ªed. México D.F.: Limusa, 2002.
41. Philips HL, Clarkson MJ. Experimental infection of pregnant ewes with *Chlamydia pecorum*. *Infec Immun* 1998;66(6):2818-2821.
42. Escalante OC. Comparative serological investigation of a sheep flock from Mexico for evidence of *Chlamydia psittaci* infection (M.C tesis). University of Surrey. 1991.

ANEXO 1.

CUESTIONARIO 1. DATOS GENERALES DE LAS EXPLOTACIONES

MUESTREO CAPRINOS ECUANDUREO

Fecha: _____

COMUNIDAD: _____

GRANJA: _____

NO. DE ANIMALES: _____

PROPIETARIO: _____

Genética

1) Que razas manejan en esta explotación:

Reproducción

❖ Hembras

1) Cuantos partos tienen al año las cabras: _____

2) Utilizan algún sincronizador (hormonas sintéticas y/o naturales)

Sí: _____ No: _____ Cuales: _____

3) Manejan época de empadre: Sí: _____ NO: _____

4) Tienen monta natural (directa) Sí: _____ NO: _____

❖ Machos

1) Los machos pertenecen a la explotación: Sí: _____ No: _____

En caso de que la respuesta sea Sí: manejan época de empadre: Sí: _____ NO:

En caso de que la respuesta sea NO: Alquilan al macho Compran el semen

Alimentación:

1) La dieta se basa en:

2) En caso de pastoreo, los animales tienen contacto con otros rebaños :

SÍ: _____

NO: _____

Manejo

1) Número total de animales en la explotación: _____

2) Que sistema de explotación maneja:

Pastoreo

Pastoreo controlado

Mixto

Estabulación

Semiestabulación

3) Las cabras se encuentran separadas en corrales: Sí _____ No _____

En caso de que la respuesta haya sido Sí:

4) En que se basa para separarlas:

Etapa de desarrollo _____

Producción de leche (L) y/o carne (C) _____

5) Los machos se encuentran separados de las hembras Sí _____ No _____

6) Han introducido animales en el último año Sí _____ No _____

7) Llevan registros Sí _____ No _____

8) Elaborar una breve descripción de las instalaciones

Salud

1) En los últimos 4 períodos que cantidad de abortos ha tenido: _____

2) Con que vacunas cuentan sus animales:

3) Se encuentran dentro de campaña de

Brucelosis Sí _____ No _____

