



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**  
**Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA  
EL DIAGNÓSTICO DE LA CLAMIDIOSIS EN CAPRINOS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ SERRANO**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO**  
*INIFAP CENID Microbiología Animal*

**COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO**  
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM*

**DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ**  
*Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM*

**DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ**  
*Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM*

**MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE DE 2013**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

	Dedicatorias.....	I
	Agradecimientos.....	II
	Resumen.....	IV
	Abstract.....	VI
1	Introducción.....	1
2	Justificación.....	40
3	Hipótesis.....	40
4	Objetivo general.....	41
5	Material y métodos.....	42
5.1	Material biológico.....	42
5.1.1	Sueros.....	42
5.1.2	Microorganismos.....	42
5.2	Cultivo y producción de <i>Chlamydia abortus</i> en saco vitelino de embrión de pollo.....	43
5.3	Determinación de la presencia de <i>Chlamydia abortus</i> en los sacos vitelinos infectados.....	44
5.4	Cultivo y multiplicación de <i>Chlamydia abortus</i> en la línea celular L-929.....	45
5.4.1	Cultivo de la línea celular L-929.....	45
5.4.2	Infección de la monocapa celular.....	47
5.4.3	Determinación de la presencia de <i>Chlamydia abortus</i> en cultivo celular infectado.....	47
5.5	Purificación de <i>Chlamydia abortus</i> para la obtención de un antígeno a partir de cuerpos elementales (CE).....	48
5.5.1	Purificación parcial de <i>Chlamydia abortus</i> .....	50
5.5.2	Inactivación del antígeno.....	51
5.5.3	Antigenicidad y pureza del extracto crudo obtenido.....	51

---

5.6	Estandarización de la técnica de inmunoensayo enzimático Indirecto. (ELISA-I) .....	52
5.7	Adsorción de sueros para descartar posibles reacciones cruzadas.....	55
5.8	Análisis estadístico.....	57
6	Resultados.....	58
6.1	Multiplicación de <i>Chlamydia abortus</i> en saco vitelino de embrión de pollo y en cultivos celulares.....	58
6.2	Determinación de la presencia de <i>Chlamydia abortus</i> en saco vitelino de embrión de pollo y cultivos celulares.....	58
6.3	Antigenicidad y pureza del extracto crudo obtenido a partir de <i>Chlamydia abortus</i> .....	59
6.4	Estandarización de la prueba de ELISA-I.....	60
6.4.1	Determinación de la concentración del antígeno por la microtécnica de Bradford.....	60
6.4.2	Titulación del antígeno.....	60
6.4.3	Titulación del suero.....	61
6.4.4	Resultados obtenidos a partir de las muestras de diferentes rebaños.....	64
6.4.5	Adsorción de muestras control.....	68
7	Discusión.....	70
8	Conclusiones.....	77
9	Apéndice.....	78
10	Literatura citada.....	82

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Patógenos de la familia <i>Chlamydiaceae</i> potencialmente zoonóticos.....	4
Figura 2	Fotografía electrónica de las diferentes formas evolutivas Clamidiales.....	9
Figura 3	Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydia spp</i> .....	11
Figura 4	Representación esquemática de la membrana externa clamidial, mostrando la localización de las tres principales proteínas: MOMP, Omp2 y Omp3.....	15
Figura 5	Esquema de la respuesta inmune Th1 contra <i>C. abortus</i>	20
Figura 6	Restos celulares (fondo del tubo), suspensión rica en clamidias (porción media del tubo) y fracción lipídica (parte superior del contenido en el tubo).....	44
Figura 7	Línea celular L-929 de fibroblastos de ratón en cultivo con medio D-MEM.....	46
Figura 8	Inmunofluorescencia (IFD) directa de células L-929 infectadas con la cepa A22 de <i>C. abortus</i> .....	48
Figura 9	Diferenciación de fases previos a ultracentrifugación.....	49
Figura 10	Sedimento de clamidias formado después de la segunda ultracentrifugación.....	49
Figura 11	Tubos con Ioditras y sobrenadante de sacos vitelinos.....	51
Figura 12	Frotis de células L-929 infectadas con <i>C. abortus</i> y teñidas con la técnica de Stamp.....	59
Figura 13	Frotis de células infectadas. Técnica de IFD.....	59
Figura 14	Membrana de nitrocelulosa negativa (a) y positiva (b) a la	59

---

	prueba de Dot blot.....	
Figura 15	Densidad óptica (D.O.) de las diferentes diluciones del antígeno.....	<b>61</b>
Figura 16	Lectura de las diluciones de los sueros.....	<b>62</b>
Figura 17	. Comparativo entre muestras adsorbidas y sin adsorber en sueros de animales con aislamiento y PCR positivo.....	<b>67</b>
Figura 18	Comparativo entre muestras adsorbidas y sin adsorber en sueros de animales con aislamiento y PCR negativo.....	<b>67</b>

---

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Taxonomía del orden de las <i>Chlamydiales</i> .....	3
Cuadro 2.	Familia <i>Chlamydiaceae</i> .....	5
Cuadro 3.	Componentes de la pared celular clamidial que interactúan con la célula hospedera.....	8
Cuadro 4.	Distribución de albúmina sérica bovina (ASB) y reactivo de Bradford (RBF) en placa de 96 pozos para la microtécnica de Bradford.....	50
Cuadro 5.	Distribución del antígeno ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en placa de 90 pozos para su titulación.....	53
Cuadro 6.	Distribución de los sueros control en la placa para el ELISA.....	54
Cuadro 7.	Microorganismos utilizados para realizar las adsorciones de los sueros.....	56
Cuadro 8.	Resultados obtenidos para el cálculo del punto de corte para sueros positivos y negativos.....	63
Cuadro 9.	Resultados obtenidos en base al diseño de Cohen.....	64
Cuadro 10	Resultados obtenidos con el ELISA-I desarrollado y el estuche comercial.....	66

---

## **DEDICATORIAS**

*A Dios: por concederme ese don tan maravilloso que es la vida y permitirme tener logros como este, en ella.*

*A mi madre biológica: por haberme dado esta oportunidad tan fantástica: vivir!*

*A mi Papá Cabraf y a mis mamás Mago y Chofí: por enseñarme lo maravillosa que es la vida, alimentándome siempre con su sabiduría y amor; por contribuir en mi formación como persona y darme las armas para poder enfrentarme a la vida misma.*

*A mi familia: mi tía Joaquina, tía Paquis, mis primos-hermanos Estela, Ángel, Monyn y a Marco; por su apoyo, su amor y comprensión, por forjar en mí ese gran espíritu de superación y de búsqueda por la vida.*

*A mis tíos en general: Nico y Adela, Miguel y Chela, Geras y Lupita, Lalo y Lupita, Lourdes y Pancho, y a todos mis primos por su apoyo brindado, gracias por impulsar mis sueños.*

*A "Pátaro": por tu apoyo y comprensión, por tu tiempo y dedicación, por formar parte de la continuidad en este camino; pero sobre todo, gracias por tu AMISTAD.*

*A Ricky: porque siempre estuviste a mi lado, por el apoyo brindado durante estos tres años llenos de cambios y por lo que has significado en mi vida.*

**GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA HOY Y SIEMPRE**



## *AGRADECIMIENTOS*

*A Pancho, por todo tu tiempo y dedicación en la realización de este trabajo y por el apoyo brindado a través de todos estos años, que si bien no han sido fáciles, ésta es la prueba, de que cuando se quiere, se puede.*

*A mis amigos y amigas que en el trayecto de todos estos años han contribuido con una sonrisa, una palmada en la espalda y palabras de aliento que si bien, en su momento fueron las más oportunas para salir de las adversidades y juntos alcanzar grandes logros como éste.*

*Marlene, Gladys, José, Paco Baños, Carlos, Osvaldo Sánchez, Miryí, Angel, Juanito, Mariano, Humberto, Jehiel, Adrianita, Ángeles, Oscar Molina, Dey, Delman, Marisol Morales, Elizabeth Urbina "Pekas", Armando, Edencita, Selenita y Gaby Navarro, Ricky, Raquel, Coral, José Luis, Sara, Rosy, Polo, Marce, Lauris, Eri, Señora Silvia, Cristi, Teresita, Josefina Álvarez, Ernesto Pedro, Familia Gaona Cerna, y a todos aquellos que me han brindado ese tesoro tan maravilloso que es su AMISTAD.*

*Y porque la vida sigue y aún hay mucho que recorrer en ella, gracias Ricky por todo y por ser alguien maravilloso en mi vida.*

*A la FES-C, porque fue en ella donde me formé como MVZ y a la FMVZ, por darme la oportunidad de continuar en este crecimiento.*

*A los doctores que han contribuido en mi formación académica; particularmente a los Drs. Gerardo García Tovar, Pablo Martínez Labat, Alfredo Cuéllar, Oscar Molina, Francisco Morales, Juan Carlos del Río, Patricia Mora, Jaime Orozco, García Alcaráz, Guillermo Oviedo, Citlali Hernández, Humberto Ramírez, Adriana Ducoing y Víctor Tenorio.*

*A mi comité tutor integrado por los doctores Bety Arellano, Jorge Tórtora, Efrén Díaz y Francisco Morales; así como también a mi jurado evaluador, los doctores Javier Gutiérrez, Andrés Ducoing, Alfredo Cuéllar, Efrén Díaz y Francisco Morales, por su tiempo y dedicación*

*para leer y hacer las correcciones y los comentarios oportunos para la mejora de este trabajo.*

*A los Drs. y amigos que me apoyaron en mi proceso de formación, en la práctica y en la teoría externos a la FES-C: Dra. Rosaura Romero, a mis primos los Drs. Estela y Marco que son un gran ejemplo a seguir como personas y como profesionistas.*

*Al INIFAP-CENID Microbiología, por abrirme las puertas al conocimiento y a la ciencia, a los Drs. Que han estado también a mi lado brindándome su apoyo y su amistad, su tiempo, su dinamismo y comprensión, GRACIAS Drs. Beatriz Arellano, Efrén Díaz, Lucy Favila, Gaby Palomares, Víctor Tenorio, Francisco Aguilar, Dionicio Córdoba, Enrique Herrera.*

*A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, España y a los doctores Jesús Salinas, Mary Carmen, Rosa Caro, Nieves Ortega, Paco cuello, por sus enseñanzas y apoyo en la realización del presente trabajo y gracias por su amistad y por cobijarme durante mi estancia en su país.*

*A la Dra. Cristina Rodríguez, por contribuir en la donación de la cepa *Salmonella choleraesuis*.*

*Y a las personas que me han dado el regalo más maravilloso que he recibido en la vida; a los Pbros. Agustín Reyes, Tonatiuh Montenegro, Daniel Navarrete, Pedro Reyes, Francisco Merino, Tomás Montesinos, Rubén Darío, Manuel, Juan, Josafat, Gustavo Mendieta y Oscar Camacho; a las Hnas. Laura y Gaby, y a todos aquellos que me han acercado a Dios. Gracias por ese regalo tan maravilloso y por su linda AMISTAD, son una bendición en mi vida.*

*A mis enanos Nabiky, Mougly, Katy, Negra, Tamarindo, Clavesina y Clavesin, Daisy, Apocalipto, Nacha, Isis, Osiris, Copo de Nieve, Rayita y a todos aquellos animalitos que contribuyeron con un poco de sí para mi formación profesional y en la realización de éste trabajo.*

*GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA HOY Y SIEMPRE*

*“JUNTO A TÍ, BAJO EL COBIJO DE TUS BRAZOS SE ENCUENTRA MI VIDA, Y ES ESTO, LO QUE ME DA FORTALEZA Y ME LLENA DE ALEGRÍA, LO QUE ME HACE SENTIR CAPAZ DE TODO. QUIZÁ EL PASO POR ESTE MUNDO, NO ES MÁS QUE UNA PERPETUA LUCHA POR LA SUPERVIVENCIA. SUPERVIVENCIA A LOS PROPIOS FRACASOS, A LOS AMORES, A LAS PÉRDIDAS, AL MIEDO A SER ARRASADOS POR LOS VOLCANES QUE SE DESATAN EN NUESTRO INTERIOR Y TENER LA VALENTÍA DE LEVANTARNOS PARA COMENZAR DE CERO. RECONSTRUIRNOS A NOSOTROS MISMOS UNA Y OTRA VEZ, FORTALECIÉNDONOS DESPUÉS DE CADA CAÍDA, DE CADA TRIUNFO, DE CADA DERROTA. SER MÁS FUERTES Y HÚMILDES, PARA CONVERTIRNOS EN INDIVIDUOS MÁS SABIOS, PERO CON LA CANDIDEZ DEL INGENUO QUE NO PIERDE LA CAPACIDAD DE ASOMBRO. PORQUE TODO SE PUEDE CUANDO SE PIERDE EL TEMOR A NO LOGRARLO Y SE DESCUBRE, COMO EN UNA REVELACIÓN QUE NO HAY PODER MÁS GRANDE QUE LAS GANAS DE VIVIR Y DE SABER QUE LA VOLUNTAD ES LA FUERZA MOTRIZ QUE TODO LO PUEDE”.*

**GRACIAS DIOS POR TODO**

## Resumen

MVZ Martínez Serrano María Guadalupe. **Desarrollo de una prueba de inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de la clamidiosis en caprinos.** Tutor principal: Dr. Efrén Díaz Aparicio. Comité Tutor. Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez y Dr. José Francisco Morales Álvarez. Proyecto financiado por proyecto SAGARPA-CONACYT 48599, “Estudio epidemiológico de enfermedades que afectan la producción caprina en México”.

*Chlamydia abortus* es una bacteria intracelular obligada que además de ser una zoonosis causa aborto en el último tercio de la gestación en cabras, ovejas y otros rumiantes; es exótica en México, por lo que el ingreso de estuches y antígenos comerciales para su diagnóstico se encuentra limitado. El objetivo de este estudio fue desarrollar un ELISA-I capaz de detectar la presencia de anticuerpos en animales infectados por *C.abortus* y a su vez compararla con un estuche comercial para diagnóstico de esta enfermedad. La bacteria se reactivó en embriones de pollo para posteriormente ser multiplicarla en cultivos celulares; la presencia de la bacteria tanto en embriones como en cultivos se comprobó con la tinción de Stamp y con las pruebas inmunológicas de dot blot e inmunofluorescencia directa. A partir de los cultivos infectados, se purificaron los cuerpos elementales por ultracentrifugación diferencial. El paquete celular obtenido tras este proceso, fue utilizado como antígeno para el desarrollo del ELISA-I; la concentración utilizada fue de 0.2 µg/µL; la dilución óptima de los sueros testigos fue de 1:50. El punto de corte se estableció sumando y restando una desviación estándar a los controles positivo y negativo respectivamente; siendo positivas las muestras con una D.O. superior a 0.741, negativas las inferiores a 0.695 y sospechosas las que estaban entre estos dos valores. La sensibilidad de la prueba fue del 75%, con una especificidad del 66.6%; el índice de concordancia entre el estuche comercial y el ELISA-I desarrollado fue de 0.4, valor que se considera como moderado; finalmente, la prueba tuvo una validez calculada del 70%. La ELISA-I aquí desarrollada, puede ser una alternativa que coadyuve a determinar el estatus de la enfermedad en el país y de este modo

establecer medidas de control o bien, medidas preventivas para evitar su propagación en el territorio nacional.

**Palabras clave: Clamidiosis caprina, *Chlamydia abortus*, ELISA-I.**

### Summary

Maria Guadalupe Martinez Serrano. **Development of an immunoassay enzyme test for the diagnosis of chlamydiosis in goats.** Thesis Director: Dr. Efren Diaz Aparicio. Tutor Committee. Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Jorge Luis Tórtora Perez and Dr. José Francisco Morales Alvarez. Project funded by SAGARPA-CONACYT project 48599, "Epidemiological study of diseases affecting goat production in Mexico".

*Chlamydia abortus* is an obligate intracellular bacterium that besides being a zoonosis causes abortion in the last third of gestation in goats, sheep and other ruminants. It is considered exotic in Mexico, so that the entry of kits and commercial antigens for diagnosis is limited. The aim of this study was to develop an ELISA-I capable of detecting the presence of antibodies in infected animals with *C.abortus* compared with a commercial kit for diagnosis of this disease. The bacterium was cultured in chicken embryos and then it was multiplied in cell culture, the presence of the bacterium in both embryos and cell cultures was verified by Stamp staining, and immunologic tests as dot blot as well as direct immunofluorescence. Elementary bodies were purified from the infected cultures by Differential centrifugation and ultracentrifugation. The cell pellet obtained after this process was used as antigen for the ELISA-I, the antigen concentration used was 0.2 µg / µl, the optimal dilution of control serum was 1:50. It was considerate; positive samples with an OD greater than 0.741, the negative below 0.695 and suspected sera between these two values. The test sensitivity was 75%, with a specificity of 66.6%, the rate of agreement between the commercial kit and ELISA-I developed was 0.4, which is considered as moderate and finally, the test had a

validity calculated 70%. The I-ELISA developed here may be an alternative that contributes to determine the status of the disease in the country and thus establishing control measures or preventive measures to prevent its spread throughout the country.

**Keywords:** caprine chlamydiosis, *Chlamydia abortus*, ELISA-I.

## 1 Introducción

### 1.1 Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes (generalidades)

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) provoca importantes pérdidas en muchas áreas del mundo dedicadas a la cría ovina y caprina, particularmente cuando los rebaños se juntan durante el periodo de partos. Es una enfermedad infecciosa causada por bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* que producen aborto en el último tercio de la gestación y que afecta principalmente a ovinos, caprinos, bovinos y humanos.<sup>1,2</sup>

Aunque la mayoría de los reportes sobre el AEPR están basados en ovejas, la enfermedad tiene un gran impacto económico y de salud pública en un gran número de explotaciones caprinas en el mundo.<sup>3</sup>

La clamidiosis o AEPR fue reportada por primera vez en Escocia en 1936 por Greig, denominándola Aborto Enzoótico Ovino (AEO), quien sugirió que los abortos eran resultado de factores medioambientales como deficiencias nutricionales de los animales las que impedían llevar a término la gestación; sin embargo, en 1950, Stamp *et. al.* demostraron que esta enfermedad era causada por un agente infeccioso perteneciente al grupo de “psitacosis – linfogranuloma venéreo” (psitacosis-LGV).<sup>1,4</sup>

Debido a su morfología e incapacidad de multiplicarse en medios inertes, durante éste periodo fue discutida la naturaleza de las clamidias, que hasta entonces habían sido consideradas como virus. Fue en 1966 cuando Page, determinó su naturaleza bacteriana y dos años más tarde Weiss las define como bacterias intracelulares obligadas.<sup>4,1</sup>

La clasificación de los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, se basa en el análisis filogenético de las secuencias 16S ARN-r, separando así, sus miembros de las demás bacterias. En 1999 Everett *et. al.* hicieron una nueva clasificación de la familia *Chlamydiaceae*, basándose en el análisis genético de las subunidades

16S y 23S del ARN-r; demostrando así, que dicha familia agrupaba dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila* y la existencia de nueve especies diferentes (Cuadro 1) confirmadas por análisis de fenotipo, antigenicidad, restricción de endonucleasas y un conjunto distintivo de rasgos de virulencia, por ejemplo, *C. pecorum* afecta principalmente a Bovinos, ovinos, caprinos, cerdos y coalas, siendo sus órganos diana cerebro, ojo, intestino, linfonodos, articulaciones, etc; mientras que *C. abortus* afecta principalmente a ovinos y caprinos y sus órganos blanco son intestino, placenta, bazo e hígado fetal.<sup>4, 5, 6</sup>

La notificación de un nuevo género para la familia *Chlamydiaceae* fue aceptada; sin embargo, la comunidad científica no ha adoptado de manera uniforme el uso del nuevo nombre; por ésta razón, en 2011, se retomó la clasificación inicial quedando nuevamente un solo género: *Chlamydia* con nueve especies establecidas.<sup>4, 6, 7</sup>



Cuadro 1. Taxonomía del orden de las <i>Chlamydiales</i> propuesta por Everett <i>et al.</i> (1999) comparada con la taxonomía clásica y con el reajuste de nomenclatura propuesto en 2011.						
ANTIGUA TAXONOMÍA			RECLASIFICACIÓN (Everett, <i>et al.</i> 1999)			Nueva clasificación (Krieg, <i>et al.</i> 2011, Manual Bergey's)
Orden	Familia	Género-Especie	Género	Especie	Hospedador	
<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydophila</i>	<i>abortus</i>	Rumiantes	<i>Chlamydia</i>
				<i>psittaci</i>	Aves	
				<i>felis</i>	Gato	
				<i>caviae</i>	Cobayas	
		<i>Chlamydia pecorum</i>		<i>pecorum</i>	Rumiantes	
		<i>Chlamydia pneumoniae</i>		<i>pneumoniae</i>	Humanos	
		<i>Chlamydia trachomatis</i>		<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i>	
		<i>suis</i>	Cerdos			
		<i>muridarum</i>	Ratones			
		<i>Parachlamydiaceae</i>		<i>acanthamoebae</i>		
	<i>Waddiaceae</i>		<i>chondrophila</i>			
	<i>Simkaniaceae</i>		<i>negevensis</i>			

Los miembros de la familia *Chlamydiaceae* producen infecciones oculares, pulmonares, genitales, articulares e intestinales tanto en aves como en humanos y otros mamíferos (Fig. 1); sin embargo, *Chlamydia abortus* y *C. psittaci* son las especies de mayor importancia debido a su alto potencial zoonótico.<sup>5</sup>

Aun cuando el AEPR no se describe con frecuencia en humanos, existe un riesgo considerable de infección en mujeres gestantes, asociado en la mayoría de los casos a un contacto directo con ovejas o cabras infectadas.<sup>8,9, 5</sup> Si el contagio se produce durante el primer tercio de la gestación sobreviene el aborto, mientras que si tiene lugar al final, puede producir septicemia y mortalidad perinatal<sup>10</sup> (Cuadro 2).



Figura 1. Patógenos de la familia *Chlamydiaceae* potencialmente zoonóticos.

## Cuadro 2. Familia *Chlamydiaceae*

Adaptado de Kerr *et al.*, 2005<sup>59</sup>

Especies	Hospedero	Enfermedad/Síntomas
<i>C. trachomatis</i>	Humanos	Conjuntivitis crónica (tracoma), enfermedades de transmisión sexual, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad
<i>C. muridarum</i>	Ratón, hamster	Infección en tractos respiratorio y genital
<i>C. suis</i>	Cerdos	Enfermedad intestinal, respiratoria y reproductiva
<i>C. pneumoniae</i>	Humanos	Neumonía, bronquitis, faringitis, se le relaciona con aterosclerosis, artritis reactiva y asma
<i>C. psittaci</i>	Aves silvestres y de corral	Enfermedad respiratoria (zoonosis)
<i>C. abortus</i>	Rumiantes y cerdos	Aborto (zoonosis)
<i>C. pecorum</i>	Rumiantes y cerdos	Enfermedad entérica, neumonía, conjuntivitis, poliartritis, metritis y encefalomiелitis
<i>C. felis</i>	Gatos	Conjuntivitis (probable zoonosis)
<i>C. caviae</i>	Cerdo de guinea	Infección ocular y en tracto genital

### 1.1.1 Antecedentes

En 1936, Greig, describe por primera vez el aborto clamidial, denominándolo aborto enzoótico ovino. La enfermedad fue asociada a deficiencias nutricionales en los animales y a factores medioambientales. Sin embargo, en 1950, Stamp *et*

*al.* demostraron que la enfermedad era ocasionada por un agente infeccioso perteneciente al grupo “psitacosis - linfogranuloma venéreo”.<sup>4</sup> En Alemania en 1959, se informó por primera vez sobre abortos por *Chlamydia*; después, la enfermedad fue diagnosticada en Bulgaria, España, USA, Francia, India, Japón, Reino Unido, Chad, Grecia y Túnez. Con excepción de Australia y Nueva Zelanda en muchas partes del mundo el AEPR es la segunda causa de abortos infecciosos después de brucelosis y la principal en países donde la brucelosis está controlada o erradicada.<sup>3, 8, 10, 11, 12</sup>

En México, el AEPR se encuentra clasificado dentro del grupo 1 de enfermedades exóticas de la ganadería nacional de notificación obligatoria (DOF, 05 marzo 1999)<sup>13</sup>; sin embargo, existen evidencias serológicas y de aislamiento (1997) que indican la presencia de la enfermedad en el territorio nacional y el riesgo de ingreso al país es muy alto debido a la importación de ganado.<sup>14</sup>

En 2005, se realizaron estudios de ésta enfermedad en rebaños caprinos, demostrando la presencia de la bacteria en el estado de Michoacán a partir de una muestra de heces.<sup>15</sup> En 2008, se hizo un estudio serológico en rebaños caprinos lecheros de seis estados del país, encontrando anticuerpos contra el agente;<sup>16</sup> en 2010, nuestro grupo de investigación determinó también la presencia de anticuerpos en cabras del Estado de Guanajuato y el aislamiento del microorganismo se confirmó con la prueba de PCR a partir de hisopos vaginales;<sup>17</sup> en 2011, Soriano *et. al.* identificaron mediante inmunofluorescencia, la presencia de *C. abortus* en un aborto ovino procedente de Amoloya de Juárez, México, mismo que fue confirmado con una PCR.<sup>18</sup>

## **1.2 Etiología**

*Chlamydia abortus* es el agente etiológico del AEPR, es una bacteria pequeña que tiene una pared celular con características similares a la pared de las Gram negativas; sin embargo, carecen de la presencia de una capa rígida de

péptidoglicano, probablemente como consecuencia de la adaptación al medio intracelular; aunque se ha descrito la presencia de ácido murámico,<sup>19</sup> (Cuadro 3). A causa de su aparente inhabilidad para producir ATP, estos microorganismos dependen del metabolismo de las células hospederas para su multiplicación, privándolas de nutrientes y fuentes de energía, por esta razón, *C. abortus* necesariamente crece en el citoplasma de las células eucariotas en un ciclo de desarrollo único en donde una forma infecciosa resistente, los cuerpos elementales (CE), se alterna con una forma metabólicamente activa no infecciosa, los cuerpos reticulares (CR)<sup>19, 20, 21</sup>

### **1.2.1 Cuerpos elementales**

Los CE son la forma infecciosa de *C. abortus*, son electro-densos, miden entre 0.2 – 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro y están rodeados por una doble envoltura trilaminar: membrana interna o citoplasmática y membrana externa, que es propiamente la pared celular bacteriana que se caracteriza por tener gran cantidad de proteínas ricas en aminoácidos azufrados, tal es el caso de la proteína principal de membrana externa (MOMP) y las proteínas de membrana externa 2 y 3 (Omp2 y Omp3 respectivamente) formadas por una fuerte unión de puentes disulfuro que le dan rigidez y escasa permeabilidad.<sup>5, 19, 22, 23</sup> Los CE son muy resistentes a las condiciones ambientales estando fuera de la célula del hospedero; además, cuando se encuentran en el medio extracelular, son metabólicamente inactivos, lo que les facilita se transmitan de célula a célula y de hospedero a hospedero; de tal forma que al ingresar nuevamente a una eucariota, inician inmediatamente su síntesis de RNA y de proteínas.<sup>19, 23, 24, 25</sup>

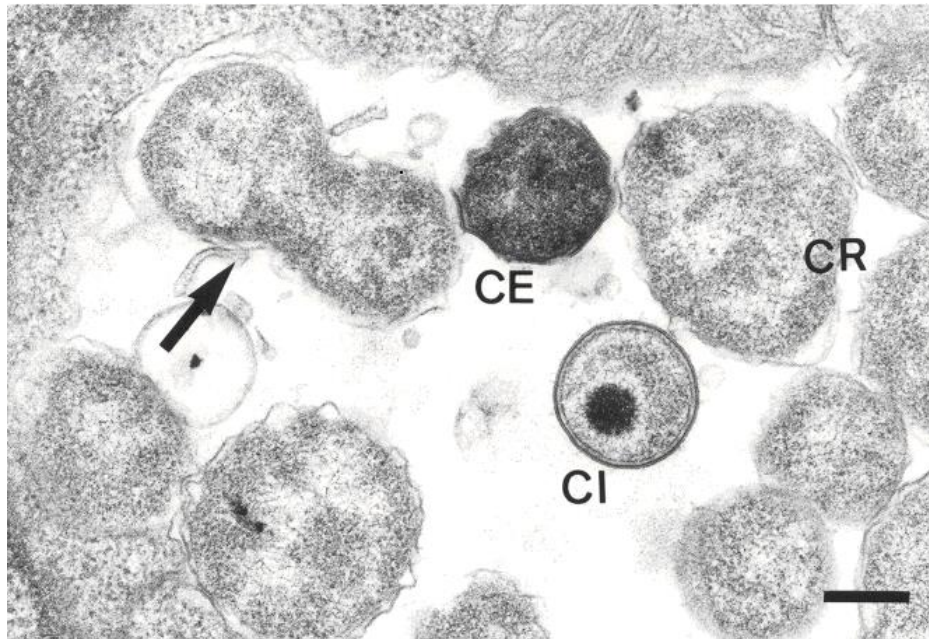
<b>Cuadro 3. Componentes de la pared celular clamidial que interactúan con la célula hospedera. Escalante, <i>et al.</i> 1998</b>		
<b>Componente de la pared celular</b>	<b>Función</b>	<b>Efecto</b>
<b>Lipopolisacárido (LPS)</b>	Estimula la fagocitosis celular, disminuye el flujo en la membrana celular	perturba la respuesta inmune mediada
<b>Proyecciones de los RB</b>	Perforación de la membrana de la inclusión clamidial	Facilita la adquisición de nutrientes
<b>Proteínas ricas en cisteína (CRP):</b>		
<b>a) Proteína Principal de Membrana Externa (MOMP)</b>	Porina	Difusión pasiva de compuestos hidrofílicos dentro de la bacteria
<b>b) CRP pequeña o EnvA</b>	Adhesina, lipoproteína	Adhesión y entrada a la célula hospedera
<b>c) CRP grande o EnvB</b>	Proteína principal estructural	Función equivalente a la del péptidoglicano

### 1.2.2 Cuerpos reticulares

Los CR miden entre 0.5 - 1.3  $\mu\text{m}$  de diámetro, obtienen nutrientes e la célula hospedadora y son la forma metabólicamente activa no infecciosa que se multiplica por fisión binaria dentro de la célula; <sup>5, 22,23, 4</sup>

En comparación con el CE, su pared es más fina y frágil, tiene una membrana citoplasmática mal definida. Su interior es de aspecto granular y con mayor número de ribosomas presentes. Se ha demostrado que los CR pueden sintetizar en forma independiente ciertas proteínas de la célula hospedadora e incluso fuera de la célula, si se les asegura un aporte adecuado de ATP exógeno. <sup>25, 26</sup>

Entre los CE y CR, aparecen unas estructuras denominadas corpúsculos intermedios (CI) que constituyen tanto morfológica como estructuralmente una etapa de transición en la condensación del CR para originar el CE. <sup>8, 4</sup> (Fig. 2).



**Figura 2. Fotografía electrónica de las diferentes formas evolutivas clamidiales.** Cuerpo elemental (CE), cuerpo intermedio (CI) y cuerpos reticulares (CR), uno de ellos en fisión binaria (flecha). Barra: 0,25  $\mu\text{m}$ . Tomado de Nieves, 2005.

### 1.2.3 Ciclo de desarrollo

El ciclo evolutivo de las clamidias inicia cuando la forma extracelular del microorganismo, el CE, infecta a una célula susceptible induciendo su propia internación por endocitosis. La familia de las *Chlamydiaceae* presenta un ciclo de desarrollo único, bifásico que dura entre 48 y 72 horas aproximadamente y consta de cinco etapas, dando inicio cuando los CE se adhieren a las células epiteliales<sup>4, 27, 28</sup> y continuando con los pasos que a continuación se describen:

- 1) Penetración de la forma infecciosa o cuerpo elemental en la célula hospedera, con la inmediata transformación en la forma metabólicamente activa o cuerpo reticular.
- 2) Multiplicación por fisión binaria del CR para dar lugar a una microcolonia o inclusión citoplasmática.
- 3) Conversión de los CR en CE, seguida de la liberación bacteriana mediante lisis o por exocitosis.<sup>4, 25,</sup>

Además del ciclo de desarrollo típico con sus dos fases, una de cuerpos elementales y otra de cuerpos reticulares, se ha descrito también una tercer forma persistente *in vitro* (en cultivo celular), donde los cuerpos reticulares tras diversos estímulos son capaces de mantenerse por más tiempo dentro de la célula hospedera; estas estructuras son conocidas como “formas aberrantes o de persistencia”.<sup>4, 25, 27, 28</sup> (Fig. 3).



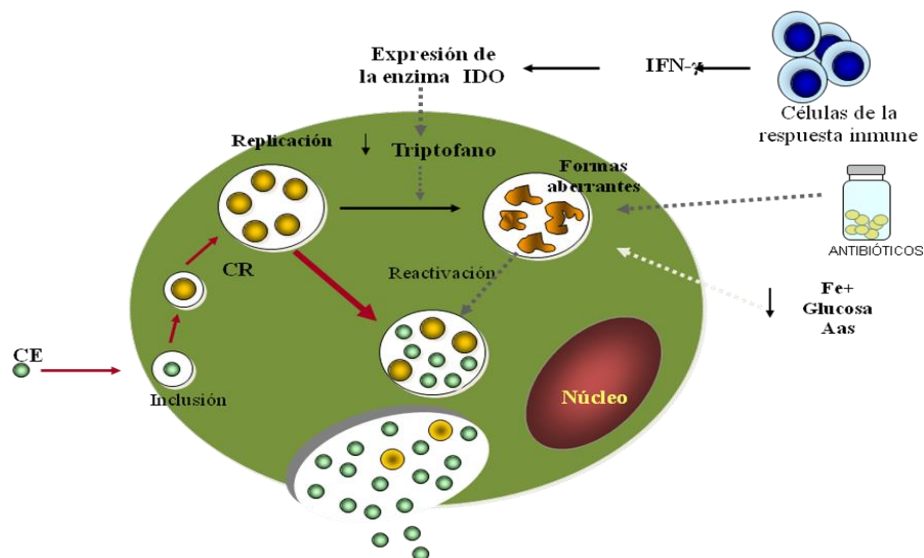


Figura 3. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia* spp. Tomado de Martínez, 2006.

#### 1.2.4 Establecimiento de *C. abortus* al interior de la célula hospedera

En el ciclo evolutivo de las clamidias, las formas infecciosas o CE, son los que tras adherirse a la célula hospedera, ingresan en una vacuola cuya pared parece originarse por una invaginación de la célula citoplasmática, esta vesícula formada retrasa su maduración, manteniéndose en etapas tempranas de la vía endocítica, evitando de este modo la fusión con los lisosomas, <sup>20, 21</sup> lo que les da la característica propia de los microorganismos intracelulares obligados, es decir, tienen la capacidad de promover su propia ingestión por los fagocitos no profesionales, permitiéndoles mantenerse al interior de las células y evitar así la interacción con las defensas del hospedero.<sup>23</sup> Se ha sugerido que el responsable de la inhibición de esta fusión es un factor termolábil, presente exclusivamente en la superficie de los cuerpos elementales;<sup>29</sup> este proceso resulta diferente cuando se trata de un macrófago infectado, pues las vesículas infectadas forman parte del sistema endosómico. En cuanto a los polimorfonucleares (PMN) sí se ha demostrado la presencia de fagolisosomas; sin embargo, la mayor parte de las bacterias son capaces de evadir la acción de los PMN al introducirse de manera inmediata en otras células, quedando limitada su acción a las primeras fases de la

infección; incluso, se les considera incapaces de resolver la infección por sí solas.<sup>4</sup>

Además de este ciclo de desarrollo típico, existe una tercer forma persistente que ha sido estudiada *in vitro*, donde se ha inducido mediante una gran variedad de estímulos una forma aberrante de los cuerpos reticulares, tal es el caso de la presencia de INF- $\gamma$  y antibióticos en el medio o bien de la privación de nutrientes en el mismo, lo que puede alterar el crecimiento de las clamidias y facilitar de este modo una infección crónica o persistente, particularmente cuando se estimula la producción de INF- $\gamma$ .<sup>25</sup>

### **1.3 Estructura antigénica**

Los agentes pertenecientes al orden de las *Chlamydiales*, comprenden un gran número de microorganismos relacionados tanto estructural como antigénicamente.<sup>30</sup>

Los antígenos presentes en las bacterias de la familia *Chlamydiaceae*, son complejos y sólo parcialmente conocidos. Se localizan en la pared celular y se han agrupado de acuerdo a su naturaleza en antígenos glicolipídicos y antígenos proteicos<sup>4, 30, 31</sup> (Fig. 4).

#### **1.3.1 Antígenos glicolipídicos**

##### **1.3.1.1 Lipopolisacárido**

De acuerdo a su estructura química, el Lipopolisacárido (LPS) se encuentra localizado en la membrana externa, es el segundo antígeno de mayor importancia y se compone de un glicolípido que es compartido por todas las especies de clamidias; por lo tanto, constituye un epítipo específico de género.<sup>19</sup> Su presencia se ha demostrado mediante las pruebas de fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA.<sup>31</sup>

El LPS clamidial es estable al calor; se le considera como un epítipo específico de grupo con estructuras parecidas a las encontradas en bacterias Gram negativas y está formado por tres componentes principales: una porción lipídica (Lípido A), un núcleo oligosacárido compuesto de heptulosa, glucosa, galactosa, glucosamina y ácido ceto-3-desoxi-2octulosónico (KDO) y una parte final polisacárida denominada antígeno “O” muy variable.<sup>29</sup> Salinas *et. al.* (1994) caracterizaron la localización y distribución de los epítipos de LPS de la cepa AB7 de *C. abortus*, localizándolos en la zona externa de los CR e interna de los CE; esta localización, distinta a la descrita para el género *Brucella*, explicaría la falta de eficacia protectora de los anticuerpos (Ac) dirigidos contra el LPS de *C. abortus*.<sup>29, 32</sup>

#### **1.3.1.2 Glicolípido soluble**

Es un antígeno específico de género, de naturaleza glicolipídica conocido como GLXA o “exoantígeno glicolipídico”. Stuart *et. al.*, lo aislaron en 1987 a partir de sobrenadantes de cultivos infectados por *Chlamydia trachomatis*, demostrando así, que es un glicolípido secretado durante el ciclo infectivo, puede ser hidrolizado y fraccionado en componentes polisacáridos y lipídicos, ambas fracciones le confieren una actividad antigénica; sin embargo, en sus análisis fisicoquímicos y estructurales, se le atribuyeron características bioquímicas, inmunológicas y de composición que la hacen marcadamente diferente al LPS, ya que no posee KDO ni los ácidos grasos asociados al lípido A.<sup>19, 33, 34, 35</sup>

Actualmente se ha demostrado que el GLXA clamidial, se encuentra tanto en la membrana de los CE como en la membrana de la inclusión intracelular formada por los CR; también se comprobado su presencia durante la mitad y fin del ciclo infectivo, así como en el citoplasma de la célula huésped; todo esto, le ha conferido importancia en el inicio de la infección clamidial.<sup>35, 36</sup>

## 1.3.2 Antígenos Proteicos

### 1.3.2.1 Proteínas de la membrana externa

#### 1.3.2.1.1 Proteína principal de la membrana externa (MOMP)

Se han estudiado extensamente dos antígenos principales: uno de ellos, el mejor caracterizado en las especies de *Chlamydia*, es la proteína principal de membrana externa (MOMP), se encuentra en mayor proporción (60%) tanto en los cuerpos elementales como en los reticulares; su peso varía entre 38 y 43 kDa y tiene funciones de porina. Esta proteína es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies. También se le ha implicado en la entrada de las clamidias a las células hospederas, ya que promueve las interacciones electrostáticas no específicas con la célula, así como las interacciones hidrofóbicas específicas, actuando también como adhesina.<sup>23, 28, 31</sup> La MOMP, al igual que el resto de las proteínas principales de la membrana externa de las Gram negativas, se caracteriza también por ser insoluble al sarcosil, detergente no iónico que solubiliza la membrana plasmática y el citoplasma de las bacterias, dejando un resto insoluble denominado COMP (complejo de la membrana externa).<sup>4, 29</sup>

#### 1.3.2.1.2 Proteína polimórfica de la membrana externa (POMP)

El segundo antígeno es la proteína polimórfica de membrana externa (POMP), que se expresa con masas moleculares entre 85, 90 y 105 kDa. Su superficialidad e inmunogenicidad justifican el interés por estas proteínas. Son ricas en serina y fenilalanina; son polimórficas debido a que sus genes sufren mutaciones que originan variaciones en su estructura.

Actúan como citolisinas, que contribuyen a la rotura de la célula hospedadora y a la salida del cuerpo elemental.<sup>28, 31</sup>

La expresión de las POMP no está limitada a *C. abortus*, ya que los genes que la codifican han sido identificados en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*; <sup>37, 38</sup> su síntesis se lleva a cabo en las últimas fases del ciclo de desarrollo de las bacterias de la familia *Chlamydiaceae*, al mismo tiempo que las proteínas periplásmicas ricas en cisteína. <sup>4, 29</sup>

Inmunológicamente, la variación en la expresión de las POMP, puede desempeñar un papel en la evasión de la respuesta inmune al momento de su ingreso a la célula hospedadora. Las proteínas polimórficas, pueden inducir respuestas de tipo celular y humoral, ambas específicas, haciéndolas de este modo, potenciales candidatas como antígenos para vacunas, por otra parte, debido a su especificidad y a la fuerte reacción que contra estas proteínas muestran los sueros policlonales de ovejas infectadas experimental o naturalmente con *C. abortus*, se han usado como antígeno de diagnóstico para diferenciar aquellas infecciones provocadas por *C. abortus* de las provocadas por *C. pecorum* en rumiantes. <sup>31, 29,</sup>

39

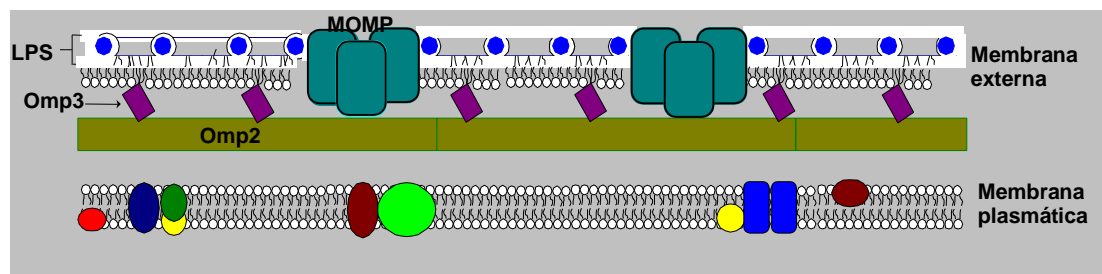


Figura 4. Representación esquemática de la membrana externa clamidial, mostrando la localización de las tres principales proteínas: MOMP, Omp2 y Omp3. Adaptado de Hatch (1996)<sup>40</sup>.

### 1.3.2.1.3 Omp 2

Otro tipo de proteínas antigénicas identificadas utilizando suero de ratones infectados son las conocidas como “pequeñas” y “grandes” proteínas ricas en cisteína de 12 y 60 kDa, respectivamente. <sup>28, 41</sup>

Las Omp 2, también son conocidas como “EnvB” o “Large CRP” (proteína grande rica en cisteína); forma parte del “COMC” en una proporción de 1:5 respecto de la MOMP. Es codificada por el gen *omp2* y su transcripción depende del ciclo de desarrollo de las bacterias, ya que tiene lugar en el momento de la condensación de los CR en CE.<sup>29</sup> Tiene dos cualidades principales; por una parte su elevado contenido en aminoácidos azufrados, su transcripción es conjunta con la otra proteína rica en cisteína (Omp 3) y por estar únicamente en los cuerpos elementales se le confiere una función estructural. Es una proteína muy inmunogénica, tanto en *C. trachomatis* como en *C. psittaci*; es sensible a la tripsina y es capaz de unirse a las células epiteliales, lo que hace suponer que se encuentra expuesta en la superficie de la bacteria; por lo que se piensa que puede actuar como adhesina.<sup>29, 41</sup>

#### **1.3.2.1.4 Omp 3**

Pertenece al grupo de las proteínas “pequeñas” ricas en cisteína y se le conoce también como EnvA o “Small CRP” (proteína menor, rica en cisteína); es el tercer componente de la COMC; pesa 12 kDa y el gen que la codifica es el *omp3*, que al igual que el gen *omp2*, transcribe durante la condensación de los CR a CE.<sup>4, 41</sup>

#### **1.3.2.1.5 Proteínas del proceso celular**

##### **1.3.2.1.5.1 Proteínas de inclusión (*Inc*)**

Se encuentran en la membrana de los cuerpos de inclusión de las bacterias pertenecientes al orden *Chlamydiales*. Posee cada una de ellas un dominio hidrofóbico único de 50 a 80 aminoácidos. Constituyen una familia de proteínas que tienen un importante papel en la infección, el crecimiento y la supervivencia en la célula. Su principal función es la evasión del sistema inmune, se les ha relacionado con el desarrollo de la inclusión, la adquisición de nutrientes e incluso se les ha asociado en los procesos de transición de cuerpos reticulares a elementales y viceversa.<sup>4</sup>

### 1.3.2.1.5.2 Chaperonas o proteínas de choque térmico (HSP)

Sus siglas provienen del inglés *Heat shock proteins*, se encuentran en todos los organismos y aparecen, principalmente en respuesta a un incremento de la temperatura.<sup>42</sup>

Fueron descubiertas en 1962 por Ritossa *et. al.* y aisladas en 1974 por Tissieres y *et. al.*; las HSP, fueron descritas como un grupo de proteínas altamente conservadas e involucradas en la homeostasis celular por mostrar los efectos citoprotectores en diferentes formas de estrés. Se les atribuye el papel de chaperonas moleculares y actúan tanto en el plegado y en la agregación de proteínas, así como en el ensamblaje de las mismas; en el transporte intracelular y la degradación de sustancias dañadas; además, tienen un papel protector en la lesión de isquemia/perfusión mediante la reparación de proteínas dañadas, eliminando de éste modo el estímulo para la apoptosis. Las proteínas de choque térmico se encuentran numeradas en base a su masa molecular aproximada en kDa<sup>42, 43, 44</sup> y se clasifican en cuatro familias: HSP 27, HSP 60, HSP 70 y HSP 90 kDa. La familia más estudiada dentro de las especies clamidiales es la HSP 70 o Dnak-like, con un peso molecular de 75 kDa, localizada en la membrana externa de los CE, por lo que se le atribuye un papel mediador en la adhesión de *C. trachomatis* a la célula hospedadora; papel que aún no ha sido comprobado en las demás especies; sin embargo, sí se ha demostrado que estas proteínas son capaces de inducir una respuesta inmune humoral frente a la infección clamidial tanto en el humano como en la oveja.<sup>4, 29</sup> La HSP 60 ó Gro-EL-like de *Chlamydia pneumoniae*, tiene un peso de 58 kDa y parece estar implicada en los daños ocasionados en las arterias de los sujetos infectados debido a la hiperestimulación de autoanticuerpos, por lo que se le relaciona con la arterioesclerosis, por inducir un ataque a la pared endotelial, mediante una reacción de hipersensibilidad retardada, propia de las infecciones crónicas. Por otra parte, la HSP 70, se

encuentra presente de forma temprana en la infección y tiene un importante papel en el transporte de proteínas a través de las membranas. <sup>28, 31, 29</sup>

### **1.3.2.1.5.3 Sistema de secreción tipo III (TTSS)**

El sistema de secreción tipo III (T3SS ó TTSS) se considera como uno de los principales factores de virulencia de las bacterias Gram negativas y actualmente, ha surgido como un mecanismo capaz de promover la virulencia clamidial. La presencia de esta estructura es esencial para el desarrollo de una infección aguda, mientras que la cronicidad de la infección depende fundamentalmente de su funcionamiento. <sup>45</sup> La secreción de tipo III, es el proceso principal por el cual las bacterias translocan sus proteínas efectoras de la membrana de inclusión hacia el interior del citoplasma de la célula hospedera, <sup>46, 47</sup> por lo que el TTSS es requerido en cada fase del ciclo de vida de clamidia, ya que ofrece la posibilidad de su multiplicación intracelular. <sup>45</sup>

Ha sido bien establecida la capacidad de las clamidias para secretar proteínas efectoras por el sistema de secreción tipo III y manipular la actina en las etapas tempranas de la infección. La proteína efectora CT456 (TARP) es secretada durante la entrada de las bacterias a la célula hospedera, iniciando la polimerización de actina; este fenómeno se ha reportado en la etapa inicial de la infección, sin embargo, se cree que no desempeña un papel importante en los reordenamientos de actina que median la extrusión que se produce casi 40 horas más tarde. <sup>48</sup> Los principales efectores reportados para *Chlamydia spp.* son CrpA, que activa los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y confiere una protección parcial en ratones infectados con *C. trachomatis*. Otra proteína es la CPAF (*Chlamydial Protease-like Activity Factor*) secretada al interior de la célula hospedadora y que puede degradar factores implicados en la transcripción, necesarios para la presentación de los antígenos por parte del complejo principal de histocompatibilidad tipo I (CMG I) y tipo II (CMH II), lo que interfiere en la habilidad del hospedador a la hora



de responder frente a la infección clamidial, otras proteínas reportadas son CADD, CT847, tarp, IncA, IncG, CT229, CT813, Cpn0585, Cpn0909 y Cpn1020. <sup>29, 39</sup>

## **1.4 Inmunidad frente a las bacterias intracelulares**

### **1.4.1 Generalidades**

Algunas bacterias, sobreviven y se multiplican dentro de las células del hospedador, tal es el caso de algunos microorganismos como *Chlamydia spp.*, que es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de fagocitos no profesionales como las células endoteliales, esto debido a la presencia de moléculas de invasión que les facilitan su entrada a estas células donde les es más fácil sobrevivir: ya que estas bacterias se encuentran en un lugar inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunes distintos a los establecidos para las bacterias extracelulares; sin embargo, el sistema inmunitario del hospedador, debe intentar destruirlas, por lo que el éxito o fracaso de la infección, dependerá de la eficiencia de la respuesta inmune del individuo afectado. <sup>49</sup>

La protección contra este tipo de infecciones se lleva a cabo por la activación de macrófagos, después de la activación de células Th1. Aunque los macrófagos de los animales no inmunizados suelen ser incapaces de destruir a estos microorganismos, adquieren esta capacidad unos 10 días después de establecida la infección. Esta activación es inducida por células Th1 y citocinas como el IFN- $\gamma$  y la IL-2. El IFN- $\gamma$  es el activador más poderoso de macrófagos, y su eficacia aumenta cuando se combina por contacto con algunos productos microbianos como endotoxinas, dipéptido de muramilo y carbohidratos de la pared celular (glucanos y mananos). La IL-2 también puede activar a los macrófagos; la activación a través de esta interleucina es suprimida por IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-4. Por el contrario, la activación de macrófagos por INF- $\gamma$  aumenta con las células Th1 y NK y se suprime con las Th2. <sup>50</sup>

Para la eliminación de microorganismos intracelulares, particularmente de la familia *Chlamydiaceae*, es necesaria una respuesta inmune que se caracteriza por el establecimiento de una potente respuesta Th1 que conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias, especialmente IFN- $\gamma$  y la activación de linfocitos T.<sup>25, 50, 51</sup>

Las células T, juegan un papel crítico en la inmunidad protectora contra la infección clamidial y diversos estudios han demostrado que la infección por *Chlamydia spp.* no se resuelve en ausencia de células T; sin embargo, mientras que la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> resulta esencial en la resolución de la infección de otras especies de la familia *Chlamydiaceae*, para el caso de *C. abortus*, esta población, si bien es importante en la resolución de la infección, lo es en menor grado que la población CD8<sup>+</sup>, que resultan esenciales para la eliminación del microorganismo en una infección primaria.<sup>51, 52, 53</sup> (Fig. 5).

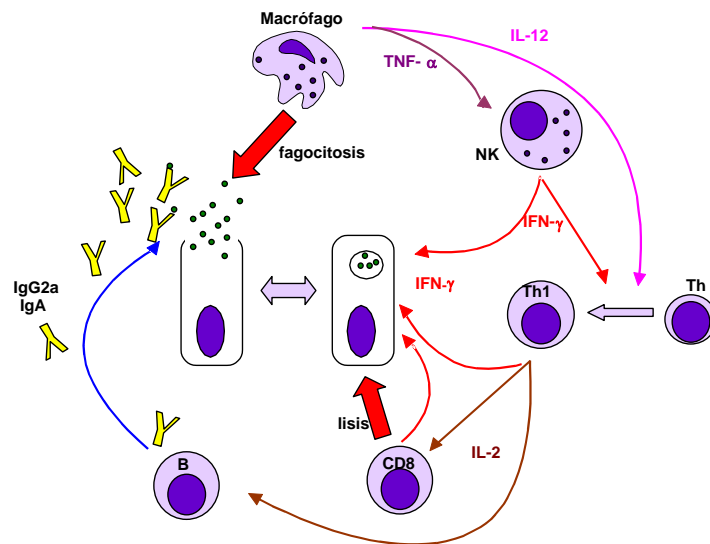


Fig. 5. Esquema de la respuesta inmune Th1 contra *C. abortus*. Adaptado de Rank y Bavoiil (1996).<sup>54</sup>

### 1.4.2 Respuesta inmune temprana o innata

El sistema inmune innato se caracteriza por actuar como la primera barrera frente a agentes extraños. Diversos estudios han demostrado que en una infección primaria contra *C. abortus*, actúan principalmente los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), que impiden la multiplicación incontrolada de bacterias en órganos “diana”, como hígado y bazo. Estas células se han descrito como necesarias para el reclutamiento adecuado de células TCD8<sup>+</sup> en los focos inflamatorios, siendo necesarias en la resolución de la infección por *C. abortus*. Otras células importantes en la respuesta inmune innata, son las células “asesinas naturales” (NK) que juegan también un papel importante en la resolución de infecciones por microorganismos intracelulares. Se sabe que la presencia de células NK en los focos inflamatorios, es crítica para la resolución de la infección primaria por *C. abortus*.<sup>55, 56</sup> Otro tipo de células presentes en sitios de infección son macrófagos y linfocitos T gamma/delta (T  $\gamma/\delta$ ), que actúan como puente intermedio entre la respuesta inmune específica e inespecífica y en menor proporción las células B; además, las células epiteliales producen diversos mediadores pro-inflamatorios como CCL5, CXCL16, CXCL10, CXCL 1 $\alpha$ , IL 8, IL-12, IL-6, GM-CSF (factor estimulante de granulocitos y macrófagos) y factor de necrosis tumoral (TNF), que inducen y aumentan la respuesta inflamatoria celular, estimulando el daño directo a los tejidos y produciendo un aumento en la expresión de moléculas de adhesión endotelial, que ayudan a la atracción de células inmunes.<sup>25, 29, 56</sup>

### 1.4.3 Respuesta inmune específica o adquirida

El sistema inmune adquirido o adaptativo, es un sistema específico que se desarrolla después del primer contacto con un patógeno y su capacidad e intensidad defensiva aumenta después de cada exposición subsiguiente a un determinado microorganismo. Se le divide en inmunidad celular e inmunidad humoral y se caracteriza por su diversidad, ya que responde a una gran variedad

de antígenos extraños; por su especificidad pues cada microorganismo genera una respuesta específica; por establecer memoria, lo que la hace más rápida y eficiente; finalmente por la ausencia de autoreactividad, ya que brinda al organismo la capacidad de diferenciar entre lo propio y lo extraño (esta propiedad, la comparte con la inmunidad innata).<sup>49, 56</sup>

Sus principales componentes son los linfocitos, tanto B, como T alfa/beta (T $\alpha$ / $\beta$ ), de los que se diferencian dos subpoblaciones: linfocitos T colaboradores, que presentan en su membrana el grupo o “Cluster” de diferenciación 4 (CD4) y los linfocitos T citotóxicos, que presentan en su membrana el “Cluster” de diferenciación 8 (CD8).<sup>29</sup>

Por otra parte, los macrófagos y las células dendríticas son capaces de expresar en su superficie antígenos unidos al complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC) y servir como células presentadoras de antígeno (APC), mismas que resultan importantes en la activación del sistema inmune adaptativo.<sup>56</sup>

#### **1.4.4 Respuesta humoral**

Los principales componentes en la infección por clamidia, que inducen la aparición de la respuesta inmune humoral, son el LPS y la MOMP (*Omp 1*). Ambas sustancias inducen la aparición de anticuerpos neutralizantes, de los cuales, algunos bloquearán el efecto tóxico del LPS y otros, la adhesión de la bacteria a su célula blanco (anticuerpos anti MOMP). El LPS, es considerado como un antígeno tóxico debido a que induce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF, también se le considera como timoindependiente, pues estimula directamente a los linfocitos B, induciendo su diferenciación y producción de anticuerpos.<sup>56, 57</sup>

### 1.4.5 Respuesta celular

Las respuestas de tipo Th1 (producción de IFN- $\gamma$ ), juegan un papel importante en la resolución de la infección por clamidias, además, estudios en modelos murinos, apoyan la hipótesis de que estas células se encuentran involucradas en la protección contra la enfermedad; mientras que la respuesta Th2, relacionada en la inmunidad humoral, participan de forma crucial en la persistencia de la enfermedad.<sup>49, 56</sup> Una vez que las células presentadoras de antígeno han reconocido y procesado a las clamidias, lo presentan a las células CD4+, que se activan y estimulan la respuesta inmune Th1, en esta respuesta los linfocitos CD8+ son capaces de lisar específicamente células infectadas.<sup>8</sup> La producción de IFN- $\gamma$  por las células NK, favorece la activación de las células CD4+, facilitando de este modo la protección de la infección y se cree que puede inhibir la multiplicación intracelular de las clamidias, induciendo, posiblemente una infección persistente. Las células NK, constituyen una importante fuente de IFN- $\gamma$  durante las infecciones virales y bacterianas y tienen una función citotóxica contra las células infectadas.<sup>58</sup> Se ha demostrado también, que la presencia de IFN- $\gamma$ , puede retrasar el ciclo de *Chlamydia spp.* de modo que los cuerpos reticulados permanecen por más tiempo, resultando así en una infección persistente e inaparente.<sup>49, 56</sup>

### 1.5 Inmunopatología de la infección por clamidias

Las bacterias de la familia *Chlamydiae* comprenden un grupo diverso de organismos e infectan gran variedad de hospederos, causando un amplio número de enfermedades,<sup>59</sup> además de tener el potencial para establecer infecciones persistentes por periodos prolongados, a menudo sin signos evidentes de enfermedad y sin inducir respuesta inmune protectora; sin embargo las infecciones crónicas pueden estimular el sistema inmune del hospedero.<sup>60, 21</sup>

En rebaños infectados, los animales se contagian mediante la ingestión de cuerpos elementales contenidos en secreciones vaginales y membranas placentarias al momento del parto o del aborto, o bien, a través de aerosoles; es importante señalar que la permanencia del microorganismo en el medio se debe principalmente a la rigidez de la envoltura celular, que a su vez es estable y permeable osmóticamente, lo que facilita que los CE permanezcan viables en el medio ambiente durante varios días. Algunos estudios, demuestran la susceptibilidad del epitelio vaginal a la infección experimental con *C. abortus*, lo que sugiere que la transmisión venérea es posible. Por último, la infección directa del feto a través de la placenta se considera una vía de transmisión.<sup>25, 59, 61</sup>

Una vez que la bacteria ingresa al organismo, el principal sitio de infección y multiplicación son las tonsilas; también pueden alojarse en epitelio intestinal causando una infección subclínica y a partir de estos sitios se diseminan por sangre o linfa, ocasionando una primera clamidemia, a órganos de colonización secundaria como hígado, bazo y pulmón, en donde permanecen en estado latente.<sup>16, 59, 62</sup>

Se ha reportado que tanto ovejas como cabras, pueden excretar *C. abortus* hasta dos semanas después de un aborto y que los CE pueden seguir siendo infecciosos durante varias semanas a partir de este momento, situación que aumenta la propagación del microorganismo.<sup>25</sup>

Una vez establecida la infección, *C. abortus* no puede ser detectada sino hasta el día 90 de la siguiente gestación, que es cuando el microorganismo invade la placenta. Cuando una oveja no está gestante y es infectada, se establece una infección persistente bajo el control de IFN- $\gamma$  hasta que en algún momento, durante la futura gestación la infección se reactiva, es entonces cuando el microorganismo invade la placenta y se multiplica en ella provocando una placentitis;<sup>63</sup> además, *C. abortus*, se replica en las células trofoblásticas, lo que

conduce a su destrucción y al estímulo de una respuesta inflamatoria.<sup>28</sup> Los cambios fisiológicos que se producen durante la gestación, inducen una segunda clamidemia y a partir de los órganos de colonización secundaria, el microorganismo llega a células epiteliales del trofoblasto, extendiéndose la infección a cotiledones y espacios intercotiledonarios entre los días 40 y 50 de gestación, resultando en daño epitelial, edema e inflamación;<sup>25, 28, 60, 62</sup> esta inflamación es el resultado de la infiltración de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas; sin embargo, no todos los placentomas se infectan y el nivel de inflamación y necrosis en los cotiledones y las membranas es variable.<sup>59</sup> Entre los días 60 y 90, el daño causado por *C. abortus* en los placentomas compromete el intercambio materno-fetal de nutrientes y oxígeno, lo que contribuye a la muerte del feto y al aborto en las últimas dos o tres semanas de gestación o bien, al nacimiento de crías débiles que mueren en los primeros días de vida.<sup>25, 28, 59, 60, 62</sup> Las lesiones fetales incluyen, necrosis focal en hígado y pequeños focos de necrosis en pulmón, bazo, cerebro y linfonodos.<sup>59</sup> La presencia de anticuerpos en sangre de corderos recién nacidos, antes de la ingestión del calostro, es indicativa de infección intrauterina. Marques *et. al.* (2010) demostraron en ovejas que al día 30, posinfección, se puede detectar en líquidos amniótico y alantoideo la presencia de inmunoglobulinas G y M y que la concentración de estas inmunoglobulinas se incrementa de forma gradual y proporcional al avance de la gestación.<sup>28, 59</sup>

### **1.5.1 Mecanismos de persistencia**

La persistencia clamidial ha sido descrita como una etapa de crecimiento viable pero no infecciosa, que resulta de una relación a largo plazo con la célula hospedera infectada. Estas relaciones se han establecido *in vitro*, generalmente a través de las variaciones en las condiciones convencionales de cultivo de células para el crecimiento de clamidias.<sup>64, 65</sup>

Muchos estudios han descrito cuerpos reticulares de mayor tamaño, cuya multiplicación por fisión binaria de desacelera y por consecuencia disminuye su

diferenciación a cuerpos elementales, lo que estimula la formación de “cuerpos o formas aberrantes clamidiales”. Estos cambios resultan reversibles tras la eliminación del factor inhibidor del crecimiento. Por lo tanto, la persistencia parece ser un mecanismo que permite a las clamidias “sobrellevar” condiciones hostiles y mantener a largo plazo la infección dentro de una célula hospedera.<sup>64, 65</sup>

Estudios *in vitro* han descrito diferentes mecanismos de inducción de estas formas aberrantes, tales como la presencia de antibióticos en el medio, disminución de nutrientes esenciales como aminoácidos, glucosa y privación de hierro, la multiplicación en presencia de monocitos, infección por clamidiófagos, inducción de choque térmico, el mantenimiento de manera prolongada de un cultivo infectado y producción de citosinas, todos pueden inducir la modificación del metabolismo y limitar la multiplicación de las clamidias;<sup>4, 60, 64, 65</sup> Desde 2004, se han descrito nuevos modelos inductores de persistencia clamidial, como la exposición a los componentes del humo de cigarro, la adenosina extracelular y a la co-infección con el virus del herpes simple (HSV) en humanos o el virus de la diarrea epidémica porcina.<sup>65</sup>

### 1.5.2 INF- $\gamma$ , EnzimaIDO y Triptófano

La producción de IFN- $\gamma$  induce la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), resultando en la degradación de triptófano intracelular, lo que genera la privación de este nutriente esencial para el crecimiento de las clamidias; sin embargo, los efectos anti-*Chlamydia* del IFN- $\gamma$  se pueden revertir mediante la adición de triptófano exógeno, lo que resulta consistente con los estudios de la secuencia del genoma de *C. abortus* que han puesto de manifiesto que esta bacteria carece de la capacidad para sintetizar triptófano por sí misma, haciéndola dependiente de la célula hospedera. Esto plantea una paradoja interesante, la placenta es un sitio favorable para el crecimiento de *C. abortus* debido a que la expresión de citocinas tales como el IFN- $\gamma$  es muy restringida en la interfase



materno fetal y por otro lado, resulta ser un sitio desfavorable, ya que las células trofoblásticas en humanos y ratones expresan la enzima IDO, lo que perjudica al microorganismo que requiere del triptófano para poder infectar las células.<sup>66, 67</sup>

En general, la fase latente de la infección por clamidias, surge durante la primera infección y la inmunosupresión asociada a la gestación puede ser un factor en la reactivación de la bacteria.<sup>68</sup> El control inmunológico del microorganismo depende de la habilidad del hospedero para montar una respuesta inmune mediada por células y la protección se encuentra relacionada fuertemente con la producción de INF- $\gamma$ , situación demostrada para las infecciones por de *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Sin embargo, el control del crecimiento de *C. abortus* por IFN- $\gamma$  en células ovinas se encuentra relacionado con el catabolismo del triptófano, la adición de éste último a los medios de cultivo revierte los efectos del INF- $\gamma$ , disminuyendo la síntesis de IDO, mediador de la persistencia en cultivos celulares. Cualquier relación entre el INF- $\gamma$ , el catabolismo del triptófano y el control del crecimiento de *Chlamydiaceae* resulta compleja y es dependiente tanto del hospedero como de factores del patógeno, tales como la sensibilidad al IFN- $\gamma$ , disponibilidad de triptófano intracelular y ausencia de genes que codifican la producción del aminoácido en el genoma clamidial.<sup>69</sup>

### **1.6 Lesiones y cuadro clínico**

La infección por *C. abortus* en cabras y ovejas infectadas induce aborto, muerte fetal o el nacimiento de corderos débiles. El aborto se da principalmente en el último tercio de la gestación, sin signos clínicos previos a que éste suceda; en ocasiones, se observan descargas vaginales días previos al aborto, siendo más frecuentes en cabras que en ovejas.

En bovinos, tampoco se observan signos clínicos hasta momentos previos al aborto clamidial, que a lo igual que en pequeños rumiantes, se produce en el último tercio de la gestación, aunque, puede tener lugar en el cuarto mes de la misma.

La retención placentaria es más común en cabras y vacas, lo que puede producir metritis. En terneros y corderos nacidos de hembras infectadas, puede haber un cuadro de conjuntivitis y neumonía. El feto, no presenta lesiones macroscópicas específicas.<sup>70</sup> tras el aborto, las lesiones características del AEPR son, membranas placentarias necróticas, engrosadas y exudado placentario. Los fetos abortados son generalmente bien desarrollados y no tienen anomalías anatómicas, lo que sugiere que la placentitis es un elemento clave en la patogénesis del aborto enzoótico de los ovinos (AEO).<sup>60</sup>

Los machos adultos, pueden contagiarse al momento de la monta con hembras infectadas, la infección puede llegar a vesículas seminales y causar epididimitis y orquitis, disminuyendo la calidad del semen.<sup>70</sup>

### **1.7 Diagnóstico**

Existen diversas formas de establecer medidas para el control de la enfermedad, una de ellas es su detección mediante pruebas diagnósticas que resulten efectivas y permitan determinar el estatus del rebaño; sin embargo, cabe señalar que actualmente no existe una técnica de diagnóstico capaz de detectar aquellos animales con infección latente hasta el parto. El control del AEPR considera el uso racional de antibióticos y la vacunación, teniendo cuidado al combinarlos, ya que los animales vacunados pueden generar una respuesta de anticuerpos que puede resultar en falsos positivos en las pruebas de diagnóstico serológico.<sup>71</sup>

Un diagnóstico temprano y preciso de la causa de aborto es muy importante, ya que con éste se pueden establecer las medidas de control apropiadas para limitar o prevenir la propagación de la enfermedad. Cuando el aborto ocurre entre las dos o tres últimas semanas de gestación, con una severa placentitis, se puede sospechar de infección por clamidias, sin embargo, otros microorganismos como *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus sp fetus*, *Toxoplasma gondii* y brucelas

lisas, pueden causar lesiones placentarias,<sup>1,2</sup> lo que hace que el diagnóstico de la enfermedad sea complicado requiera la intervención del laboratorio.<sup>72</sup>

En el diagnóstico de la clamidiosis, más importante que el aislamiento e identificación del microorganismo a partir de los abortos, es la detección de la bacteria en aquellos animales aparentemente sanos que han estado en contacto con animales ya enfermos y que pueden ser portadores del agente. Por esta razón, el diagnóstico individual es de menor valor que el colectivo, de todo el rebaño. Actualmente existen diferentes procedimientos que se pueden realizar en el laboratorio y se agrupan en métodos directos y métodos indirectos; con los primeros se busca la identificación del agente etiológico, *C. abortus*, en las muestras recibidas, mientras que en los indirectos, se detecta la respuesta inmune generada por el animal como consecuencia de la infección.<sup>8</sup>

Según la OIE, el método más comúnmente usado para el serodiagnóstico de la clamidiosis es la prueba de fijación del complemento (CFT); sin embargo, además de ser una técnica laboriosa, es de sensibilidad limitada y a menudo afectada por reacciones cruzadas entre especies de clamidias.<sup>73</sup>

### **1.7.1 Diagnóstico directo no basado en cultivo**

#### **1.7.1.1 Microscopia mediante tinción**

Se realiza en extensiones y frotis de exudados y secreciones de órganos o tejidos afectados. La placenta fresca y corderos muertos son las muestras de elección, deben colocarse en bolsas de plástico herméticamente cerradas; de manera alternativa, cuando no se dispone de un laboratorio cercano, se puede colocar un trozo del tejido afectado (placenta o cotiledón) en medio de transporte para clamidias, elaborado a base de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG), suplementado con suero fetal bovino y antibióticos como gentamicina y estreptomina, mas no penicilina y un inhibidor fúngico; las tinciones utilizadas pueden ser la técnica modificada de Ziehl-Neelsen o Stamp, Macchiavello o Giménez, donde el principal

colorante es la fucsina fenicada y como contraste se emplea el verde de malaquita o el azul de metileno, realizándose la decoloración con un ácido débil diluido (ácido acético o cítrico). En casos positivos, con la técnica de Stamp, se pueden ver mediante el examen microscópico gran número de pequeños cuerpos elementales cocoides (300 nm) aislados o en grupo, resaltados sobre un fondo azul o verde de restos celulares, en campo oscuro, los cuerpos elementales son de color verde pálido. <sup>1, 2, 8, 74</sup>

Cuando no se dispone de material placentario, se pueden realizar frotis de exudados vaginales con un periodo de tiempo no mayor a las 24 horas después del aborto, o bien, a partir de lana húmeda del feto recién abortado o del cordero nacido muerto. <sup>2, 74</sup>

Debido a su morfología y propiedades tintoriales *C. abortus* se parece a la rickettsia *Coxiella burnetti* que también puede provocar abortos y que origina la fiebre de Q en humanos; sin embargo, las diferencias antigénicas entre *C. abortus* y *Coxiella burnetti* se pueden detectar mediante pruebas serológicas. <sup>2, 74</sup>

Es importante señalar que ante una tinción positiva, el diagnóstico presuntivo, debe ser confirmado mediante el aislamiento. <sup>8</sup>

#### **1.7.1.2 Detección del antígeno**

Se basan en la utilización de anticuerpos específicos para la detección de los antígenos de *Chlamydia spp.* a partir de órganos, tejidos o exudados. La reacción inmunológica se revela mediante la utilización de compuestos fluorescentes o mediante una enzima y su sustrato. Se disponen de varias pruebas comerciales para detectar antígenos clamidiales a nivel de género. <sup>74</sup> Una de ellas es la inmunofluorescencia directa; esta técnica es más sensible que los métodos de tinciones específicas o los empleados para el aislamiento y cultivo. En un principio, se utilizaban anticuerpos contra el LPS de la membrana clamidial, con especificidad de género, pero la técnica ha mejorado al introducir anticuerpos

monoclonales, que actualmente permiten la diferenciación entre las diferentes serovariedades; sin embargo, no se encuentran disponibles comercialmente.<sup>8, 74</sup>

Por otra parte, la técnica de inmunocaptura, que es una variante de las pruebas de ELISA utilizadas en serología, donde las placas se tapizan con anticuerpos policlonales o monoclonales para *C. abortus*. Existen métodos comerciales para el diagnóstico de *C. trachomatis* en humanos, que emplean anticuerpos monoclonales contra el LPS; esta molécula es específica de la familia *Chlamydiaceae* y también se puede recurrir a ellos para la detección de *Chlamydia abortus*, con resultados aceptables.<sup>74</sup>

Finalmente, la inmunohistoquímica, que se aplica en cortes de órganos y tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, utilizando anticuerpos secundarios conjugados con enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, añadiendo posteriormente el sustrato adecuado que, al entrar en contacto con la enzima, precipita y colorea el área donde se localiza el antígeno.<sup>74</sup>

### **1.7.2 Diagnóstico directo en cultivos**

Debido a que *C. abortus* es un microorganismo intracelular obligado, necesariamente debe aislarse en huevos embrionados de gallina o en cultivos celulares, siendo este último el método de elección para el aislamiento de cepas nuevas.<sup>2, 74</sup>

Las muestras de tejido, como los cotiledones infectados, las membranas placentarias, el pulmón o el hígado fetal, o exudados vaginales que tengan que esperar el comienzo de los procedimientos de aislamiento, deben mantenerse en medio SPG, utilizando una proporción de tejido:medio de 1:10.<sup>2, 74</sup>

#### **1.7.2.1 Inoculación de embriones de pollo**

Es el método más antiguo para el aislamiento de clamidias que se reproducen en saco vitelino de embriones de pollo de 6 a 7 días de edad. Los embriones mueren

entre los días 4 y 13 posinoculación. Las improntas preparadas a partir de los sacos vitelinos congestionados revelan la presencia de gran cantidad de cuerpos elementales; también se pueden apreciar hemorragias en las membranas y piel del embrión. <sup>2, 8</sup>

#### **1.7.2.2 Infección en cultivos celulares**

*Chlamydia abortus* puede ser cultivada en gran variedad de líneas celulares, siendo Mc Coy, L929 y las de riñón de hámster neonato (BHK) las más utilizadas. <sup>1</sup>

Los cultivos celulares han sido considerados durante mucho tiempo como la “prueba de oro” para el diagnóstico de esta infección y son utilizados porque además de permitir el seguimiento de la evolución de la infección, con identificación del efecto citopático, permiten la observación de inclusiones intracitoplasmáticas en células teñidas con anticuerpos monoclonales fluorescentes o bien, la titulación del número de unidades formadoras de inclusiones (UFI). <sup>8, 74, 75</sup>

La actividad de las clamidias puede incrementarse mediante el tratamiento químico de las células cultivadas, antes o durante la infección, favoreciendo de este modo su crecimiento. Dentro de las sustancias que se han descrito para incorporar al inóculo infectivo al que se exponen las monocapas están: cicloheximida (0.5 µg/mL), que es un antibiótico glutarimídico que inhibe la síntesis de proteínas de las células eucariotas sin afectar a las clamidias; la citocalasina B, que interfiere en la división citoplasmática; 5-yodo-2-deoxiuridina (80 µg/mL), que se incorpora al ADN en sustitución de la timidina y se aplica durante los tres días preinfección y la emetina (1 µg/mL) 5 minutos antes de infectar las células. Siendo la cicloheximida la más utilizada y la deoxiuridina la que menos se emplea, ya que requiere mucho tiempo para el aislamiento del agente. <sup>2, 74</sup>

Dentro de los procedimientos utilizados para favorecer la penetración de las bacterias a las células, se puede emplear la centrifugación, el tratamiento con dietil-amino-etil dextrano (DEAE-D), que es un polícatión hidrosoluble que actúa de puente entre las membranas del microorganismo y la de las células eucariotas cargadas negativamente; también se tratan con polietilenglicol; finalmente, el uso de la cicloheximida puede combinarse con los procedimientos de centrifugación o con el uso del DEAE-dextrano para incrementar la infectividad de las clamidias *in vitro*.<sup>74, 76</sup>

### **1.7.3 Diagnóstico indirecto por serología**

En general, las pruebas serológicas son consideradas como métodos de diagnóstico indirecto y su objetivo es determinar si el animal en cuestión ha padecido la infección, utilizando para ello la detección y cuantificación de anticuerpos específicos en suero (respuesta humoral), o poniendo de manifiesto una reacción de base celular. El diagnóstico serológico es el que más se emplea de forma rutinaria en la clamidiosis de los pequeños rumiantes, debido a que es más importante la inmunidad y el conocimiento del estado sanitario del rebaño, que el que corresponde a un individuo en particular.<sup>2, 8</sup>

Dentro de los métodos más utilizados para la detección de anticuerpos anti-clamidias en sueros de animales, se encuentran las pruebas de inmunofluorescencia indirecta, los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y la fijación del complemento, que detectan la respuesta inmune humoral, principalmente al LPS, común a todas las clamidias y los antígenos proteicos específicos de género, especie o serotipo.<sup>8, 77</sup>

## **Fijación del complemento**

Según la OIE, es éste el método más usado para el serodiagnóstico de la clamidiosis en animales, aún cuando esta prueba resulta complicada y no es capaz de diferenciar entre especies, ya que utiliza como antígeno el LPS o bien la proteína de choque térmico presente en todas ellas. <sup>2, 73, 77</sup>

Los títulos de anticuerpos a *C. abortus* generalmente se mantienen negativos o en niveles muy bajos hasta la finalización de la gestación, que es cuando sufren una elevación importante, con un máximo entre los 14-21 días posparto, alcanzando en los animales que han abortado valores superiores a 1:80; sin embargo, como la infección se observa sobre todo durante la invasión placentaria activa en el último mes de la gestación y después de la bacteremia que a menudo acompaña al aborto, se pueden obtener sueros pareados, los primeros tomados al momento del aborto y el segundo muestreo, después de al menos tres semanas, ya que pueden revelar un título de anticuerpos para FC que permita establecer un diagnóstico retrospectivo. <sup>2, 8, 77</sup>

Esta técnica tiene el inconveniente de ser laboriosa, de sensibilidad limitada, especialmente cuando se trabaja con animales cuyos títulos son bajos o bien, están vacunados, además de verse afectada por reacciones cruzadas entre especies de clamidias. <sup>2, 8, 73</sup>

### **1.7.3.2 Inmunofluorescencia indirecta**

También llamada Microinmunofluorescencia indirecta (MIF), es probablemente la prueba más sensible para el diagnóstico de la clamidiosis debido a que los antígenos dirigidos a las proteínas de membrana externa son detectados en las células obtenidas del sitio de lesión con el empleo de un anticuerpo monoclonal conjugado con fluorocromo. <sup>72, 75</sup>



En el Reino Unido, esta prueba se utiliza para la confirmación de los casos positivos a la FC, comparando la respuesta serológica a *C. abortus* y *C. pecorum*. Esta técnica es compleja y subjetiva al leer los resultados, ya que requiere de personal especializado, a lo que se agrega la dificultad para disponer de antígenos estandarizados.<sup>8</sup>

### 1.7.3.3 ELISA

Las respuestas serológicas a *C. abortus* y *C. pecorum* se pueden evidenciar con microinmunofluorescencia, pero el procedimiento es largo a los efectos de un diagnóstico rutinario, por lo que se han desarrollado pruebas de ELISA por varios grupos de investigación, sin embargo, aún no se emplean en el trabajo de diagnóstico general, debido a las dificultades asociadas con el uso de antígenos particulados. Sin embargo, se han desarrollado y utilizado con muestras experimentales y de campo un sin número de ELISA's que incorporan diversos antígenos clamidiales como el LPS purificado, la MOMP y la POMP de forma soluble y estable y han dado resultado, aunque carecen de especificidad de especie en algunos casos, pero presentan una mayor sensibilidad que la prueba de FC. A esto, se pueden agregar otras ventajas, como su automatización, que facilita el diagnóstico serológico de rebaños completos, y la objetividad de interpretación al utilizar un espectrofotómetro.<sup>2, 77, 78</sup>

Recientemente se ha desarrollado un ELISA competitivo (ELISAc) con un anticuerpo monoclonal específico dirigido a dominios de la MOMP. Sin embargo, estas proteínas son potenciales candidatos para la elaboración de vacunas de subunidades, lo que dificultaría el diagnóstico, ya que no se podría diferenciar entre animales vacunados e infectados. También se ha desarrollado un ELISA indirecto (ELISAi) basado en un fragmento de la proteína polimórfica de membrana externa, una proteína recombinante de *C. abortus* POMP91B (rONP91B iELISA), a la que se ha demostrado mayor especificidad en comparación con FC. Se ha sugerido a estas proteínas como candidatos para el

serodiagnóstico de la clamidiosis, ya que reaccionan fuertemente en inmunotransferencia con sueros de ovejas infectadas con *C. abortus* pero no con sueros de infectadas con *C. pecorum* y no se han propuesto como posibles candidatos para antígenos vacunales. <sup>1, 77</sup>

#### **1.7.4 Amplificación de ADN clamidial**

Las posibilidades para la detección de clamidias, han mejorado considerablemente después de la introducción de métodos genómicos, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la identificación directa en muestras clínicas y la diferenciación de especies. Se han publicado una serie de pruebas como los ensayos TETR-PCr (touchdown enzyme time release) que amplifican regiones del gen 16S y los espaciadores 16S-23S ADNr para detectar de forma sensible y específica las diferentes especies del género *Chlamydia*. El método de detección de *C. psittaci* por PCR de tiempo real del gen *envB* utilizando SYBR-Green, es rápido y sensible, aunque sólo se ha utilizado para detectar el microorganismo en muestras de heces de aves y su especificidad es relativa ya que detecta otras especies del género. Ninguna de estas pruebas ha sido validada en laboratorios de diagnóstico veterinario y no están disponibles comercialmente <sup>17, 73, 74</sup>.

#### **1.8 Control y profilaxis**

El control de esta enfermedad no sólo es importante desde el punto de vista de la sanidad animal, sino también para prevenir su contagio al hombre. La medida de control más aconsejada en esta enfermedad es la vacunación, <sup>79</sup> sin embargo, se pueden establecer medidas de control y prevención del AEPR en base a tres aspectos: medidas de manejo o no específicas, tratamiento con antimicrobianos y con la inmunización.<sup>8</sup>

Las medidas de manejo consisten en el aislamiento de animales enfermos y su progenie, todos los corderos muertos, placentas y ropa de cama, deben desecharse de forma segura; los corrales de parición, comederos y bebederos,

deben ser desinfectados para evitar se propague la contaminación a otros lugares de las instalaciones. Es importante lavarse bien las manos y de ser posible, cambiar la ropa del médico o trabajadores antes de atender otros animales.<sup>80, 1</sup>

*Chlamydia* es susceptible a la mayoría de los desinfectantes y detergentes, incluyendo una dilución de 1:1000 de compuestos de cuaternario de amonio, 1 % de hipoclorito de sodio, etanol al 70 %, entre otros. También puede ser destruida por calor húmedo a 121° C durante 15 min., o calor seco entre 160 y 170° C durante una hora.<sup>81</sup>

La clamidiosis usualmente es tratada con tetraciclinas, las ovejas gestantes deben tratarse con oxitetraciclina de acción prolongada a razón de 20 mg/kg vía intramuscular; se recomienda se administre entre el día 95 y 100 de gestación, ya que es cuando se empiezan a dar los cambios ocasionados por las clamidias en placenta. Como el efecto del tratamiento es suprimir la multiplicación de la bacteria, se deben administrar más dosis de antibiótico a intervalos de dos semanas hasta el parto. Es importante mencionar que aunque el medicamento reduce las pérdidas y la cantidad de microorganismos excretados al parto, no erradica la infección y los daños que se pudieran ocurrir en placenta no son reversibles, por lo que algunas ovejas sí abortan; también se recomienda el tratamiento con eritromicina y otros macrólidos, tilosina, quinolonas y cloranfenicol pueden ser usados.<sup>1, 81</sup>

Finamente, la vacunación es considerada como la única solución eficaz para controlar la infección por *Chlamydia* en los rebaños.<sup>1, 81</sup>

Cuando ingresan animales al rebaño y se tiene duda sobre su procedencia, deberán ser vacunados antes de ingresar al mismo, si la infección ya ha sido diagnosticada, las ovejas deben ser vacunadas antes de la época reproductiva, repitiendo la vacunación en tres años cuando el rebaño se encuentra muy infectado.<sup>1</sup>

Las vacunas inactivadas fueron las primeras en utilizarse, son inactivadas con formalina y tienen como desventaja conferir protección limitada e impedir la

eliminación del microorganismo durante el parto, pero pueden conferir cierta protección residual, que puede ser adecuada en rebaños donde la carga clamidial aún es baja. Las vacunas atenuadas mejoran el nivel de protección, pero al tratarse de una vacuna viva, el daño potencial la hace menos atractiva como alternativa. Del mismo modo, el uso de vacunas subcelulares no ha dado buenos resultados, así como tampoco los ensayos realizados con vacunas basadas en ADN.<sup>70, 80</sup>

En los 80's, se desarrolló una vacuna viva termosensible que crece a 38 °C, pero a 39 °C se restringe su crecimiento; ésta, se encuentra constituida por la cepa 1B, que es una mutante nitrosoguanina, procedente de la cepa de campo AB7 de *C. abortus*.<sup>80, 82</sup> Esta vacuna ha resultado ser más eficiente, ya que disminuye la presentación de signos clínicos y previene la infección en ovejas y cabras desafiadas,<sup>70</sup> pero, el uso de este tipo de vacunas interfiere en la interpretación de un diagnóstico serológico rutinario y puede causar estados temporales de inmunosupresión acompañados de un aumento de susceptibilidad a otras infecciones.<sup>4</sup>

En general, una vacuna debe cumplir con una serie de características para tener éxito, idealmente, una vacuna debería ser eficaz, segura, económica para su producción y estable, teniendo en cuenta los múltiples factores que influyen en cada uno de estos criterios, sin embargo, una vacuna eficaz necesita provocar una respuesta inmune protectora y al hacerlo no debe causar la enfermedad. En consecuencia, los retos para el desarrollo de una nueva vacuna contra el AEPR son:

- 1.- La identificación y combinación óptima de componentes del patógeno, que provocan una respuesta protectora de IFN- $\gamma$ .
- 2.- La integración de estos componentes en una formulación adecuada y
- 3.- La producción de los componentes de forma rentable y que cumpla las necesidades de las partes interesadas.

La capacidad de *C. abortus* para establecer una infección persistente en ovejas es reflejo de una adaptación compleja entre el hospedero y el patógeno. La respuesta inmune que se genera durante esta etapa de la infección aún no es del todo clara, sin embargo, la inmunidad que se genera después del aborto, se sabe que es protectora; por lo que el objetivo de una nueva vacuna contra el AEPR debe ser el imitar o mejorar esta respuesta protectora.<sup>82</sup>

### **1.9 Diagnóstico en México**

En México, el Aborto Enzoótico Ovino (AEO) se encuentra clasificado dentro de las enfermedades exóticas de la ganadería nacional y de notificación obligatoria<sup>13</sup>; sin embargo, existen evidencias serológicas y de aislamiento que indican la presencia de la enfermedad en el territorio nacional.<sup>14</sup>

Mientras la enfermedad se considere exótica, no es factible realizar pruebas diagnósticas dentro del territorio nacional, así como tampoco es posible la introducción de material para diagnóstico ni de vacunas, lo que dificulta determinar la situación de la enfermedad en el país y establecer medidas de prevención y control para la misma.

## **Justificación**

La clamidiosis es considerada una enfermedad exótica en México;<sup>2</sup> sin embargo, en 1997, se reportó el agente a partir de muestras de cabras que abortaron<sup>14</sup>, lo que generó interés por realizar estudios epidemiológicos, que permitieran conocer la situación de la enfermedad, pero, por su situación de exótica, resulta complicado el diagnóstico de la enfermedad ya que únicamente se pueden emplear estuches de ELISA importados, de costo elevado, y con dificultad de importación. Lo que genera la necesidad de desarrollar técnicas diagnósticas propias y eficaces, que sean capaces de determinar el estatus de los rebaños y de cada uno de los individuos que los conforman, con el objetivo de establecer medidas de control para el AEPR; desafortunadamente, el comportamiento y las características tanto de la enfermedad como del agente etiológico dificultan aún más el desarrollo de éstas pruebas que además, deberán ser de fácil acceso a los productores.

## **2 Hipótesis**

Un extracto crudo de *C. abortus*, puede usarse en el diseño un ELISA-Indirecto para el diagnóstico del AEPR; éste deberá tener al menos 80% de sensibilidad y especificidad.

### **3 Objetivo general**

- Desarrollar y estandarizar un ELISA Indirecto (ELISA-I) que sea útil para el diagnóstico de clamidiosis en caprinos

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Reproducir *C. abortus* en saco vitelino de embriones de pollo y en la línea celular L929 de fibroblastos de ratón para la obtención del paquete celular y del antígeno<sup>12</sup>.
- Determinar la sensibilidad del ELISA usando sueros de caprinos con aislamiento y PCR positivos de *C. abortus*,
- Establecer la especificidad del ELISA-I utilizando sueros de caprinos sin historia de abortos y de un rebaño sin antecedentes de clamidiosis,
- Realizar un perfil comparativo con sueros positivos y negativos a diferentes enfermedades que afectan a los caprinos y establecer la concordancia entre los resultados obtenidos con el ELISA comercial y el ELISA diseñado.

## **4 Material y métodos**

### **5.1 Material biológico**

#### **5.1.1 Sueros**

Se trabajó con un total de 397 sueros de caprinos provenientes de diferentes estados de la república mexicana, particularmente se emplearon aquellos con historial de abortos, Guanajuato, Tlaxcala, Guerrero, Coahuila y San Luis Potosí (SLP).

Para el caso del estado de Guanajuato, las muestras provenían de hembras de primer parto y de aquellas que estuvieran próximas a parir (2 semanas) o bien, recién paridas (4 semanas); de éste grupo se seleccionaron 10 sueros de animales con historia de aborto y con seropositividad al ELISA comercial para diagnóstico de clamidiosis, además eran aislamiento y PCR positivos.<sup>17</sup>

El grupo control negativo fue del mismo tamaño, 10 sueros de animales sin historia de aborto y con resultado negativo al estuche comercial; estos, fueron tomados del estado de Guerrero. Las muestras se seleccionaron de un banco de sueros ya existente en el CENID Microbiología Animal, INIFAP, de las cuales 30 eran seropositivas y 30 seronegativas a brucelosis y leptospirosis.

#### **5.1.2 Microorganismos**

Para la obtención del antígeno se utilizó la cepa de referencia A22 de *Chlamydia abortus*. (Propiedad de la FMVZ-UNAM, Proveniente del Central Veterinary Laboratory, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB United Kingdom, donada por Petter C. Griffiths, en 1993.

Permiso de importación , Depto de Autorizaciones Zoosanitarias. Dirección General de Salud Animal m NO, 0012839, agosto 23, de 1993, otorgado a la MVZ Cristina Escalante Ochoa. Certificado Zoosanitario de importación No. 27491).



La bacteria fue multiplicada en saco vitelino de embrión de pollo y en la línea celular L-929 para ser titulada, alicuotada y almacenada a -70° C para posteriormente ser usada como antígeno.

## **5.2 Cultivo y producción de *C. abortus* en saco vitelino de embrión de pollo**

Se inocularon 0.2 ml de una suspensión de la cepa A22 de *C. abortus* en los embriones de pollo de 7 días de edad. Algunos huevos embrionados se inocularon únicamente con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.2 estéril como controles negativos.

Con ayuda de un ovoscopio se localizaron y marcaron tanto la cámara de aire como la posición del embrión, también se determinó si los embriones estaban vivos o muertos.

La inoculación se realizó usando una jeringa insulínica (BD Ultra-fine®) con aguja desmontable de 0.9x40 mm a través de la cámara de aire en el saco vitelino, al lado opuesto del embrión.

Los huevos inoculados se mantuvieron en incubación a 37° C durante 7 a 8 días; durante este tiempo, se observaron diariamente para detectar y eliminar aquellos que murieran dentro de los 3 primeros días posinoculación, por traumatismos, por problemas tóxicos o de contaminación.

*Chlamydia abortus* ocasiona la muerte del embrión entre los días 4 y 13 pos-infección; <sup>2, 8</sup> a partir de este momento, se pueden obtener y juntar los sacos vitelinos para ser macerados en PBS estéril a una proporción de 1:3 p/v con arena de mar lavada estéril y con ayuda de un mortero; todo bajo estrictas condiciones de esterilidad.

Una vez macerados, los sacos vitelinos fueron centrifugados durante 10 minutos a 175 xg para eliminar restos celulares y la fracción lipídica. (Fig. 6).

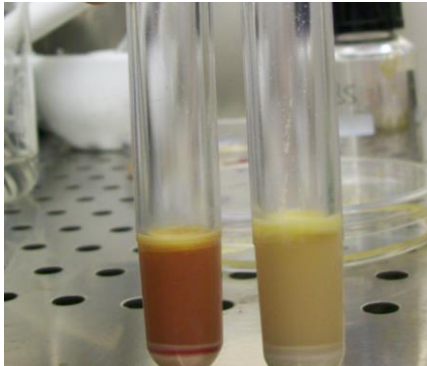


Figura 6. Restos celulares (fondo del tubo), suspensión rica en clamidias (porción media del tubo) y fracción lipídica (parte superior del contenido en el tubo).

Para descartar el crecimiento de contaminantes en las muestras obtenidas, éstas se sembraron en agar sangre al 5% y se incubaron durante 24 horas a 37° C. De los huevos embrionados, que fueron inoculados con PBS estéril, también se obtuvieron bajo el mismo procedimiento los sacos vitelinos que fueron utilizados como controles negativos.

### **5.3 Determinación de la presencia de *C. abortus* en los sacos vitelinos infectados**

Para determinar la presencia de clamidias en los sacos vitelinos infectados, se hicieron frotis de cada macerado, se secaron por calor, se fijaron con metanol y se tiñeron por el método de Stamp *et. al.* 1950 <sup>12</sup>:

- Fucsina fenicada diluída a 1/5 en PBS y filtrada, por 15 min.
- Decoloración con ácido acético al 0.05% en PBS, por 20 seg.
- Contraste con verde de malaquita al 4% en agua destilada, por un minuto.

Tanto la selección de los sacos vitelinos y sus macerados, como la valoración de las clamidias se realizaron mediante observación subjetiva, utilizando una escala

que comprendía de 0 a 5 puntos y teniendo en cuenta las lesiones presentes tales como el grado de congestión<sup>2</sup>; las muestras seleccionadas fueron aquellas que tuvieron entre 4 y 5 puntos.

Para determinar la presencia de antígeno clamidial, se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa, utilizando un estuche comercial (Imagen™ Chlamydia, Oxoid). Esta prueba utiliza un anticuerpo monoclonal específico de género para el LPS clamidial marcado con fluoresceína, dicho antígeno se encuentra presente en todas las cepas de *Chlamydiae*. La técnica se realizó conforme las indicaciones del fabricante:

Los frotis fueron fijados con acetona fría (4° C) y secados a temperatura ambiente, a cada uno se le agregaron 25 µL del anticuerpo monoclonal teñido con isotiocianato de fluoresceína (FITC), los portaobjetos se incubaron durante 30 min. a 37° C en cámara húmeda. Se utilizaron 2 µL azul de Evans como colorante de contraste; transcurrido el tiempo, se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron en un microscopio de epifluorescencia, utilizando el objetivo 40X.

Los macerados considerados como óptimos, fueron alicuotados y congelados a -80° C hasta el momento de su uso.

#### **5.4 Cultivo y multiplicación de *C. abortus* en línea celular L-929.**

##### **5.4.1 Cultivo de la línea celular L-929**

Esta línea celular proviene de tejido conectivo de ratón y se mantiene congelada en nitrógeno líquido.

Las células fueron descongeladas y puestas en cultivo; para ello, el criotubo donde se encontraban se puso en baño María a 37° C en agitación suave; éste procedimiento debe ser lo más rápido posible para evitar la formación de cristales intracelulares que dañen la estructura. Una vez descongeladas, se resuspendieron

en 5 mL de medio D-MEM (*Invitro*®) enriquecido con 2 mM de L-Glutamina. 10 % de suero fetal bovino (SFB), aminoácidos no esenciales (aane) al 1 % y piruvato de sodio 1 mM; se centrifugaron durante 10 minutos a 214 xg; el sobrenadante que contenía el crioprotector dimetil sulfóxido (DmsO, Sigma) fue retirado y el botón de células resuspendido en medio D-MEM enriquecido (Fig. 7).

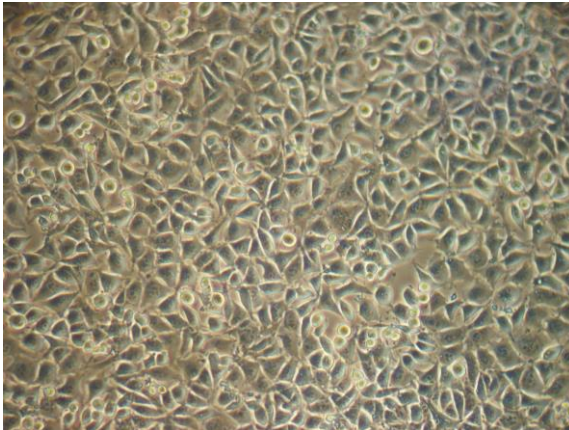


Figura 7. Fibroblastos de ratón. Línea celular L-929 en cultivo con medio D-MEM.

La concentración de células viables fue determinada con el método del azul tripán bajo el siguiente esquema:

A 100  $\mu$ l de azul tripán (HYCEL ®) al 1 % en PBS, se añadió la misma cantidad de suspensión celular en un tubo Eppendorf® y se agitó ligeramente; la mezcla se observó en cámara de Neubauer. Las células vivas se observan refringentes, porque conservan íntegra su membrana, mientras que las muertas favorecen el paso del colorante a su interior y se observan de color azul. La concentración de células vivas se determinó en base a la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células viables/ml} = \text{N}^\circ \text{ de células vivas en 16 cuadros} \times 2 \times 10,000$$

Las células se distribuyeron en botellas para cultivo celular (nunc®) de 75 cm a una proporción de  $2 \times 10^5$  células en 5-6 ml de D-MEM enriquecido, se incubaron durante 24 horas a 37° C en una estufa con 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El medio de las células fue sustituido por medio nuevo para eliminar células muertas y restos celulares en suspensión.

#### **5.4.2 Infección de la monocapa celular**

La técnica que se ha utilizado es una modificación de la descrita por Salinas y *et. al.*, 1994,<sup>83</sup> que consiste en la preparación del inóculo en medio D-MEM enriquecido con 10% de SFB y 100 µg/mL de dietilaminoetil dextrano (DEAE-D) que se añade a un cultivo de células L929 con 80% de confluencia; este cultivo se incubó durante 90 min. a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, posteriormente se incubaron durante 10 min. en agitación (50 xg) a 37° C; transcurrido el tiempo, el inóculo fue eliminado, se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con medio D-MEM, enseguida se les agregaron nuevamente 15 mL del mismo medio de cultivo para mantenimiento, las botellas con las células ya infectadas se incubaron nuevamente durante 3 días bajo las condiciones descritas anteriormente.

A las 48 h. se añadió ciclohexamida que inhibe la multiplicación celular (2 µL/µL de D-MEM enriquecido). El cultivo se mantuvo durante 7 días a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % hasta el momento de la purificación.<sup>83, 84, 85</sup>

#### **5.4.3 Determinación de la presencia de *C. abortus* en cultivo celular infectado**

Del mismo modo que los sacos vitelinos de embriones de pollo infectados, la presencia del microorganismo en los cultivos infectados se determinó mediante frotis que fueron teñidos con las tinciones de Stamp y Giménez; también se corrió la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) a partir de frotis de cultivos infectados, siguiendo instrucciones del fabricante del estuche comercial Imagen® (Oxoid), (Fig. 8).

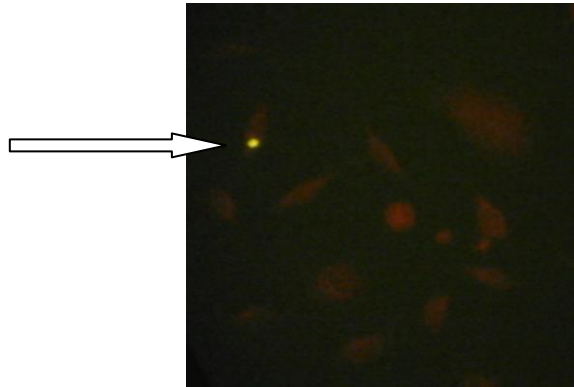


Figura 8. IFD de células L-929 de fibroblastos de ratón infectadas con la cepa A22 de *C. abortus*. (Flecha)

### 5.5 Purificación de *C. abortus* para la obtención de un antígeno a partir de cuerpos elementales (CE)

*C. abortus* se purificó mediante la técnica modificada por Salinas *et. al.*, (1994)<sup>86</sup> originalmente descrita por Caldwell *et. al.* y col. (1981)<sup>86</sup> basada en la ultracentrifugación diferencial.

Las botellas que contenían las células infectadas se congelaron y descongelaron a  $-20^{\circ}$  C durante 15 min. por cuatro ocasiones. Con el objetivo de romper las membranas celulares, la descongelación fue lenta a temperatura ambiente ( $24^{\circ}$  C). Enseguida se centrifugaron a 170 xg a  $20^{\circ}$  C durante 10 min. para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se recuperó y se depositó sobre 8 mL de una solución de amidotriazoato de sodio (Ioditrac®) al 35 %, en un amortiguador de Tris - 0.15 M – KCl, pH 7.5 y se ultracentrifugó durante 60 min. a 50,000 xg a  $4^{\circ}$  C. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente para no desprender el sedimento formado, ya que en éste último se encuentran las clamidias que se resuspendieron (Figuras 9 y 10) en el amortiguador Tris-KCl y se ultracentrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones (50,000 x g,  $4^{\circ}$  C, por una hora). El sedimento obtenido en esta segunda ultracentrifugación se resuspendió en PBS o bien en una solución de PBS-sacarosa al 5% y se conservó a  $-80^{\circ}$  C hasta su uso.<sup>4, 87</sup>

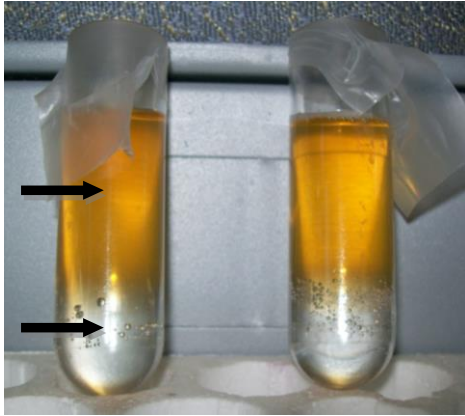


Figura 9. Diferenciación de fases previas a ultracentrifugación. (Las flechas muestran ambas fases).



Figura 10. Sedimento de clamidias (flecha) formado después de la segunda ultracentrifugación.

Para determinar la cantidad de antígeno en la muestra purificada se realizó una valoración proteica utilizando la microtécnica de Bradford.

Para crear la curva estándar y poder determinar la cantidad de proteína contenida en las soluciones a valorar, se prepararon dos soluciones de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de  $1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  de PBS y a  $10 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  de PBS, (Cuadro 4); también se prepararon por duplicado  $10 \mu\text{L}$  del extracto crudo de *C. abortus*.

Se agregaron  $190 \mu\text{L}$  del reactivo de Bradford tanto a los pocillos que contenían la BSA como a aquellos con extracto crudo, se dejaron reposar durante 10 minutos en obscuridad y posteriormente se leyeron en un lector para placas de ELISA (BioTek®, mod. ELx800) a una longitud de onda de  $630 \text{ nm}$ .

**Cuadro 4. Distribución de BSA y reactivo de Bradford (RBF) en una placa de 96 pozos para la microtécnica de Bradford.**

μL de PBS	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
μL de RBF	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL
μL Ag+RBF	10+190	10+190								
μL Ag+RBF	10+190	10+190								
RBF = Reactivo de Bradford										
BSA 10μg/μl	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS	μL/μL de PBS
μL de BSA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μL de PBS	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
μL de RBF	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL	190 μL
μL Ag+RBF	10+190	10+190								
μL Ag+RBF	10+190	10+190								

### 5.5.1 Purificación parcial de *C. abortus*

Por maceración del saco vitelino y mediante centrifugación por diferenciación se recuperó la cepa inoculada en los embriones de pollo; para ello se depositaron 200 μL del sobrenadante obtenido a partir de las membranas vitelinas sobre 1 mL de solución de Ioditras<sup>®</sup> al 30% en PBS v/v en tubos para ultracentrífuga, se ultracentrifugó durante 30 minutos a 50,000 xg; el sobrenadante fue eliminado y el sedimento resuspendido en 50 μL de PBS estéril enriquecido con 5% de sacarosa la cual se mantuvo a -80° C hasta su uso.<sup>4,84, 86</sup> (Fig. 11).





Figura 11. Tubos con Ioditras® y sobrenadante de sacos vitelinos

La presencia de *C. abortus* se determinó a partir de un frotis de cada uno de los sacos vitelinos fijados por calor y teñidos con el método descrito por Stamp *et. al.*, (1950)<sup>12, 58</sup>; además, se realizó como control de esterilidad la siembra de cada saco vitelino en agar sangre, incubándolo a 37° C durante 24 horas.<sup>4</sup>

### 5.5.2 Inactivación del antígeno

El antígeno se inactivó mediante la adición de 2-hidrobromuro de bromoetilamina (BEI) a una concentración del 30% en PBS, dejándolo en agitación constante a 37° C durante 48 horas; posteriormente se detuvo la reacción con tiosulfato de sodio al 30% en PBS, en proporción de 0.5 mL de BEI por cada 100 mL de suspensión clamidial inactivada, la concentración final de tiosulfato de sodio fue de 0.15%.<sup>4</sup>

### 5.5.3 Antigenicidad y pureza del extracto crudo obtenido a partir de *C. abortus*.

La presencia de las clamidias en el extracto crudo se comprobó mediante la técnica de Dot blot, para ello, se utilizó una membrana de nitrocelulosa (Millipore, immobilon<sup>TM</sup>-P transfer membrane) activada en metanol; fue sensibilizada con el extracto crudo clamidial, se dejó secar a temperatura ambiente y se bloqueó con leche descremada al 2%, incubándose después durante dos horas a 37° C en agitación constante, posteriormente se hicieron tres lavados de cinco minutos cada uno en agitación con Tris NaCl pH 7.4. La membrana fue puesta en contacto con el anticuerpo primario, los sueros que se emplearon fueron el control

positivo y negativo del estuche comercial de ELISA (Pourquier®); se incubó durante una hora a 37° C; posteriormente se hicieron nuevamente tres lavados bajo las condiciones antes descritas; como anticuerpo secundario se utilizó una anti-IgG ovina conjugada con peroxidasa (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit AntiSheep IgG (H+L) code: 313-035-003) a una dilución de 1:2000, se incubó una hora a 37° C y nuevamente se hicieron los tres lavados con Tris- NaCl. Finalmente la membrana se reveló con 4-cloro-1-naftol (Sigma) a razón de 30 mg/10 mL de metanol y aforados a 50 mL de Tris-NaCl; durante 10-15 minutos en total obscuridad, la reacción se detuvo con agua corriente de la llave hasta que aparecieron los puntos que indicaban el reconocimiento del antígeno por los anticuerpos.

#### **5.6 Estandarización de la técnica de inmunoensayo enzimático indirecto. (ELISA-I)**

Se sensibilizaron las microplacas de 96 pocillos con diferentes diluciones del extracto crudo purificado e inactivado en solución de carbonato bicarbonato pH 9.6: para ello se utilizó el método de estandarización conocido como “Chessboard titrations” (CBT).<sup>88</sup> (Cuadro 5).

La placa se dejó incubando a 4° C durante toda la noche; posteriormente fue lavada 4 veces con 300 µL de PBS-Tween 20.

Cuadro 5. Distribución del antígeno ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en placa de 90 pozos para su titulación.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>B</b>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<b>C</b>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
<b>D</b>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
<b>E</b>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>F</b>	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
<b>G</b>	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
<b>H</b>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

La prueba se realizó utilizando para cada dilución del antígeno los sueros control positivo y negativo contenidos en el estuche comercial y los sueros de campo con asilamiento positivo y negativo; se hicieron diluciones quíntuples por duplicado hasta completar una placa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Distribución de los sueros control en la placa para la prueba de ELISA.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:50	ctrl pos	ctrl pos	ctrl neg	ctrl neg	B24	B24	D3	D3	T3	T3	SLP10	SLP10
1:250	ctrl pos	ctrl pos	ctrl neg	ctrl neg	B24	B24	D3	D3	T3	T3	SLP10	SLP10
1:1250	ctrl neg	ctrl pos	ctrl neg	ctrl neg	B24	B24	D3	D3	T3	T3	SLP10	SLP10
1:6250	ctrl neg	ctrl pos	ctrl neg	PBS	B24	B24	D3	D3	T3	T3	SLP10	SLP10
1:50	BFS	ctrl pos	B23	B23	D7	D7	T1	T1	G5	G5	SLP12	SLP12
1:250	BFS	ctrl pos	B23	B23	D7	D7	T1	T1	G5	G5	SLP12	SLP12
1:1250	PBS	ctrl pos	B23	B23	D7	D7	T1	T1	G5	G5	SLP12	SLP12
1:6250	PBS	Blanco	B23	B23	D7	D7	T1	T1	G5	G5	SLP12	SLP12

Como conjugado se utilizó una anti-IgG ovina (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit AntiSheep IgG (H+L) code: 313-035-003) a una dilución de 1:1000; finalmente y con el objetivo de tener una mejor lectura, se realizó la lectura con el sustrato Orto-Fenilenediamina (OPD) (Sigmafast OPD cat. No. P9187-50SET), realizando la lectura con un filtro 450 nm.

Para determinar la sensibilidad y el punto de corte se realizó la prueba de ELISA a 10 sueros de cabras con aislamiento positivo y a 10 sin historia de aborto, serología y aislamiento negativos.

El punto de corte se determinó sumando una desviación estándar al promedio de los sueros control negativo y restando una desviación a los controles positivos.

Para determinar la especificidad de la prueba, se realizó un perfil comparativo con sueros positivos y negativos a enfermedades que afectan a los caprinos: brucelosis, leptospirosis y pasteurelisis; estos sueros forman parte de un banco de muestras del CENID-Microbiología Animal, INIFAP del Departamento de Bacteriología.

Una vez encontrada la dilución óptima tanto de antígeno como de suero a utilizar, fueron sensibilizadas diez placas para trabajar las muestras de campo previamente analizadas con el estuche comercial utilizado para el diagnóstico de *C. abortus*.

### **5.7 Adsorción de sueros para descartar posibles reacciones cruzadas**

Con la finalidad de eliminar la presencia de anticuerpos inespecíficos y su vez detectar posibles reacciones cruzadas en los sueros utilizados para la prueba de ELISA, una muestra de éstos fue adsorbida con cepas bacterianas heterólogas y con modificaciones, en base a lo descrito por Lancefield. <sup>89, 90</sup>

En base a los requerimientos, fueron sembradas en medios de cultivo diferentes cepas de microorganismos; el Cuadro 7, describe cada una de ellas y el origen de las mismas.

Cuadro 7. Microorganismos utilizados para realizar las adsorciones de los sueros.			
Microorganismo	Cepa	Origen	Medio de cultivo empleado
<i>Salmonella enterica</i>	Serovariedad Cholerasuis	FMVZ, Depto. De Bacteriología	Agar sangre
<i>Brucella melitensis</i>	16M	CENID-Microbiología Animal, INIFAP	Agar Tripticasa Soya
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Serotipo A2	CENID-Microbiología Animal, INIFAP	Agar sangre
<i>Leptospira</i>	Serovariedad Hardjo	UAM-Xochimilco	Medio EMJH suplementado(DIFCO™)

Cada una de las bacterias se dejó el tiempo necesario para su crecimiento, *Salmonella entérica cholerasuis* y *Mannheimia haemolytica*, 24 horas a 37° C, *Brucella* 5 días a 37° C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y *Leptospira* 3 días a 37° C.

Una vez crecidas, fueron cosechadas en solución salina fisiológica (SSF) e inactivadas durante una hora a 56° C; posteriormente se mezclaron dos partes de suero sin diluir con una solución de bacterias suspendidas en 1mL de PBS 1 x y

se incubaron a 37° C durante media hora en agitación constante. Transcurrido el tiempo, los sueros fueron centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos,<sup>17</sup> la pastilla que contenía las bacterias fue eliminada y el suero sobrenadante se diluyó a la concentración óptima para correr nuevamente el ELISA; los resultados obtenidos, fueron comparados con los que se obtuvieron para titular la prueba.

### **5.8 Análisis estadístico**

Para determinar la validez de la prueba, fue utilizado el cálculo de índice de concordancia de Kappa, esto, mediante el grado de acuerdo encontrado entre los resultados obtenidos con la prueba de ELISA evaluada y los resultados obtenidos con la comercial.<sup>72</sup>

Para determinar si existía o no diferencia significativa entre las muestras al ser adsorbidas con diferentes cepas bacterianas de cuando no lo eran, se hizo la prueba ANOVA (por sus iniciales en inglés) o de varianza, con un nivel de significancia  $\alpha$  del 5 % ( $p < 0.05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Multiplicación de *Chlamydia abortus* en saco vitelino de embrión de pollo y en cultivos celulares

Con la infección del saco vitelino de embriones de pollo, se logró la reactivación de la cepa A22 de *C. abortus*, que fue almacenada a  $-80^{\circ}$  C en una solución de sacarosa al 5% hasta su uso; el paquete de bacterias que se obtuvo, se utilizó posteriormente para infectar la línea celular L929 de fibroblastos de ratón; esto con el objetivo de producir un extracto crudo que fue utilizado como antígeno en el ELISA-I.

### 6.2 Determinación de la presencia de *C. abortus* en saco vitelino de embrión de pollo y cultivos celulares.

Se determinó la presencia de la bacteria tanto en los sacos vitelinos como en los cultivos infectados mediante frotis; en la Figura 12 se muestra un extendido de células infectadas y teñidas con la técnica de Stamp<sup>12</sup>; también se utilizó la prueba de IFD para comprobar la presencia de antígeno clamidial en ambos casos; en la Figura 13 se muestra un cultivo positivo a esta prueba.

La elección de sacos vitelinos infectados se realizó en base a los cambios vasculares presentes y mediante la valoración de los frotis según la cantidad de bacterias observadas, seleccionando aquellos que obtuvieran un puntaje entre 4 y 5, estas muestras fueron purificadas y utilizadas como cepa viable para infección de cultivos celulares.

Se obtuvo la cosecha de un total de 10 botellas infectadas con la cepa A22 de *C. abortus*; su presencia en los cultivos celulares fue determinada mediante frotis y la prueba de IFD, resultando positiva la infección. Los cultivos se procesaron para purificar e inactivar el microorganismo, obteniendo a partir de éste, el extracto crudo que fue titulado y utilizado como antígeno para el ELISA-I.



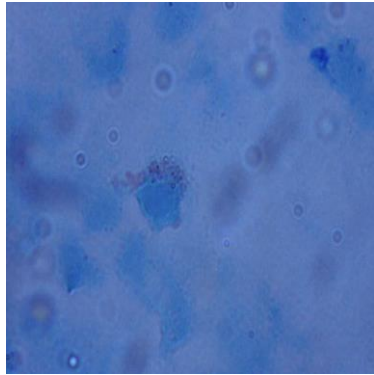


Figura 12. Frotis de células L-929 infectadas con *C. abortus* y teñidas con la técnica de Stamp.

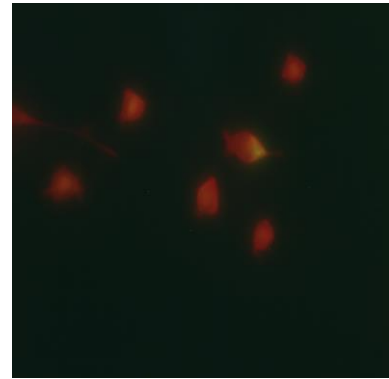


Figura 13. Frotis de células L929 infectadas. Técnica de IFD.

### 6.3 Antigenicidad y pureza del extracto crudo obtenido a partir de *C. abortus*.

El resultado a la prueba de Dot Blot se muestra en la Figura 14, donde se observan dos membranas que fueron impregnadas con el extracto crudo purificado y con sueros control positivo y negativo a clamidiosis, ambos, del estuche comercial.

Con respecto a la pureza del extracto crudo, resultó negativo al crecimiento de contaminantes.

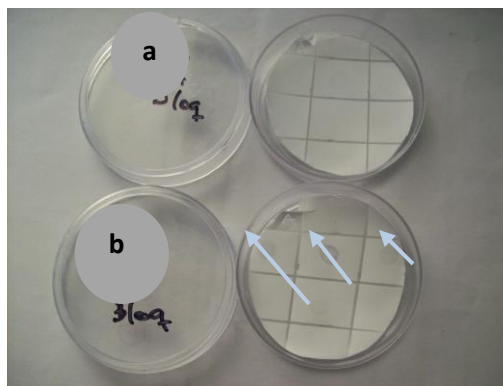


Figura 14. Membranas de nitrocelulosa negativa (a) y positiva (b) a la prueba de Dot Blot; la membrana señalada con la letra "a", se trató con suero control negativo mientras que la señalada con la letra "b", con suero control positivo; las flechas muestran el reconocimiento de los anticuerpos hacia el antígeno.

## **6.4 Estandarización de la prueba de ELISA-I**

### **6.4.1 Determinación de la concentración del antígeno por la microtécnica de Bradford.**

El extracto crudo obtenido, con la técnica de Bradford, presentó una concentración proteica de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### **6.4.2 Titulación del antígeno**

Se hicieron diferentes diluciones del antígeno y los resultados de las lecturas obtenidas se muestran en la Figura 15. Se obtuvo una buena respuesta a todas las concentraciones, con el suero diluïdos a 1:20, sin embargo, como el rendimiento final del antígeno obtenido fue de 3.0 mL, se optó por trabajar con la concentración de 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , esto con el objetivo de hacer rendir el extracto crudo obtenido.

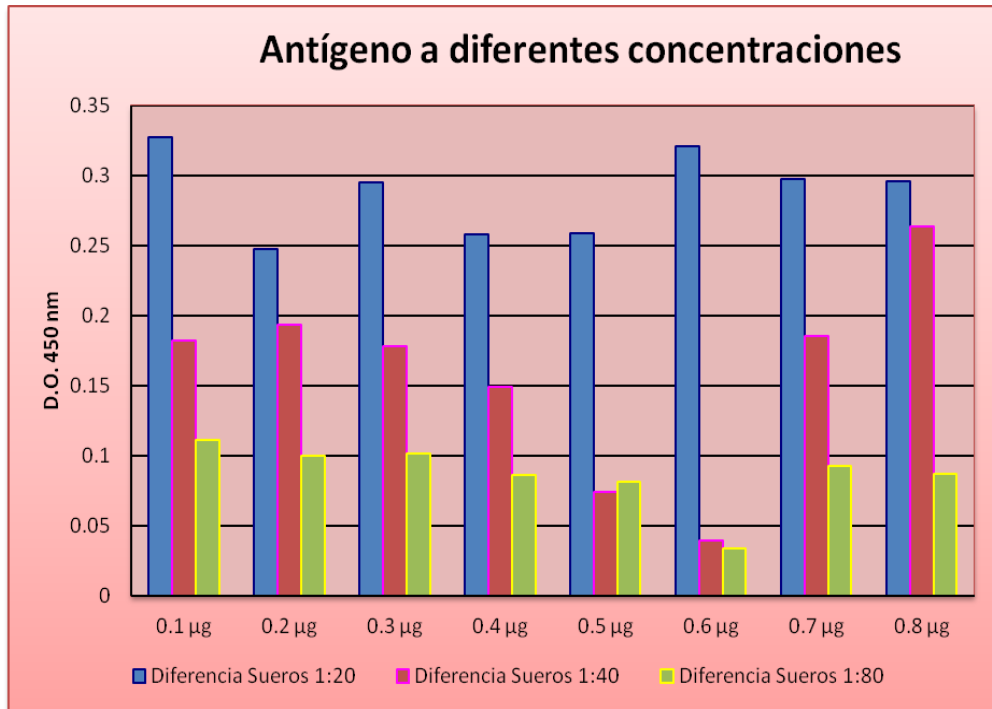


Figura 15. Densidad óptica (D.O.) de las diferentes diluciones del antígeno, enfrentadas a tres concentraciones diferentes de sueros control positivo y negativo; se puede observar buen comportamiento para las diferentes diluciones, sin embargo, la dilución seleccionada fue de 0.2 µg/µL.

### 6.4.3 Titulación del suero

Se hicieron 4 diluciones quíntuplas a partir de 1:50 hasta 1:6250, tanto de los sueros control positivo y negativo del estuche comercial como de 9 sueros de campo, también positivos y negativos al estuche, los resultados obtenidos se muestran en el Figura 16, la concentración que se consideró como óptima fue la de 1:50, esto debido a que las demás diluciones no muestran diferencias entre los sueros control positivo y aquellos que fueron negativos al estuche comercial. La concentración del antígeno utilizada fue la que se consideró como óptima (0.2 µg/µL) en la prueba anterior.

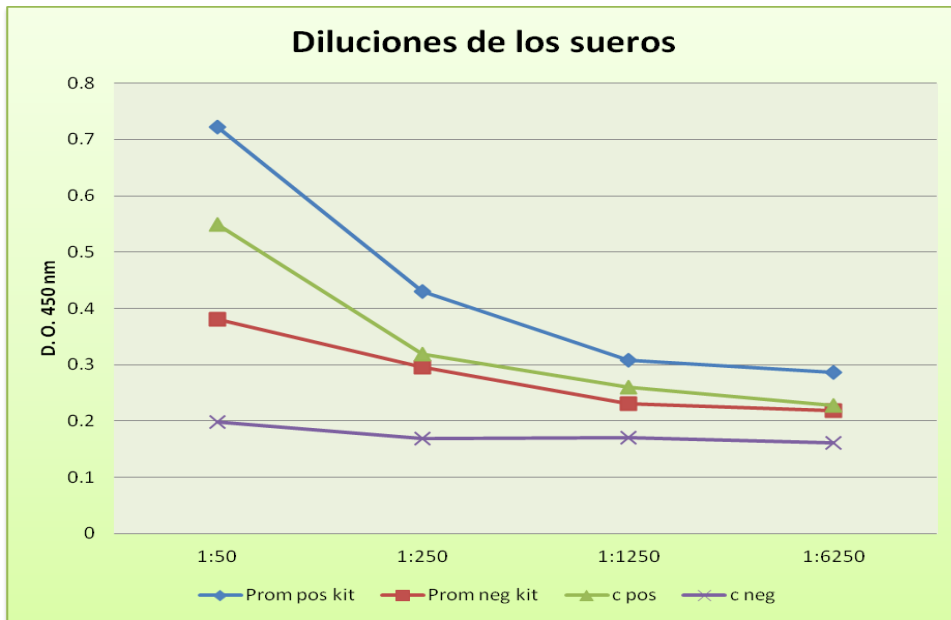


Figura 16. Lectura de las diluciones de los sueros; la dilución utilizada fue de 1:50, debido a que en las siguientes no se observa diferencia entre los sueros control positivo y negativo.

Para determinar el punto de corte se utilizaron como sueros control positivo, 10 sueros que resultaron positivos al estuche comercial y que además provenían de animales con aislamiento y PCR positivos a *Chlamydia abortus*<sup>17</sup>; para ello se restó al promedio de los sueros control positivo una desviación estándar, de este modo, aquellas muestras cuya lectura de D.O. estuviera por encima de 0.741, fueron consideradas como positivas y el punto de corte para los negativos, se determinó sumando una desviación estándar al promedio de los sueros control negativo, así, aquellas muestras que tenían lecturas en D.O. inferiores a 0.695 fueron consideradas como negativas; cabe señalar que aquellas muestras que quedaban entre 0.695 y 0.741 D.O. fueron consideradas como sospechosas. El Cuadro 8, muestra un resumen de los resultados obtenidos para calcular el punto de corte.

<b>Cuadro 8. Resultados obtenidos para el cálculo del punto de corte tanto para sueros positivos como para negativos.</b>				
<b>Resultado del estuche comercial</b>	<b>Total de muestras</b>	<b>Promedio D.O.</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Resultado más/menos una desviación estándar (nm)</b>
<b>Positivo</b>	10	0.9052	0.1642	0.741
<b>Negativo</b>	10	0.5046	0.1909	0.695

Para el cálculo de la sensibilidad, se realizó una prueba de concordancia entre el estuche comercial y el ELISA-I desarrollado y se incluyeron los resultados obtenidos con las 20 muestras control (10 positivas y 10 negativas).

La sensibilidad de la prueba fue de 75%, mientras que la especificidad calculada considerando las mismas muestras fue de 66.6%.

El índice de concordancia entre el estuche comercial y el ELISA diseñado, fue de 0.4, valor que se interpreta como moderado.

De un total de 20 muestras, 7 fueron verdaderas positivas, 3 falsas positivas, mientras que 2 fueron falsas negativas y 8 verdaderas negativas. La prueba tiene una validez calculada del 70%. En la Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos de acuerdo a la tabla de concordancia.

Cuadro 9. Resultados obtenidos en base al diseño de Cohen y a partir de los cuales se calcularon la sensibilidad, especificidad y validez de la prueba diseñada.				
		ESTUCHE COMERCIAL		TOT
		POS	NEG	
ELISA-I DESARROLLADA	POS	7	3	10
	NEG	2	8	10
	TOT	9	11	20

#### 6.4.4 Resultados obtenidos a partir de las muestras de diferentes rebaños (estudio de campo).

A partir del punto de corte obtenido con las muestras consideradas como control positivo y negativo, se determinaron los resultados para los sueros obtenidos de animales de diferentes rebaños de cuatro estados de la república (Guanajuato, Guerrero, San Luis Potosí y Tlaxcala); estas muestras ya habían sido evaluadas con el estuche comercial; también se les hizo la prueba de tarjeta al 3% para diagnóstico de brucelosis, resultando negativas las pertenecientes a los estados de Guanajuato, Guerrero y San Luis Potosí, mientras que en las de Tlaxcala, se encontró un 84% de seropositividad (Tarjeta al 3%), de los cuales solo el 1.85% resultó positivo a la prueba de inmunodifusión radial, prueba que permite detectar animales infectados a *Brucella*.

El Cuadro 10, muestra un comparativo entre los resultados obtenidos con el ELISA-I desarrollado y el estuche comercial. Las lecturas están expresadas en D.O. y la proporción de positivos, negativos y sospechosos en porcentaje.

Las muestras provenían de diferentes estados de la república y se trabajaron previamente con el estuche comercial; de 129 muestras originarias del estado de Guanajuato, 55 resultaron positivas al ELISA-I desarrollado, 66 muestras

negativas y 11 sospechosas; en comparación con el estuche comercial, hubo una diferencia de 28 sueros positivos, es decir, el 21.7% de los sueros de Tlaxcala, 67.5% de las muestras resultó positiva a la prueba desarrollada y solamente el 11.9% al estuche comercial; para el caso de los estados de San Luis Potosí y Guerrero, únicamente se contaba con muestras positivas y negativas a la prueba comercial respectivamente, por lo que se compararon únicamente los positivos para SLP resultando en un 61% de las 34 muestras trabajadas, mientras que para Guerrero, sólo el 6.6% de las 30 muestras, resultaron negativas al ELISA-I estandarizado; del total de las sueros trabajados (344), el 31.10% resultaron positivos al estuche comercial y el 50.87% a la prueba desarrollada; 70.63% fueron negativas a la prueba comercial y 34.30% a la desarrollada.

**Cuadro 10. Resultados obtenidos con el ELISA-I desarrollado y el estuche comercial**

Procedencia de las muestras (Estado)	No. de muestras	Promedio positivos a ELISA-I desarrollado (D.O.)	Promedio sospechosos a ELISA-I desarrollado (D.O.)	Promedio Negativos a ELISA-I desarrollado (D.O.)	% Positivos ELISA-I	% Positivos estuche comercial	% Sospechosos ELISA-I	% Sospechosos estuche comercial	% Negativos ELISA-I	% Negativos estuche comercial
<b>Guanajuato</b>	129	0.895	0.730	0.523	42.6	20.9	6.2	8.5	51.1	70.5
<b>Guerrero*</b>	30	0.954	0.711	0.441	83.3	0**	10	0	6.6	100
<b>SLP*</b>	34	0.843	0.712	.595	61.7	100	8.8	0	29.4	0**
<b>Tlaxcala</b>	151	0.903	0.688	0.502	67.5	11.9	5.9	7.2	26.4	80.7

\*Muestras obtenidas de un banco de sueros y procesadas en trabajos previos.

\*\* Todos los sueros eran negativos al estuche comercial.

\*\*\* Todos los sueros eran positivos al estuche comercial.



#### 6.4.5 Adsorción de muestras control

No se observó una diferencia significativa entre los sueros que se trabajaron antes de la adsorción como aquellos que fueron adsorbidos con diferentes bacterias Gram negativas.

La barra naranja muestra un comparativo de la D.O. obtenida en los sueros cuando se trabajaron junto con el resto de las muestras procesadas, mientras que la barra azul, muestra el resultado obtenido de las mismas muestras sin adsorber y trabajadas a la par con los sueros que fueron adsorbidos; no hubo diferencia significativa entre ambos; por lo que se descarta la posible reacción cruzada con otros microorganismos, (Fig. 17).

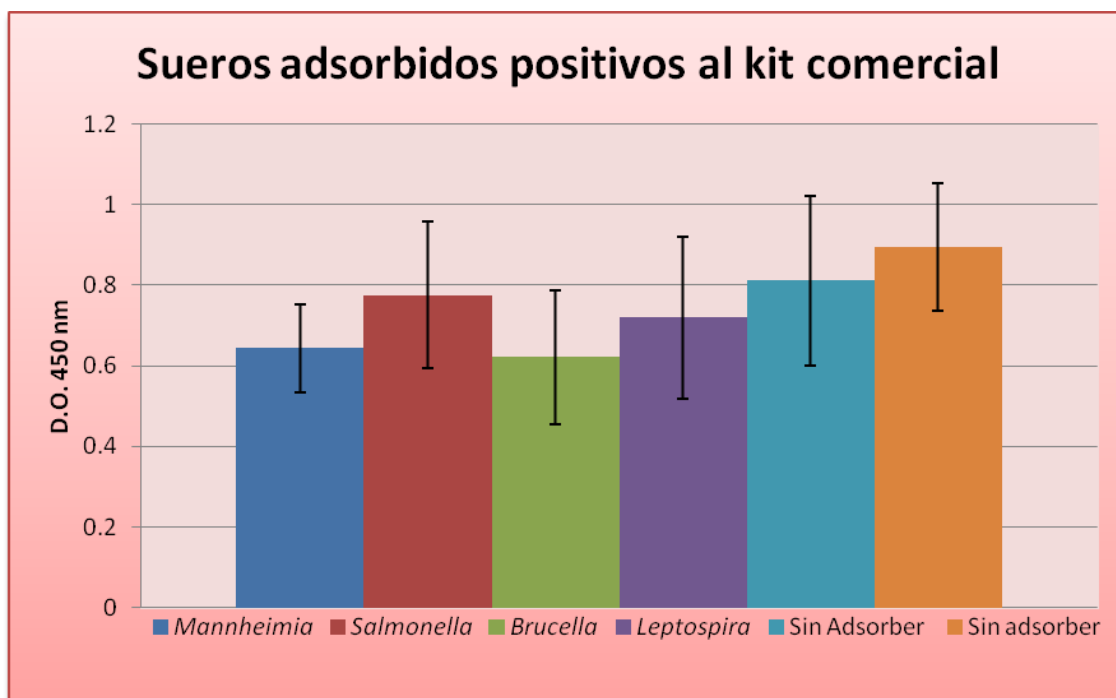


Figura 17. Comparativo entre muestras adsorbidas y sin adsorber; estos sueros eran de animales con aislamiento y PCR positivos a *C. abortus*, así como también a la serología tanto del estuche comercial como de la prueba desarrollada.

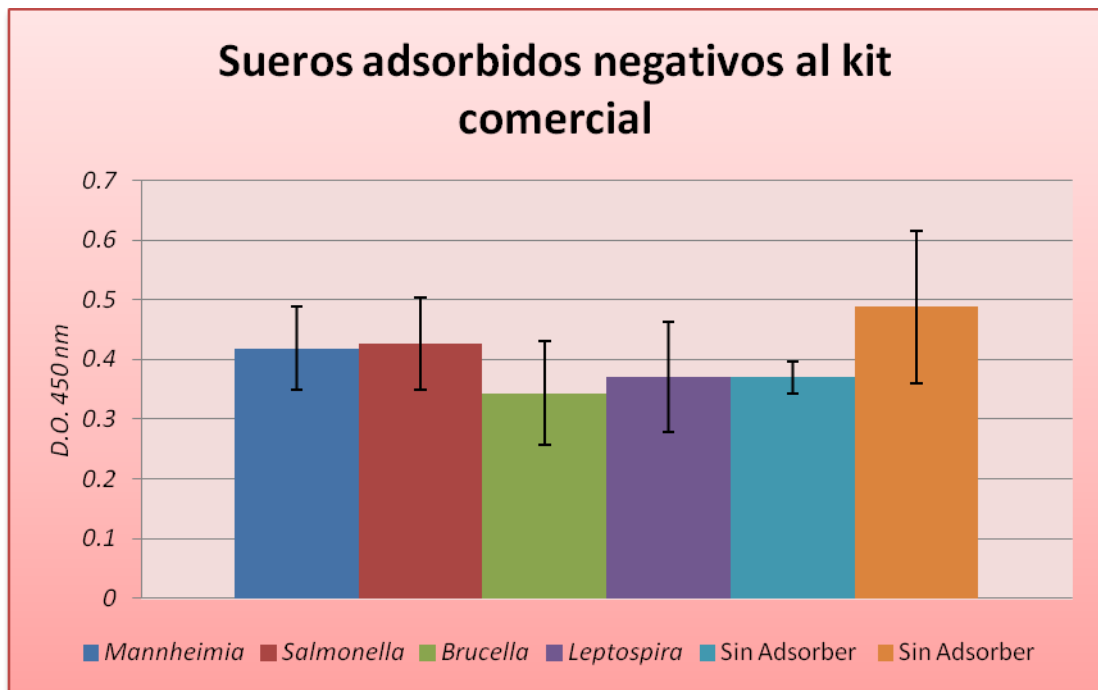


Figura 18. Comparativo entre muestras adsorbidas y sin adsorber; los animales de estos sueros eran negativos al aislamiento y PCR, así como también a la serología tanto del estuche comercial como de la prueba desarrollada.

La Figura 18, muestra el promedio en D.O. de las lecturas realizadas para los sueros control negativo que fueron adsorbidos y su comparativo con las mismas muestras antes de ser adsorbidas; el resultado del análisis de ANOVA, demostró que no existe variación significativa en el promedio de las medias de las muestras al ser adsorbidas que cuando no lo eran, por lo que se descarta posible reacción cruzada con otras bacterias Gram negativas.

## 7 DISCUSIÓN

El antígeno que se utilizó en este trabajo fue un extracto crudo de la bacteria obtenida de cuerpos elementales de la cepa A22 de *C. abortus*, propagada en embriones de pollo y cultivos celulares; estos métodos son similares a los utilizados por Buendía (2001), Rekiki (2003) y Ortega (2005), que se valieron de estos medios para crecer a la bacteria utilizándola como antígeno en sus pruebas o bien para el desarrollo de sus diseños vacunales.<sup>8, 72, 91</sup> Para ser aislada y/o propagada la bacteria, se requiere de técnicas de cultivo en medios biológicos como los embriones de pollo o bien líneas celulares;<sup>92</sup>

Para determinar la presencia de la bacteria a partir de saco vitelino y cultivos infectados, se utilizaron las tinciones de Stamp y Giménez estas técnicas fueron empleadas por Szeredi *et al.* (2003); Rodolakis, (2001); Buendía (2001); Marques *et al.* (2010) y están descritas en el Manual de pruebas de diagnóstico de la OIE (2004), en éste último, se describen las características para la identificación adecuada del microorganismo.<sup>2, 3, 28, 72, 93, 94</sup>

La presencia del antígeno clamidial, fue determinada por IFD y dot blot; lo que coincide con lo señalado en el Manual de Pruebas de Diagnóstico Estandarizadas y Vacunas de la OIE (2004), que recomienda el uso de pruebas con anticuerpos fluorescentes.<sup>2</sup> Por otro lado, la técnica de Dot blot se ha evaluado en diferentes trabajos como alternativa diagnóstica y como prueba complementaria en investigación, principalmente para determinar la presencia del LPS clamidial, en particular de *C. trachomatis*; en la mayoría de estos trabajos ha resultado ser una prueba altamente sensible para detectar el antígeno clamidial en muestras clínicas.<sup>95, 96, 97</sup>

Para poder utilizar de forma segura el antígeno elaborado, fue necesario inactivarlo con 2-Bromoethylamine-hydrobromide (BEI), que actúa sobre ácidos nucleicos, sin afectar las proteínas antigénicas; Ortega en (2005), evaluó tres

protocolos de inactivación de antígeno clamidial, obteniendo mejores resultados con el uso de este reactivo ya que favorecía la conservación de gran número de epítomos protectores así, lo cual fue demostrado en ratones que presentaron menos carga bacteriana en bazo al ser inmunizados y posteriormente infectados con *C. abortus*.<sup>4</sup>

En este trabajo se utilizó la cepa A22 para obtener el extracto crudo que posteriormente fue empleado como antígeno, esta cepa es considerada como altamente invasiva y originalmente aislada a partir de un aborto ovino;<sup>98</sup> Layanchi *et al.*, determinaron en su estudio que los antígenos específicos encontrados en cepas invasoras, podrían ser utilizados para el diagnóstico de la clamidiosis abortiva, esto al confirmar la ausencia de antígenos específicos como familia de proteínas de 80-90 kDa, en cepas no invasoras y su presencia en las invasoras.<sup>98</sup>

La cantidad de masa antigénica obtenida fue baja y se debe básicamente a las características de desarrollo de bacterias del género *Chlamydia*, que requieren forzosamente de medios biológicos para multiplicarse. El factor que normalmente influye en la producción baja de masa antigénica, es el procedimiento de purificación de la bacteria descrito por varios autores como Salinas *et al.* (2009), ya que al emplear métodos como la ultracentrifugación diferencial, se puede perder una cantidad considerable de antígeno cuando no se alcanzan las velocidades indicadas en estos protocolos ya estandarizados, en este caso, sí se disponía de una ultracentrifuga que llegaba a la velocidad requerida, pero, no se contaba con el producto comercial “Urografin®” utilizado por Nieves (2005) donde los rendimientos en masa antigénica fueron altos. El principio activo del “Urografin®” es el amidotrizoato sódico y meglumínico, solución que, debido a su densidad, favorece la formación de dos fases; el Ioditras®t, que es el reactivo con el que se contaba, pese a que el principio activo era el mismo, variaba en sus concentraciones, situación que pudo influir al hacer la purificación o concentración del extracto crudo.

Otro factor que pudo estar involucrado en la producción y concentración de masa antigénica fue el proceso de liberación de las bacterias de las células; diversos autores mencionan la sonicación de los cultivos para lograr la ruptura celular y de este modo liberar las bacterias contenidas al interior de las células, sin embargo, dada las características de la enfermedad en el país y el potencial riesgo zoonótico, no se pudo realizar este procedimiento y se suplió por la congelación y descongelación de los cultivos infectados donde muchas células, pudieron perderse sin haber sido rotas al momento de la primer centrifugación.

El objetivo principal, fue el desarrollo de un ELISA-I y comparar sus resultados, con los obtenidos a partir de un estuche comercial, mismo que se usó como prueba de referencia; del mismo modo, Buendía *et al.* (2002), evaluaron una prueba de ELISA disponible comercialmente; ellos usaron como prueba de referencia la técnica de microinmunofluorescencia (MIF) y compararon los resultados obtenidos con el estuche comercial, las pruebas de FC y un ELISA estandarizada por ellos. Para el caso de la MIF, usaron un antígeno obtenido a partir de las cepas AB7 de *C. abortus* y la iB1 de *C. pecorum*; para la prueba de FC el antígeno usado fue un LPS obtenido a partir de suspensiones no purificadas de clamidias; mientras que para la prueba de ELISA se utilizó un antígeno a base de CE purificados por la técnica de centrifugación diferencial con amidotriazoato sódico y meglumínico; <sup>72</sup> en este estudio, se utilizó dicha técnica para la elaboración del antígeno.

En otros trabajos donde se hicieron comparaciones de pruebas diagnósticas donde se utilizaron también CE como antígeno en las técnicas de ELISA (competitivas o indirectas) que fueron estandarizadas en los diferentes laboratorios, tal es el caso de Salinas *et al.* (2009), Buendía *et al.* (2001), Longbottom *et al.* (2001), Wilson *et al.* (2009), entre otros; lo que coincide con el tipo de antígeno (CE purificados) que se utilizó en la prueba de ELISA-I que se diseñó en este trabajo.

Para el desarrollo del ELISA-I, se siguió la metodología descrita por Salinas y Wilson *et al.*; <sup>78</sup> la concentración que se utilizó para el antígeno utilizado fue de 2 µg/mL; esta concentración ya había sido utilizada por Salinas *et al.* (2009) en trabajos previos <sup>99</sup>; en otros estudios donde también se diseñaron pruebas de ELISA, utilizaron concentraciones diferentes, tal es el caso de Buendía *et al.*, cuya concentración de antígeno fue de 8 µg/mL <sup>72</sup>; Ortega (2005) en su trabajo empleó una concentración de 5 µg/mL <sup>4</sup> y Longbottom que estandarizó un ELISA de tipo competitivo, sensibilizando sus placas de poliestireno con 0.1 µg/µL; sin embargo y dado que la producción de antígeno es un proceso relativamente complejo, se optó por trabajar con la dilución de 0.2 µg/µL, <sup>99, 100</sup> no obstante, se obtuvieron buenas lecturas de D.O. con concentraciones más elevadas. Donn *et al.* (1997), en su proceso de estandarización, aumentaron la dilución de los sueros positivos, ya que las densidades ópticas obtenidas en los sueros de los rebaños negativos, eran aproximadamente 4 veces superiores a las obtenidas en los sueros negativos estándar; <sup>94</sup> dado que los resultados obtenidos de los sueros en un primer ensayo en este trabajo, no diferían mucho entre el control positivo y el negativo, también se aumentó la dilución de éstos para obtener mejores lecturas y facilitar de este modo el establecimiento del punto de corte.

Para determinar el punto de corte, se utilizaron como controles positivo y negativo los sueros contenidos en el estuche comercial y 20 muestras de campo que resultaron tanto positivas como negativas a la prueba comercial; lo que concuerda con el trabajo de Wilson *et al.*, quienes emplearon como controles positivos y negativos los sueros contenidos en los estuches comerciales que estudiaron, así como también muestras de animales cuyo origen era de rebaños con historia de aborto y/o sin problemas de tipo reproductivo (positivos y negativos respectivamente); <sup>72, 78</sup> el cálculo del punto de corte se estableció restando y sumando una desviación estándar al promedio de las densidades ópticas obtenidas con los sueros control positivo y negativo respectivamente; la razón, es

que esto permitía el establecimiento de un rango intermedio para obtener así resultados considerados como sospechosos y de este modo, aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba. En otros trabajos, se ha establecido el punto de corte sumando hasta tres desviaciones estándar al promedio de las densidades ópticas obtenidas de los sueros control positivo y negativo.<sup>72, 100</sup>

La sensibilidad obtenida en este estudio fue del 75%; Salinas *et. al* (2009), obtuvieron una sensibilidad del 93.7% en su prueba, donde utilizan CE purificados como antígeno, mientras que Buendía *et al.* obtuvieron una sensibilidad del 95% en la misma técnica. Con lo que respecta a la especificidad de la prueba, en el caso de Salinas, fue del 100%; para Buendía del 54.2%, similar a lo ocurrido en este trabajo, donde disminuyó considerablemente (66.6%) con respecto a la obtenida por Salinas,<sup>72, 99</sup> esto puede deberse a la naturaleza del antígeno utilizado, como es a base de CE, cuenta con gran cantidad de LPS que, es común a todas las especies de clamidias, pudiendo ser fuente de reacciones cruzadas entre éstas; además, el uso de antígenos homólogos y heterólogos influye en los resultados de estas pruebas, no obstante y muy a pesar de esta característica indeseable del LPS, éste, ha sido el antígeno más utilizado en la mayoría de las pruebas para la detección de anticuerpos contra *C. abortus*.

La prueba que se utilizó como referencia y con la que se compararon los resultados obtenidos del ELISA-I desarrollado fue un ELISA-I comercial que se basa en un antígeno recombinante, proteína que pertenece a la familia de proteínas de 80-90 kDa, es altamente inmunógena y contiene determinantes antigénicos con especificidad de *C. abortus*,<sup>16, 4, 72</sup> lo que permite distinguir animales infectados con *C. abortus* de aquellos que puedan estar infectados por *C. pecorum*, además de descartar también toda posibilidad de detectar animales infectados con otro tipo de bacterias; por lo que la sensibilidad y especificidad de estas pruebas resulta ser muy alta, en comparación con la obtenida en este estudio.

Buendía *et al.* compararon este mismo estuche con tres pruebas más: microinmunofluorescencia (MIF) como referencia, ya que es capaz de diferenciar entre *C. abortus* de *C. pecorum*; FC, cuyo antígeno es a base de LPS y es la recomendada por la OIE y la prueba de ELISA-I cuyo antígeno es a base de CE purificados, obteniendo una concordancia del 78.2% entre la prueba de ELISA-Chlamydia con ELISA-EB (cuerpos elementales por su nombre en inglés), mientras que el valor obtenido en la prueba diseñada en este trabajo fue de 0.4, valor considerado moderado de acuerdo al índice de Kappa, lo que coincide con el estudio realizado por Trávniček *et al.* en 2002, quienes del mismo modo, compararon un ELISA-I con la prueba de FC, obteniendo un índice de Kappa de 0.426,<sup>72, 99, 101</sup> la ventaja de estas pruebas, es precisamente la naturaleza de sus antígenos, ya que al ser proteínas específicas y recombinantes, facilitan su producción en gran escala, situación que se complica con aquellos antígenos producidos a partir de medios de cultivos rutinarios y que son a base de CE.

El uso de un extracto crudo de *C. abortus*, resulta ser de utilidad para determinar la presencia de anticuerpos anticlamidiales; sin embargo, es recomendable hacer estudios en conjunto del estatus reproductivo de los rebaños y la asociación que pueda darse a la presencia de abortos dentro de las unidades de producción, ya que la presencia de otras especies del mismo género, como *C. pecorum*, pueden interferir con el diagnóstico.

La especificidad de la prueba del ELISA desarrollado en el presente trabajo considerando la reactividad cruzada a diferentes microorganismos fue buena debido a que en las adsorciones realizadas de sueros positivos y negativos a *Chlamydia* con bacterias Gram negativas, no se observó diferencia significativa entre los resultados obtenidos con los sueros que fueron adsorbidos con aquellos que no lo fueron. En el manual de Pruebas de Diagnóstico Estandarizadas y Vacunas de la OIE, se enlistan una serie de microorganismos que pudieran interferir en el diagnóstico de la clamidiosis, tal es el caso de *Toxoplasma gondii*



(por el tipo de lesiones en cotiledones), brucelosis, coxielosis, campilobacteriosis, listeriosis y salmonelosis<sup>2</sup>; la presencia de diferentes reacciones cruzadas y sitios antigénicos específicos dentro de los epítopes de *Chlamydia* han sido demostrados mediante las pruebas de hemólisis pasiva, inhibición de la hemólisis pasiva y experimentos de adsorción con un antisuero producido contra el LPS de los CE de *C. trachomatis* L2. Estos estudios demostraron que la reacción cruzada de anticuerpos podría ser absorbida con el LPS de la cepa de *Salmonella* entérica serovar Minnesota Re595, mientras que la especificidad de *Chlamydia* se mantenía sin afección alguna<sup>19</sup>;

Teniendo en cuenta que la enfermedad es considerada como exótica y que en México no existen pruebas para su diagnóstico rutinario, la técnica aquí diseñada, puede ser una alternativa que coadyuve a determinar el estatus de la enfermedad; también resulta importante, ya que al contar con una prueba sencilla de realizar, además de que podría montarse en los laboratorios de diagnóstico, también se podría contribuir de manera eficaz a un diagnóstico oportuno de las infecciones por *Chlamydia*, lo que ayudará a prevenir y limitar la propagación de la enfermedad<sup>99</sup> mediante la detección de los rebaños infectados.

## 8 CONCLUSIONES

- La cepa A22 de *Chlamydia abortus* fue reactivada de forma satisfactoria en embriones de pollo y posteriormente, para la producción de un extracto crudo, fue propagada en cultivos celulares.
- La técnica empleada para purificar los cuerpos elementales, resultó eficiente para el desarrollo de este trabajo, por lo que se recomienda para la purificación de cultivos y embriones de pollo infectados con este microorganismo.
- La presencia de la bacteria en cultivos y embriones de pollo infectados, fue demostrada mediante las tinciones de Stamp y Gimenez, así como por pruebas inmunológicas como Dot blot e inmunofluorescencia directa.
- Se logró desarrollar una prueba de ELISA-I a partir de un extracto crudo producido en la línea celular L929 de fibroblastos de ratón, mismo que fue utilizado como antígeno; esta prueba tuvo un índice de concordancia de 0.4, valor considerado como moderado.
- La sensibilidad calculada para esta prueba fue del 75% y la especificidad del 66.6%, por lo que la prueba puede ser utilizada como herramienta “tamiz” para determinar la presencia de anticuerpos en los rebaños con problemas reproductivos así como el comportamiento de la enfermedad.
- Mediante una prueba de adsorción con un grupo de sueros, se descartaron posibles reacciones cruzadas con otros microorganismos como *Brucella melitensis*, *Leptospira hardjo*, *Mannheimia haemolytica* y *Salmonella cholerae suis*.

## 9 APÉNDICE

### 9.1 Medio de cultivo para células L929.

Se utilizó medio D-MEM suplentado con:

Suero fetal bovino	10 %
L-Glutamina	2 mM
Piruvato de Sodio	1 mM

La mezcla se hizo en condiciones estrictas de esterilidad.

### 9.2 Solución de Tripán azul

NaCl	0.81 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.66 g
Azul tripán	0.4 g
Agua destilada	100 mL

Los reactivos se calientan hasta que empiecen a hervir, se deja enfriar, se ajusta el pH a 7.2 y se filtra con 0.45 µm

### 9.3 Amortiguador PBS-Dextrano (PBS-DEAE-D)

Solución concentrada a 100 x:

PBS	100 mL
DEAE-dextrano	1 g

Ajustar pH a 7.2 y esterilizar por filtración (0.22 µm).

### 9.4 Solución de Carbonato-bicarbonato

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
NaCO <sub>3</sub> H	3.93 g
NaN <sub>3</sub>	200 mg
Agua destilada	1 L

El pH se ajusta a 9.6 y se esteriliza a 120° C, 15 min. 15 lb.

### 9.5 Solución de bloqueo

Leche descremada 50 g

Diluir en 1 litro de agua PBS 1 x estéril.

### 9.6 Solución de lavado PBS Tween-20 (0.05 %)

PBS 1x 1 L

Tween 20 (Sigma) 0.5 mL

### 9.7 Solución de Tris-KCL

Tris (Trisma base, sigma) 20 mM 2.42 g

KCl(Sigma) 0.15 M 11.18 g

Aua destilada 1 L

Ajustar pH a 7.5 con HCl 1 N.

### 9.8 Cicloheximida

Cicloheximida 2 µg

Aua destilada estéril 2 mL

En promedio se utilizan 30 µg/ 15 mL de medio con células infectadas, es decir, 150 µL para 15 mL de medio, cantidad suficiente para 2-3 botellas de 75 cm, disponiendo en cada una 5 mL de solución.

### 9.9 Ioditrast®

Tris KCl

Solución de Ioditrast

### 9.10 2 Bromoethylamine-hdrobromide (BEI) 30 %

BEI	0.3 g
-----	-------

Agua destilada estéril	1 mL
------------------------	------

Se agregan 30 µL de BEI por cada 2 mL de Ag.

#### **9.11 Solución de Tris NaCl**

Tris base	1.2 g
-----------	-------

NaCl	8.7 g
------	-------

Aua destilada estéril cbp	1000 mL
---------------------------	---------

#### **9.12 4-cloro-1 naftol**

4-cloro-1 naftol	0.03 g
------------------	--------

Metanol	10 mL
---------	-------

Tris NaCl cbp	50 mL
---------------	-------

Agregar 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al momento de utilizarse.

#### **9.13 Solución madre para tinción de Stamp**

Fucsina básica	10 g
----------------	------

Etanol 96 °	100 mL
-------------	--------

#### **9.14 Solución de trabajo (solución hija) para tinción de Stamp**

Solución madre	10 mL
----------------	-------

Ácido fénico	5 g
--------------	-----

Agua destilada	90 mL
----------------	-------

#### **9.15 Solución ácido acético al 0.05 %**

Ácido acético	0.005 mL
---------------	----------

Agua destilada estéril cbp	100 mL
----------------------------	--------

**9.16 Verde de malaquita al 3 %**

Verde de malaquita	3 g
Agua destilada estéril cbp	100 mL

Diluir bien el colorante y filtrar.

**9.17 Amortiguador de fosfatos (PBS 2 x)**

NaCl	16 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.68 g
H <sub>2</sub> O cbp	1000 mL

**9.18 Tiosulfato de sodio al 30 %**

Tiosulfato de sodio	0.3 g
PBS 1 x	1 mL

## 10 Literatura citada

1. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.*, 2003; 128: 217–244.
2. OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal). Clamidiosis ovina. En: Manual de pruebas de diagnóstico estandarizadas y vacunas. 4ed. París: OIE, 2000. Aprobado en 2004. Disponible en: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.4.07\\_Aborto\\_enzootico\\_d\\_e\\_las\\_ovejas.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.4.07_Aborto_enzootico_d_e_las_ovejas.pdf)
3. Rodolakis A. Clamidiosis en Cabras. International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) 2001.
4. Ortega N. Diseño de vacunas inactivadas contra el aborto enzoótico ovino: Análisis de la protección inducida en un modelo murino. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España: Facultad de Veterinaria, 2005.
5. Karin DE, Everett. Chlamydia and Chlamydiales : more than meets the eye. *Veterinary Microbiology*. 2000 ; 75:109-126.
6. Krieg RN, Staley TJ, Brown RD, Edlund PB, Paster JB, Ward LN, Ludwig W, Whitman BW. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Vol. 4. 2011.
7. Karaulov A, *et al.* Identification of Phylogenetic Position in the Chlamydiaceae Family for Chlamydia Strains Released from Monkeys and Humans with Chlamydial Pathology. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2010.
8. García FJN. Vacunas inactivadas frente al aborto enzoótico de los pequeños rumiantes: Análisis de la protección inducida por vacunas comerciales y de nuevo diseño en un modelo ovino. Tesis Doctoral. Universidad de León, España: Facultad de Veterinaria, 2003.
9. Buxton D. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.* 1986; 118: 510-511.

10. Papp RJ, Shewen PE, Gartley CJ. Abortion and Subsequent Excretion of Chlamydiae from the Reproductive Tract of Sheep during Estrus. *Infect and Immunity*. 1994; Vol. 62, No. 9. 3786-3792.
11. Rake G, Jones HP. Studies on lymphogranuloma venereum. I. Development of the agent in the yolk sac of the chicken embryo. *J. Exp. Med.* 1942; 75: 323-338.
12. Stamp JT, McEwen AD, Watt JAA, Nisbet UD. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec.* 1950; 62: 251-254.
13. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 05 de marzo de 1999.
14. Escalante OC, Díaz AE, Segundo ZC, Suárez GF. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in México: First Report. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1997; 39: 117-121.
15. Lazcano AC. Detección de *Chlamydophila sp* en rebaños caprinos del Estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y aislamiento bacteriológico. Tesis de Licenciatura. México D.F. UNAM, 2006.
16. Mora DJC, Escalante OC, Díaz AE, Jaimes VMS, Martínez SMG, Trujillo GB. Determinación serológica de *Chlamydophila abortus* en ganado caprino lechero en México. En: XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Guadalajara (Jalisco) México; 2008.
17. Mora DJC. Determinación de *Chlamydophila abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2010.



18. Soriano VE, Jiménez EJM, Slagado MC, López HM, Escobedo GMR, Guerra IFM. Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. REDVET. 2011; Vol. 12 No. 11.
19. Kosma P. Chlamydial Lipopolysaccharide. Biochimica et Biophysica Acta 1999; 387-402.
20. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. Microbiol Rev 1991; 55:143-190.
21. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maghire D. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 2<sup>nd</sup> Ed. Great Britain: Blackwell, Science 2002; 196-202.
22. Brade L, Schramek S, Schade U, Brade H. Chemical, Biological and Immunochemical Properties of the *Chlamydia psittaci* Lipopolysaccharide. Infection and Immunity 1986; Vol. 54, No. 2. 568-574.
23. Escalante OC, Ducatelle, R, Haesebrouck F, The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? FEMS Microbiology Reviews 1998; 22: 65-78.
24. Zhang LI, Douglas AL, Hatch PT. Characterization of a *Chlamydia psittaci* DNA Binding Protein (EUO) Synthesized during the Early and Middle Phases of the Developmental Cycle. Infection and Immunity 1998; Vol. 66, No. 3. 1167-1173.
25. Caro MR, Buendía AJ, Del Río L, Ortega N, Gallego MC, Cuello F, Navarro JA, Sanchez J, Salinas J. *Chlamydophila abortus* infection in the mouse: A useful model of the ovine disease. Veterinary Microbiology 2008; 135: 103-111.
26. Hatch TP, Miceli M, Sublet JE. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the development cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. J. Bacteriol 1986; 165: 379-385.
27. Wheelhouse N, Sait M, Wilson K, Aitchison K, McLean K, Smith GED, Longbottom D. Expression patterns of five polymorphic membrane proteins

during *Chlamydia abortus* developmental cycle. Veterinary Microbiology. 2012

28. Marques PX, Souda P, O'Donovan J, Gutierrez J, Gutierrez EJ, Worrall S, McElroy M, Proctor A, Brady C, Sammin D, Basset HF, Whitelegge PJ, Markey EB, Ily EJ. Identification of Immunologically Relevant Proteins of *Chlamydomphila abortus* Using Sera from Experimentally Infected Pregnant Ewes. Clinical and Vaccine Immunology 2010, Vol. 17, No. 8. 1274-1281.
29. Martínez C. Papel de las células NK y de los Linfocitos T en la respuesta inmune frente a *Chlamydomphila abortus* en modelo murino. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, España: Facultad de Veterinaria, 2006.
30. Henderson RI, Navarro GF, Desvaux M, Fernández CR, Ala'Alden D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2004; 69:2-744.
31. Villegas E, Solórzano A, Camacho A, Gutiérrez José. *Chlamydomphila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26 (10): 629-37.
32. Brade L, Schramek S, Schade U, Brade H. Chemical, Biological and Immunochemical properties of the *Chlamydomphila psittaci* Lipopolysaccharide. Infection and Immunity 1996; 56:8-574.
33. Schacter J, Storz J, Tarizzo ML, Bögel K. *Chlamydomphila* as agents of human and animal diseases. Bull. Org. mond. Santé 1973; 49: 443-449.
34. Stuart ES, Tirrell SM, McDonald AB. Characterization of an antigen secreted by *Chlamydomphila*-infected cell culture. Immunology 1987; 61: 527-533.
35. Stuart ES, Wyrick PB, Coong J, Stoler SB, MacDonald AB, Examination of chlamydial glycolipid with monoclonal antibodies cellular distribution and epitope binding. Immunology 1991; 74: 740-747.
36. Vora GJ, Stuart ES. A role for the glycolipid exoantigen (GLXA) in Chlammydial infectivity. Current Microbiology 2003; 46: 217-223.

37. Wheelhouse NM, Aitchison K, Spalding L, Livingstone M, Longbottom D. Transcriptional analysis of in vitro expression patterns of *Chlamydia abortus* polymorphic outer membrane proteins during the chlamydial developmental cycle. *Vet. Res* 2009; 40:47
38. Sait M, Clark EM, Wheelhouse N, Spalding L, Livingstone M, Sachse K, Markey BK, Magnino S, Siarkou VI, Vretou E, Caro MR, Yaga R, Laison FA, Smith DGE, Wright F, Longbottom D. Genetic variability of *Chlamydia abortus* strains assessed by PCR-RFLP analysis of polymorphic membrane protein-encoding genes. *Veterinary Microbiology* 2011; 151: 284-290.
39. Wheelhouse NM, Sait M, Aitchison K, Livingstone M, Wright F, McLean K, Inglis NF, Smith GED, Longbottom D. Processing of *Chlamydia abortus* Polymorphic Membrane Protein 18D during the Chlamydial Developmental Cycle. *PLOS ONE* 2012; Vol. 7, Issue 11, e49190.
40. Hatch TP. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae?. *J. Bacteriol* 1996; 178: 1-5.
41. Everett KDE, Hatch TP. Architecture of the Cell Envelope of *Chlamydia psittaci*. *Journal of Bacteriology* 1995: 877-882
42. Dullemeier LFA, Bos EM, Schuurmans TA, Kampinga HH, Ploegh RJ, Goor H, Leuvenink HGD. Brain death induces renal expression of heme oxygenase-1 and heat shock protein 70. *Journal of Translational Medicine* 2013; 11:22.
43. Goldstein MG, Zihai Li. Heat-sock proteins in infection-mediated inflammation-induced tumorigenesis. Review. *Journal of Hematology and Oncology* 2009; 2:5.
44. Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. Cellular Response to mild stress. Review. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; Vol. 62.
45. Zigangirova NA, Zayakin ES, Kapotina LN, Kost ES, Didenko LV, Davydova DY, Rumyantseva JP, Gintsburg AL. Development of Chlamydial Type III Secretion System Inhibitors for Suppression of Acute and Chronic forms of Chlamydial Infection. *Acta Naturae*, 2012; Vol. 4 No. 2 (13).

46. Hampikian HJB, Fields KA. The chlamydial type III secretion mechanism: revealing in a tough nut. *Frontiers in Microbiology*. Review. 2012; Vol. 1, Article 114.
47. Muschiol S, Boncompain G, Vromman F, Dehoux P, Normark BH, Subtil A. Identification of a Family of Effectors Secreted by the Type III Secretion System That Are Conserved in Pathogenic Chlamydiae. *Infection and Immunity* 2011. Vol. 79, No. 2.
48. Chin E, Kirker M, James G, Hybiske K. Actin Recruitment to the *Chlamydia* Inclusion Is Spatiotemporally Regulated by a Mechanism That Requires Host and Bacterial Factors. *PLOS ONE* 2012. Vol. 7, Issue 10. E46949.
49. Brandan N, Aquino EJ, Codutti A. Respuesta Inmunitaria. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina- UNNE. 2007.
50. Tizard IR. *Inmunología Veterinaria*. 5ª ed. Mc Graw Hill- Interamericana. México. 1998; 200 - 201, 314-316.
51. Ortega N, Caro MR, Salinas J. Papel de los Linfocitos T CD4 y CD8 en la protección inducida por diferentes vacunas contra *Chlamidophila abortus*. *AN. VET. (MURCIA)* 2006; 22:25-34.
52. Magge DM, Williams DM, Smith JG, Bleicker CA, Grubbs BG, Schachter J, Rank RG. Role of CD8 T Cells in primary *Chlamydia* Infection. *Infection and Immunity* 1995; Vol. 63, 516-521.
53. Williams DM, Grubbs BG, Pack E, Kelly K, Rank RG. Humoral and Cellular Immunity in Secondary Infection due to Murine *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* 1997; 65: 2876-2882
54. Bavoil PM, Hsia RC, Rank RG. Prospects for a vaccine against *Chlamydia* genital disease. I. Microbiology and pathogenesis, *Bull. Inst. Pasteur* 1996; 94: 5-54.
55. Ortega N, Caro MR, Buendía AJ, Gallego MC, Del Ríuo L, Martínez CM, Nicolas L, Cuello F, Salinas J. Role of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and NK cells in the protection conferred by different vaccines

- against *Chlamydomphila abortus* infection. Research in Veterinary Science 2007; 82: 314-322.
56. Mascellino MT, Boccia P, Oliva A. Immunopathogenesis in *Chlamydia trachomatis* Infected Women. Review Article. ISRN Obstetrics and Gynecology 2011; 1-9.
57. López HM, Guerra IFM. Papel de los anticuerpos en el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidad en el diagnóstico. Perinatología y Reproducción humana 2002; 16:140-150.
58. Buendía AJ, Martínez CM, Ortega N, Del Río L, Caro MR, Gallego MC, Sánchez J, Navarro JA, Cuello F, Saliinas J. Natural Killer (NK) Cells Play a Critical Role in the Early Innate Immune Response to *Chlamydomphila abortus* Infection in Mice. J. Comp. Path 2004; 130: 48-57.
59. Kerr K, Entrican G, McKeever D, Longbottom D. Immunopathology of *Chlamydomphila abortus* infection in sheep and mice. Research Veterinary Science 2005; 78: 1-7.
60. Rocchi MS, Wattegedera S, Meridiani I, Entrican G. Protective adaptive immunity to *Chlamydomphila abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). Veterinary Microbiology 2009; 135: 112-121.
61. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Mghire D. Veterinary Microbiology and Microbial Disease 2002; Black well, Science. Great Britain.
62. Buxton D, Rae AG, Maley SW, Thomsom 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.
63. Del Río L, Cremades BM, Navarro JA, Buendía AJ, Cuello F, Ortega N, Gallegos MC, Salinas J, Caro MR. IFN- $\gamma$  expression in placenta is associated to resistance to *Chlamydia abortus* after intragastric infection. Microbial Pathogenesis 2013; 56: 1-7.

64. Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial Persistence: beyond the Biphasic Paradigm. *Infection and Immunity* 2004; 1843-1855.
65. Schoborg RV. Chlamydia persistence- a tool to dissect Chlamydia- host interactions. Review. *Microbes and Infection*. 2011; 13: 649-662.
66. Entrican G, Wattegedera S, Rocchi MS, Wheelhouse N. Pregnancy, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and chlamydial abortion: An unresolved paradox. *Veterinary Microbiology* 2009;135: 98-102.
67. Wattegedera S, Rocchi M, Hope J, Entrican G. The effect of pregnancy on maternal immunity in sheep. Abstracts/ *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; Vol. 128, Issues 1-3.
68. Brown J, Entrican. Interferon- $\gamma$  Mediates Long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection *In vitro*. *J. Comp. Path* 1996; Vol. 115, 373-383.
69. Entrican G, Wattegedera S, Chui M, Oemar L, Rocchi M, McInnes C. Gamma Interferon Fails To induce Expression of Indolamine 2,3-Dioxygenase and Does Not Control the Growth of *Chlamydophila abortus* in Bewo Trophoblast Cells. *Infection and Immunity*. 2002. Vol. 70, no. 5; 2690-2693.
70. Rodolakis A, Mohamad YK. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. Review. *Veterinary Microbiology* 2010; 140: 382-391.
71. Longbottom D, *et al.* Evaluation of the impact and control of enzootic abortion of ewes. *The Veterinary Journal* 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.018>
72. Buendía AJ, Cuello F, Del Río L, Gallego MC, Caro MR, Salinas J. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Veterinary Microbiology* 2002; 78: 229-239.
73. Pospischil A. Enzootic abortion in ewes: A review of recent developments in diagnostics. *Small Ruminant Research*. 62 (2006) 113-115.

74. Alonso R, Galán JC, Gutierrez FJ, Rodríguez DM, Salinas J, Sanbonmatsu GS. Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia spp.* y especies relacionadas. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. 2ª Edición (44), 2012.
75. Arráiz N, Marcucci R, Urdaneta B, Colina S, Romero Z. Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*. Revisión. Rev Obstet Ginecol Venez 2008; 68 (3) 195-201.
76. Pérez MJA, Storz J. Género *Chlamydia*: Biología básica, propiedades antigénicas y potencial patogénico. Ciencia Veterinaria 1987; 4: 37- 60.
77. Longbottom D, Faireley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion by Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay with a Recombinant Protein Fragment of the Polymorphic Outer Membrane Protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. Journal of Clinical Microbiology 2002, Vol. 40, No. 11; 4235-4243.
78. Wilson K, Livingstone M, Longbottom D, Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. Veterinary Microbiology 2009; 135: 38-45.
79. Ortega N, Buendía AJ, Salinas J. Ensayo de vacunas inactivadas experimentales contra el aborto enzoótico ovino utilizando ratones resistentes a la infección por *Chlamydophila abortus*. An. Vet. Murcia 2003; 19:109-120.
80. Kadra B, Balla E. Development and production of vaccines against abortion caused by *Chlamydophila abortus* and *Coxiella burnetii* in small ruminants. Small Ruminant Research 2006; 62: 75-78.
81. Center for Food Security and Public Health. College for Food Security. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. OIE. Zoonotic Chlamydiae from mammals. Chlamydiosis. 2005.

82. Entrican G, Wheelhouse N, Wattedgedera SR, Longbottom. New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 35: 271-276.
83. Salinas J, Sánchez J, Buendía AJ, Souriau A, Rodolakis A, Bernabé A, Cuello F. The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. *Res. Microbiol* 1994; 145: 611-620.
84. Sammin DJ, Markey B K, Quin PJ, McElroy MC, Bassett HF. Comparison of foetal and maternal inflammatory responses in the ovine placenta after experimental infection with *Chlamydothila abortus*. *J. Comp. Pathol* 2006; 135 (2-3), 83-92.
85. Vretou E, Giannikopoulou P, Longbottom D, Psarrou E. Antigenic Organization of the N-Terminal Part of the polymorphic Outer Membrane Proteins 90, 91A and 91B of *Chlamydothila abortus*. *Infection and Immunity* 2003; Vol. 71. No. 6. 3240-3250.
86. Buendía AJ, Montes de Oca R, Navarro JA, Sánchez J, Cuello F, Salinas J, Role of Polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci* induced abortion. *Infect. Immun.* 1999; 67:2110-2116.
87. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 1981; 31: 1161-1176.
88. Crowther JR. The ELISA Guidebook. *Methods in molecular biology*; Vol. 149. USA: Humana press 2001; 1 - 8; 45 - 82.
89. Lancefield RC. Type-Specific Antigens, M and T, of Matt and Glossy Variants of Group A Hemolytic Streptococci. *J Exp. Med* 1940; 71:521-537.
90. Marquez RMG, Villaseñor SA. Desarrollo de antisueros para identificar serotipos M-1 y M-3 de *Streptococcus pyogenes* asociados a enfermedades invasivas severas. *Rev Mex Patol Clin* 2006; Vol. 53, Núm. 2, 93-99.



91. Rekiki A, Bouakane A, Bernard F, Hammami S, Rodolakis A. Effectiveness of vaccine strain 1B against Tunisian field strains of *Chlamydomphila abortus* using mouse model. *Revue Méd. Vet.* 2003, 1547: 463-468.
92. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 2-21.
93. Szeredi L, Bacsadi Á. Detection of *Chlamydomphila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma gondii* in Smears from Cases of Ovine and Caprine Abortion by the Streptavidin-Biotin Method. *J. Comp. Path.* 2002; Vol. 127, 257-263. doi:10.1053/jcpa.2002.0591, available online at <http://www.idealibrary.com>.
94. Donn A, Jones GE, Ruiu A, Ladu M, Machell J, Stacanelli A. Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goats: comparison of the complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen. *Veterinary Microbiology* 1997; 59: 27-36.
95. Storey CC, Mearns G, Richmond SJ. Immune dot blot technique for diagnosis infection with *Chlamydia trachomatis*. *Genitourin Med.* 1987; 63:375-379.
96. Bishop PN, Tullo AB, Killough R, Richmond SJ, An Immune Dot-Blot Test for the Disgnosis of Ocular Infection with *Chlamydia trachomatis*. *Eye.* 1991; 5: 305-308.
97. Stothard DR. Use of a Reverse Dot Blot To Identify the Presence of Multiple Serovars in *Chlamydia trachomatis* Urogenital Infection. *Journal of clinical Microbiology* 2001; 39: 2655-2659.
98. Layanchi K, Rodolakis A, Buzoni GD. Identification by Western blots of virulence specific antigens of *Chlamydia psittaci* isolated from ewes. *Vet Res* 1993; 24: 55-65.

99. Salinas J, *et al.* High prevalence of antibodies against *Chlamydiae* and *Chlamydophila abortus* in wild ungulates using two “in house” blocking - ELISA tests. *Vet. Microbiol.* 2009; 46-54.
100. Longbottom D, Psarrou E, Livingstone M, Vretou E. Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS Microbiology Letters* 2001; 195: 157-161.
101. Trávníček M, Kováčová D, Bhide MR, Zubrický P, Čisláková I. Field evaluation of an iELISA and CF test for detection of IgG antibodies against *Chlamydophila abortus* in goats, sheep and rams. *Vet. Med. Czech* 2001; 47 (7): 195-198.

