



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

“Determinación de anticuerpos contra *Chlamydia spp.* en borregas importadas y nativas en rebaños de algunos estados de la zona centro de México”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

José Maria Meza Ugalde

ASESOR:

Dr. José Francisco Morales Álvarez

Cuautilán Izcalli, Estado de México; 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de anticuerpos contra Chlamydia spp. en borregas importadas y nativas en rebaños de algunos estados de la zona centro de México.

Que presenta el pasante: **JOSÉ MARIA MEZA UGALDE**

Con número de cuenta: 30624574-7 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. José Francisco Morales Álvarez | |
| VOCAL | M. en C. Gerardo Arcila López Tello | |
| SECRETARIO | Dra. María Guadalupe Prado Ochoa | |
| 1er. SUPLENTE | M.V.Z. Eréndira De la Fuente Mancera | |
| 2do. SUPLENTE | Dr. Victor Manuel Díaz Sánchez | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

A mis papás Ma. Elena Ugalde y Enrique Meza

Porque me han apoyado y ayudado todo este tiempo, gracias por soportarme y darme su cariño todo este tiempo.

A mis hermanos Enrique Meza y Octavio Meza

Por apoyarme y acompañarme durante el tiempo, y aunque no siempre nos llevemos bien sé que puedo contar con ustedes.

A todas las personas que de una forma u otra me han apoyado en todo este tiempo en el que he estado en la carrera y contribuido a mi formación.

APRENDER ES DESCUBRIR LO QUE YA SABEMOS.
ENSEÑAR ES RECORDAR A OTROS QUE LO SABEN TAN
BIEN COMO NOSOTROS. TODOS SOMOS APRENDICES,
HACEDORES Y MAESTROS.

STEPHEN KING

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por estar al pendiente de mí, apoyándome y ayudándome en lo que se pudiera. Y aunque no siempre estemos de acuerdo en algunas cosas o nos peleemos, sé que puedo contar con ustedes. Gracias por no dejarme.

A la UNAM y a FES-C por abrirme las puertas para que yo pudiera realizar mi formación profesional como MZ.

Al Dr. Francisco Morales por el apoyo que me ha brindado en la realización de este trabajo, así como la confianza durante todo este tiempo en lo que he estado en el laboratorio.

A la futura Dra. Ma. Guadalupe Martínez por todo el tiempo y apoyo que me dedico durante el tiempo que duro el trabajo, por ayudarme resolviendo mis dudas y revisando el escrito. Gracias por tu amistad que me has brindado.

Al M en C. Enrique Herrera por darme la oportunidad de trabajar con él, gracias por todas sus enseñanzas, sus consejos, sus regaños, por siempre estar ahí preguntando como iba para que no dejara este proyecto, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos que conocí durante estos años, Gus, Oscar, Lina, Paty, Sara, Lupita, Gabriel, Jaque, Laura, Jesi, Arturo, Diana, Manu. Gracias por su apoyo, sus consejos y esos buenos ratos que la hemos pasado bien.

ÍNDICE

| | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | Resumen | 1 |
| 2. | Introducción | 2 |
| 2.1 | Antecedentes | 5 |
| 2.2 | Etiología | 5 |
| 2.3 | Transmisión..... | 7 |
| 2.4 | Patogenia | 8 |
| 2.5 | Cuadro clínico y lesiones | 9 |
| 2.6 | Diagnóstico | 9 |
| 2.7 | Control y profilaxis..... | 11 |
| 2.8 | Antecedentes de la enfermedad en México | 13 |
| 3. | Justificación | 15 |
| 4. | Hipótesis | 15 |
| 5. | Objetivo general..... | 16 |
| 6. | Objetivo específico | 16 |
| 7. | Material y métodos | 17 |
| 7.1 | Detección de anticuerpos contra <i>Chlamydia</i> spp. por ELISA Indirecta (ELISA-I) | 17 |
| 7.2 | Desarrollo de la técnica de ELISA..... | 18 |
| 7.3 | Análisis estadístico..... | 19 |
| 8. | Resultados | 20 |
| 9. | Discusión | 25 |
| 10. | Conclusión | 29 |
| 11. | Bibliografía | 30 |
| 12. | Anexos..... | 35 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Figura 1. Patógenos de la Familia <i>Chlamydiaceae</i> potencialmente zoonóticos..... | 4 |
| Figura 2. Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydia abortus</i> | 7 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfica 1. Serofrecuencia de <i>Chlamydia</i> spp. en Animales Importados..... | 20 |
| Gráfica 2. Serofrecuencia de <i>Chlamydia</i> spp. en Animales Nativos..... | 21 |
| Gráfica 3. Serofrecuencia contra <i>Chlamydia</i> spp. comparativa entre Animales Importados y Nativos del Edo. de México..... | 23 |
| Gráfica 4. Serofrecuencia contra <i>Chlamydia</i> spp. comparativa entre Animales Importados y Nativos del Edo. de Hidalgo..... | 23 |
| Gráfica 5. Serofrecuencia contra <i>Chlamydia</i> spp. comparativa entre Animales Importados y Nativos del Edo. de Querétaro..... | 24 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|----------------------------------------------------------------|---|
| Cuadro 1. Taxonomía del orden de las <i>Chlamydiales</i> | 3 |
|----------------------------------------------------------------|---|

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Clasificación de los sueros por importadas y nativas así como por procedencia..... | 17 |
| Tabla 2. Número y Porcentaje de Animales Positivos y Negativos a <i>Chlamydia</i> spp. en los diferentes Estados..... | 21 |
| Tabla 3. Número de animales Importados y Nativos que son Positivos y Negativos a la Prueba de ELISA-I por Estado..... | 22 |

1. Resumen

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), es producido por *Chlamydia abortus*, una bacteria intracelular obligada que además de ser una zoonosis, causa aborto en el último tercio de la gestación en ovejas, cabras y otros rumiantes; es considerada endémica en México desde mayo del 2016. El objetivo de este trabajo fue la determinación y comparación de la presencia de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. en animales nativos e importados en rebaños de los Estados de México, Hidalgo, Querétaro, mediante una prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA-I). Las muestras provenían de rebaños con historia de aborto y se tenían bajo resguardo del Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal, INIFAP. A los 537 sueros de ovino, se les hizo la prueba de ELISA-I, dando como resultado una serofrecuencia total del 51.31% de positivos. Haciendo el comparativo general entre borregas importadas y nativas, no hubo diferencia significativa, siendo un 54% de animales positivos importados y un 47% de positivos nativos. Sin embargo, en el análisis de resultados por Estado, sí hubo una diferencia marcada entre animales importados y nativos, siendo el Estado de Hidalgo en el que hubo mayor diferencia entre ambos grupos; con lo que se demostró, una serofrecuencia alta de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. en animales importados, con respecto a los obtenidos en el grupo de nativos, se demuestra que hay una serofrecuencia alta de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. la cual puede ser indicativa de que la enfermedad del AEPR, se ha ido distribuyendo entre las unidades de producción de ovinos en los diferentes estados.

Palabras clave: Aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), *Chlamydia abortus*, ELISA-I

2. Introducción

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), además de ser una zoonosis, es una enfermedad infecciosa que genera pérdidas económicas importantes en muchas regiones del mundo dedicadas a la cría de pequeños rumiantes. Es causada por bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae* que producen aborto en el último tercio de la gestación o el nacimiento de crías débiles y que afecta principalmente a pequeños rumiantes (ovinos, caprinos), bovinos y humanos ^{1,2}.

Debido a su incapacidad de multiplicarse en medios artificiales y a su morfología, durante la época de 1950 fueron consideradas como virus. Fue hasta 1966 cuando Page determinó su naturaleza bacteriana ya que poseía ARN y ADN, tiene un ciclo de desarrollo muy diferente al de los virus, su pared celular es similar a las demás bacterias Gram negativas ^{3,5}. Dos años más tarde Weiss las define como bacterias intracelulares obligadas ^{1,3,4}.

La clasificación de los miembros de la familia *Chlamydiaceae* inicialmente fueron diferenciados en dos especies: *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci*, quedando el AEPR en este último grupo ⁶. En 1999 Everett *et al.* hicieron una nueva clasificación de la familia *Chlamydiaceae*; demostrando así, que dicha familia agrupaba dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila* y la existencia de nueve especies diferentes. En 2011, se retomó la clasificación inicial quedando nuevamente un solo género: *Chlamydia*, con nueve especies establecidas. (cuadro 1) ^{4,7,8}.

Cuadro 1. Taxonomía del orden de las *Chlamydiales* propuesta por Everett *et al.* (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> | Humanos | |
| | | | | <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* suelen producir infecciones oculares, pulmonares, genitales, articulares e intestinales en diferentes especies como son aves, humanos y otros mamíferos. *Chlamydia abortus* y *C. psittaci* son las especies que se han considerado de mayor importancia debido a su alto potencial zoonótico (Figura 1) ^{5, 7}. Aun cuando el AEPR no se reporta con frecuencia en humanos, sí existe un riesgo a considerar, ya que se encuentra asociado en la mayoría de los casos, al contacto directo con ovejas o cabras infectadas ^{5, 7, 8, 9}.

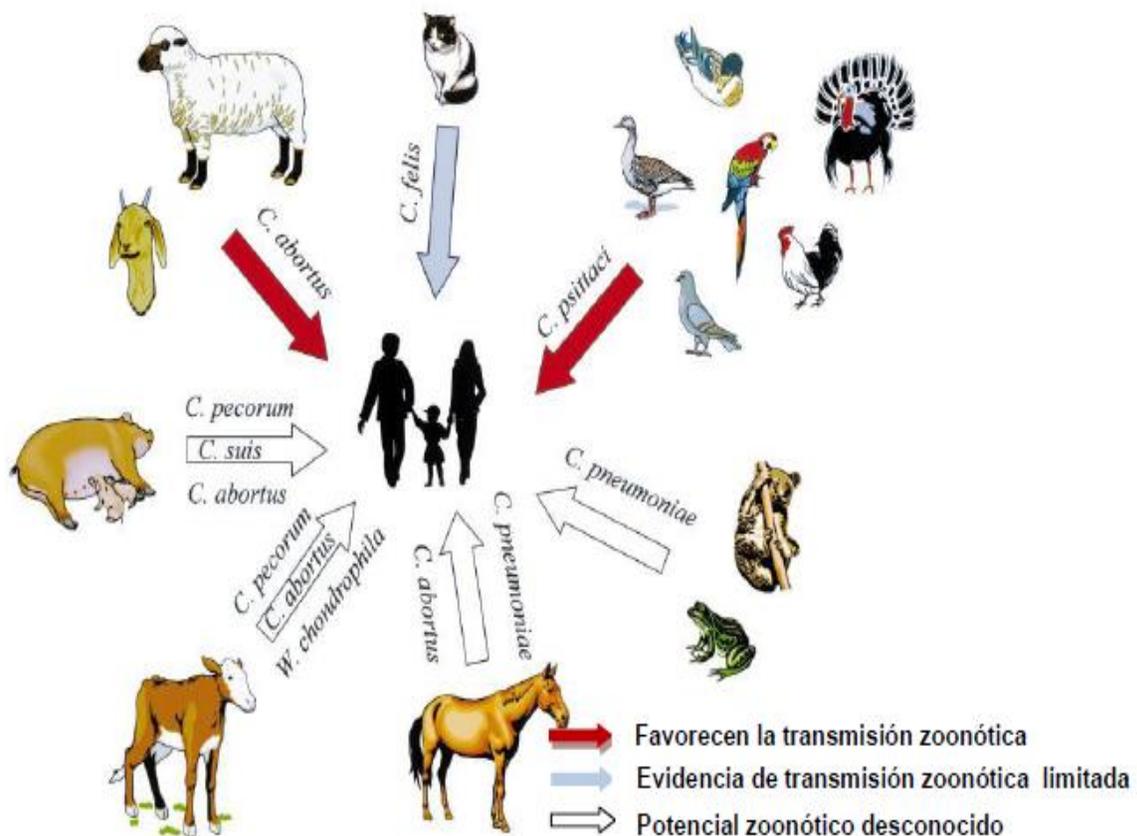


Figura 1. Patógenos de la familia *Chlamydiaceae* potencialmente zoonóticos.

(Longbottom y col., 2003)

2.1 Antecedentes

En 1936 Greig descubre por primera vez el aborto relacionado a la infección por *Chlamydia*, denominándolo aborto enzoótico ovino. La enfermedad fue asociada a deficiencias nutricionales en los animales y a factores medioambientales. En 1950, Stamp *et al.* demostraron que la enfermedad era producida por un agente infeccioso perteneciente al grupo “psitacosis - linfogranuloma venéreo”^{3, 4, 6}. En Alemania en 1959, se informó por primera vez sobre abortos por *Chlamydia*; para después, ser diagnosticada en países como Bulgaria, España, USA, Francia, India, Japón, Reino Unido, Chad, Grecia y Túnez^{10, 11, 12}.

Con excepción de Australia y Nueva Zelanda, la enfermedad se encuentra distribuida en muchas partes del mundo y se considera como la segunda causa de abortos infecciosos después de brucelosis y la principal en países donde la brucelosis está controlada o erradicada^{13, 14}. Sin embargo, en Australia y Nueva Zelanda se encuentra presente la clamidiosis aviar producida por *Chlamydia psittaci*, la cual también se ha aislado en ovinos^{3, 15, 16}.

2.2 Etiología

Chlamydia abortus es el agente etiológico del AEPR, es una bacteria Gram negativa pequeña que tiene una pared celular con características similares a las demás Gram negativas; sin embargo, carecen de la presencia de una capa rígida de péptidoglicano, probablemente como consecuencia de la adaptación al medio intracelular¹⁶. A causa de su aparente incapacidad para producir sus propios ATP, estos microorganismos dependen del metabolismo de las células hospederas para su multiplicación, privándolas de nutrientes y fuentes de energía, por lo que resulta necesario para *C. abortus* crecer en el citoplasma de las células eucariotas, en el cual llevan a cabo un ciclo de desarrollo único en donde tienen dos formas: una forma infecciosa resistente, los llamados cuerpos elementales (CE) y que se alterna con una forma metabólicamente activa no infecciosa, los cuerpos reticulares (CR)^{17, 18, 19}.

El ciclo único de desarrollo de *Chlamydiaceae* puede dividirse en las siguientes fases (Figura 2):

1. Adhesión a la célula hospedadora susceptible: La penetración a la célula eucariota ocurre por endocitosis mediada por receptores.
2. Internalización: El CE entra por inclusión intracitoplasmática y es ahí donde permanece durante el ciclo completo.
3. Conversión de CE a CR: Después de un proceso de reorganización estructural dentro de la inclusión intracitoplasmática, se genera la conversión del CE en CR de 6 a 10 horas. Durante este proceso, la bacteria evita ser destruida por parte de la célula.
4. Multiplicación del CR: El CR se multiplica mediante fisión binaria, esto lo realiza utilizando los componentes celulares. A medida que los cuerpos reticulares se van multiplicando, la inclusión intracitoplasmática rápidamente se llena y aumenta su tamaño ^{1, 20}.
5. Reorganización de CR a CE: El CR se transforma de nuevo en infeccioso y metabólicamente inactivo el CE.
6. Liberación de la nueva progenie: La célula se lisa liberando la nueva progenie de CE, los cuales van a infectar células susceptibles vecinas. También se liberan CR y cuerpos intermedios ^{1, 20}.

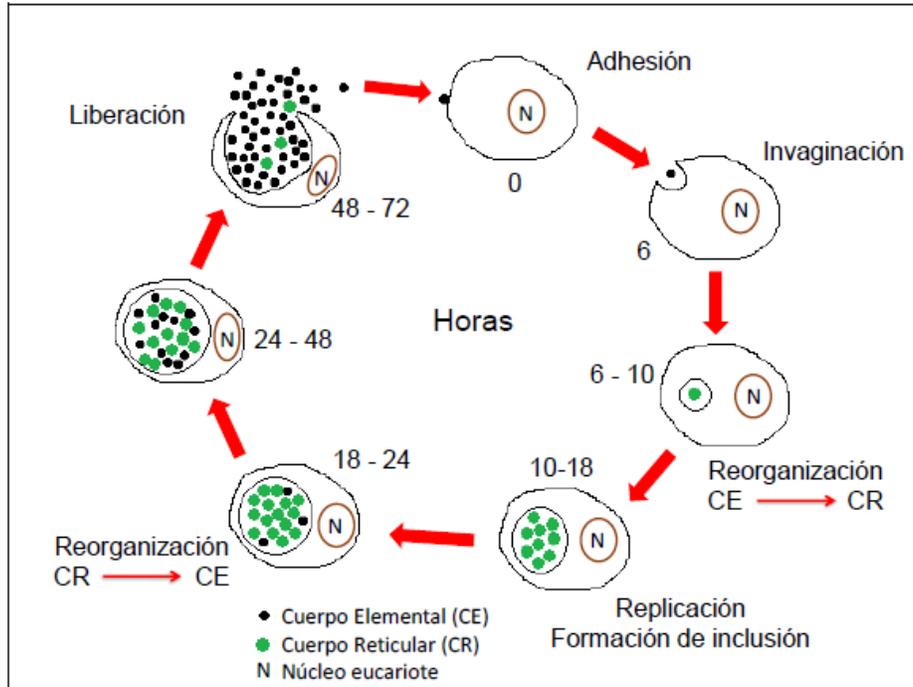


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia abortus*

2.3 Transmisión

Una vez que se origina el parto o el aborto, un gran número de bacterias son eliminadas en descargas vaginales, placenta (cotiledones) y en la piel de los fetos abortados ^{1, 2}. Siendo estos, los principales factores que contribuyen a la contaminación del ambiente (alimento, agua y suelo), favoreciendo de esta forma la transmisión oral o por aerosoles a otros animales, así como a los humanos ^{1, 3}. Cantidades menores de la bacteria pueden ser eliminadas por orina, leche y heces durante varios días después del aborto ^{2, 3}.

Una vez que la oveja o la cabra abortan como consecuencia de esta enfermedad, difícilmente vuelven a abortar ^{1, 3}. Pero estos animales quedan como portadores sanos y pueden excretar el microorganismo en su siguiente estro y parto ^{1, 3}.

Las ovejas pueden empezar a infectarse a cualquier edad y durante cualquier temporada, pero el periodo de riesgo más importante es durante la época de partos

^{1, 2}. Las crías nacidas de madres infectadas pueden mantener la infección dentro del rebaño y el seguir transmitiéndolo a otros animales ^{2, 3}.

En un rebaño libre de la enfermedad donde se introducen reemplazos infectados, la tasa de abortos durante el primer año posterior a su ingreso, suele ser baja. Sin embargo, en los siguientes 2 ó 3 años tiende a incrementarse; empezando con un 30% hasta un 90% de abortos, disminuyendo la producción en el rebaño. En los años posteriores la enfermedad tiene una incidencia anual de aborto de 5 a 10%¹.

2.4 Patogenia

Se ha descrito que las tonsilas son el sitio primario de infección y multiplicación de la bacteria, a partir de este sitio, es de donde se disemina por sangre o linfa a diferentes órganos de colonización secundaria como el hígado, bazo y pulmón, donde permanece en estado latente ^{21, 22}.

Cuando las hembras no están gestantes se establece una infección latente, en tejido linfoide ¹. Durante este tiempo el microorganismo es indetectable a cualquier prueba diagnóstica, incluyendo serología ⁴. Sin embargo, cuando la oveja vuelve a estar gestante, la modulación inmune libera a la bacteria de su estado de supresión, permitiendo su multiplicación en los órganos de colonización secundaria y provocando una segunda bacteremia que inicia con la infección de la placenta ^{1, 23}. Alrededor del día 60 de la gestación, se desarrollan hematomas en los hilios de la interface materno-fetal de los placentomas debido a la fusión entre células binucleadas trofoblasto fetales y las células maternas ²⁷. Se cree que en estos hematomas podrían ser el microambiente por donde las clamidias entran en contacto directo con el epitelio coriónico, transmitiendo la infección de la madre al feto, aunque hasta el día 90 se observan los cambios patológicos debido a la multiplicación excesiva de la bacteria, produciéndose una placentitis necrótica, que altera el paso de nutrientes al feto favoreciendo así, una infección sistémica la cual causa el aborto en el último tercio de la gestación ^{1, 24}.

2.5 Cuadro clínico y lesiones

La infección por *C. abortus* en ovejas y cabras induce aborto, muerte fetal o el nacimiento de corderos débiles. El aborto ocurre principalmente en el último tercio de la gestación, sin ningún o con pocos signos clínicos previos a que éste suceda; se puede llegar a observar cambios de comportamiento o en ocasiones descargas vaginales en días previos al aborto, siendo estos más frecuentes en cabras que en ovejas ³.

Las hembras después del aborto pueden presentar una descarga uterina purulenta de color marrón durante 7 a 10 días ^{1,3}. La retención placentaria es más común en cabras y vacas, lo que puede producir metritis. Los corderos abortados pueden parecer normales o mostrar un cierto grado de edema subcutáneo, las membranas placentarias se observan necróticas, engrosadas y con exudado placentario ¹. En terneros nacidos de hembras infectadas puede haber un cuadro de conjuntivitis y neumonía ²⁵.

También se ha informado que algunos corderos pueden nacer sanos y sobreviven a la infección, aunque al crecer pueden abortar en su primer gestación ⁶. También pueden llegar a presentar algunos signos como neumonía leve y transitoria y una hepatitis ²⁴.

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 ⁴⁰.

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo deberá apoyarse en la historia clínica del rebaño, considerando principalmente aquellos animales con problemas de aborto en el último tercio de gestación, presentando además membranas placentarias inflamadas y necróticas ^{26, 27}. Sin embargo, un diagnóstico preciso requiere confirmación a través de pruebas diagnósticas de laboratorio, debido a que otros

microorganismos también pueden ser causantes de aborto en caprinos como *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus* ssp *fetus* y *Toxoplasma gondii*, provocando igualmente lesiones en las membranas placentarias ^{28, 29, 30, 31}.

El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección directa o indirecta del agente. Las pruebas para la detección directa del agente se realiza en muestras de tejidos, mediante la tinción de improntas, cortes histológicos, frotis y/o técnicas de fluorescencia directa, aislamiento y la identificación de ADN mediante la prueba de PCR; los métodos indirectos están basados en la detección de anticuerpos contra *Chlamydia abortus*, las pruebas más utilizadas son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta y fijación del complemento (FC) ^{13, 27, 32}.

Las muestras son enviadas al laboratorio de diagnóstico en un medio de sucrosa-fosfato-glutamina (SPG), suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos como estreptomycin y gentamicina, pero no penicilina. Este es un medio de transporte especial para la familia Chlamydiaceae ³³. *Chlamydia abortus* puede ser aislada de muestras de tejidos infectados como son cotiledones, membranas intercotiledonarias, pulmón e hígado fetal, así como de exudado vaginal y heces ^{1, 30}. Las tinciones más utilizadas son la técnica modificada de Ziehl-Neelsen o Stamp, Macchiavello o Giménez.

Al ser una bacteria intracelular obligada, requiere ser aislada y propagada en embrión de pollo o en cultivo celular ^{2, 30}. Otras pruebas para detectar la bacteria en órganos y exudados es por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la ventaja de proporcionar una detección rápida y específica en muestras biológicas sin recurrir al cultivo celular ^{1, 2, 30}.

Los títulos de anticuerpos maternos contra *C. abortus* pueden ser medidos por la técnica de Fijación del Complemento (FC) pero, tiene el inconveniente de tener una reacción de antigenicidad cruzada entre *C. abortus* y *C. pecorum*, así como con

otras bacterias Gram negativas que pueden complicar la interpretación de resultados ^{1,2}.

Existen otras pruebas serológicas más sensibles y específicas como el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) basados en anticuerpos monoclonales específicos de *C. abortus* que reconocen regiones específicas de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) y fragmentos de proteína recombinante de la familia POMP (proteína polimórfica de membrana externa)¹.

Otra técnica disponible es la inmunofluorescencia indirecta, que 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 ³⁴.

Lo importante es tener un diagnóstico temprano y preciso de la causa del aborto, por la importancia crítica de poder adoptar medidas de control adecuadas para limitar o prevenir la diseminación de la infección ¹.

2.7 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 ser humano. Las medidas de control y prevención se pueden establecer en base a tres aspectos: medidas de manejo, tratamiento con antimicrobianos y con la inmunización ³⁵.

Las medidas de manejo consisten en el aislamiento de animales enfermos y su progenie, las hembras próximas a parir deberán situarse en un paridero individual por si hay un aborto, para que sea más fácil el manejo del feto y placenta, así como también la limpieza y desinfección del lugar, 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 que 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 ^{1, 36}.

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 ³⁷.

El tratamiento utilizado contra la clamidiasis es con tetraciclinas, las ovejas gestantes deben tratarse con oxitetraciclina de acción prolongada a razón de 20 mg/kg vía intramuscular; se recomienda se administre en el último tercio de gestación, que es cuando se empiezan a dar los cambios ocasionados por las clamidias en placenta. Como el efecto bacteriostático del tratamiento es suprimir la multiplicación de la bacteria, se deben administrar más dosis de antibiótico a intervalos de dos semanas hasta el parto. Se debe mencionar que, aunque el medicamento reduce las pérdidas y la cantidad de microorganismos excretados al parto, este no erradica la infección y los daños que se pudieran ocurrir en placenta no son reversibles, por lo que algunas ovejas sí abortaran. También cabe señalar, que el uso de antimicrobianos debe ser con cautela, esto debido a que se han encontrado cepas de algunas especies clamidiales, resistentes principalmente a tetraciclinas. Pese a que, hasta ahora no se han aislado cepas de *C. abortus* resistentes a la tetraciclina, hay razones para sospechar que probablemente pueda llegar a haber resistencia, debido a que han sido aisladas varias cepas de *C. suis* resistentes a tetraciclinas. Esta resistencia está mediada por una isla genómica portadora de un alelo tet (C) que se puede transferir a *C. trachomatis* y *C. muridarum*. La posibilidad de que se pueda dar la resistencia en *C. abortus* aumenta, ya que se ha encontrado ADN de *C. abortus* en semen de jabalíes y muestras conjuntivales de cerdas en una granja de producción porcina en Estonia. Adicional a esto, también se encontró ADN de *C. suis* en semen de jabalíes, en muestras de conjuntivas de cerdas y en heces de lechones ³. Otros fármacos que

también se recomiendan para el tratamiento de la clamidiosis son eritromicina y otros macrólidos, tilosina, quinolonas y cloranfenicol ^{1, 37}.

Finalmente, aunque la vacunación es considerada como la única solución eficaz para controlar la infección por *Chlamydia* en los rebaños, cabe aclarar que en México no hay vacunas disponibles en el mercado ^{1, 37}. La vacunación cuenta con un gran inconveniente, ya que al no tener una prueba diagnóstica que distinga a los animales vacunados de los realmente infectados, interferiría en el diagnóstico y el desecho de animales ¹.

2.8 Antecedentes de la enfermedad en México

A finales de los años noventa se elaboraron los primeros reportes en México de clamidiosis tanto en ovinos como en caprinos, pese a la evidencia de este patógeno en el país, la enfermedad estaba ubicada en el grupo 1 del acuerdo de enfermedades y plagas exóticas ^{38, 39}.

En 2015 se entregaron 35,000 borregas gestantes importadas de Nueva Zelanda a través de un programa gubernamental de “re población de ganado ovino”. El ganado proveniente de Nueva Zelanda implicó una inversión de 177.8 millones de pesos que aportaron la SAGARPA, el gobierno del Estado de México y los productores.

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), y la Coordinación General de Ganadería hicieron la revisión sanitaria de los animales, para constatar y convalidar la condición del ganado que ingresó de Nueva Zelanda y con ello, preservar el estatus sanitario en México.

Los ovinos arribaron al puerto de Mazatlán el 26 de junio; participaron en la verificación sanitaria de los animales 22 oficiales del SENASICA, de los cuales 12 fueron comisionados para viajar a Nueva Zelanda, a fin de realizar la verificación en origen, según lo establece la Ley Federal de Sanidad Animal.

Este ganado fue distribuido principalmente en los Estados de Hidalgo y México, aproximadamente el 20% de las hembras que ya venían gestantes, abortaron por lo que se determinaron las causas del aborto, encontrándose que muchos de ellos fueron provocados por *Chlamydia*. A la fecha, no se sabe realmente si las hembras adquirieron la enfermedad en México o ya venían infectadas de su país de origen.

El diagnóstico se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), donde se hizo el aislamiento en cultivo celular y se corroboró mediante la prueba de PCR.

En mayo de 2016, fue reconocida la enfermedad como endémica en México y se clasificó dentro del grupo 3 de la lista de enfermedades de reporte obligatorio; este grupo incluye las enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y que representan un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional

40, 41.

3. Justificación

El AEPR, además de ser una zoonosis, representa una de las principales causas de aborto en rebaños de ovinos y caprinos a nivel mundial, lo que resulta en grandes pérdidas económicas en estas especies. En México, existen evidencias de la presencia de la enfermedad desde finales de los años noventas. Sin embargo, el reconocimiento de la enfermedad por parte de las autoridades zoosanitarias se realizó hasta Mayo de 2016. Aunado a esto, en el 2015 se realizó la importación de aproximadamente 35 mil hembras gestantes desde Nueva Zelanda, en un programa de repoblación gubernamental. En estos animales se suscitaron abortos en aproximadamente el 20%, siendo algunos de estos diagnosticados como clamidiasis. Por tal motivo, se están realizando estudios encaminados a determinar si estos animales se infectaron con *Chlamydia abortus* de origen o a su arribo a México, sin descartar la posibilidad de que pudiesen venir infectados con otra especie del género *Chlamydia*.

4. Hipótesis

Si los animales importados llegaron de Nueva Zelanda a México, entonces la seroprevalencia contra *Chlamydia* spp. en los animales importados, será mayor comparado con los animales nativos.

5. Objetivo general

- Determinar y comparar la presencia de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. en animales nativos e importados en rebaños de los Estados de México, Hidalgo y Querétaro por medio de una prueba de ELISA-I.

6. Objetivo específico

- Analizar mediante un ELISA-I, muestras de suero sanguíneo de ovejas nativas e importadas de Nueva Zelanda, a partir de un banco de sueros bajo resguardo en el laboratorio de diagnóstico del CENID Microbiología Animal, INIFAP.
- Análisis comparativo del nivel de anticuerpos y la determinación de la serofrecuencia en las muestras bajo estudio.

7. Material y métodos

El trabajo se realizó en el CENID Microbiología Animal del INIFAP, en el laboratorio de diagnóstico.

Muestras. Se procesaron 537 sueros de ovino, los cuales fueron obtenidos de un banco de sueros que se encuentra en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal, INIFAP. Las muestras provenían de rebaños con historia de aborto y fueron clasificadas en borregas importadas y nativas, de acuerdo al lugar de procedencia. Los grupos quedaron como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los sueros por importadas y nativas así como por procedencia.

| Procedencia | Importadas | Nativas |
|------------------|------------|---------|
| Estado de México | 119 | 55 |
| Hidalgo | 197 | 82 |
| Querétaro | 32 | 52 |
| Total | 348 | 189 |

7.1 Detección de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. por ELISA Indirecta (ELISA-I)

Se realizó una prueba de ELISA-I para la detección de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. Esta prueba se basó en la sensibilización de placas de poliestireno fondo plano para ELISA, con un extracto crudo purificado e inactivado de la cepa A22 de *C. abortus* como antígeno, tiene una sensibilidad del 75% y una especificidad del 66%. La técnica utilizada fue descrita por Martínez (2013) ¹³.

7.2 Desarrollo de la técnica de ELISA.

Se sensibilizaron placas con el extracto crudo e inactivado de la cepa A22 de *C. abortus*, colocando 50 µl del antígeno y se incubó 24 horas entre 2 y 8°C. Posteriormente se lavaron las placas cuatro veces con 300 µl de PBS 1X-Tween 20 y en seguida se bloquearon con 50 µl de leche descremada al 3% y se incubó a 37°C por una hora, transcurrido el tiempo de incubación, se realizó nuevamente el lavado de las placas como ya se describió anteriormente.

Depósito de controles y suero de estudio en la placa. Después de bloquear la placa se colocaron 50µl del anticuerpo primario en cada pocillo distribuidos de la siguiente forma:

- a. Pozo A1: Control positivo,
- b. Pozo B1: Control negativo,
- c. Pozo C1: Agua destilada como blanco.
- d. En los pocillos restantes se colocaron las muestras de los sueros problema.

Se homogenizó el contenido en los pocillos agitando gentilmente la placa, cubriéndola con papel aluminio e incubándola por 1 hora (\pm 5 minutos) a 37 °C.

Lavado de pocillos. Se eliminó el contenido de la placa y se sacudió para eliminar el exceso de líquido y enseguida se lavó nuevamente la placa con PBS 1X-Tween 20.

Anticuerpo secundario. Después del lavado se colocaron 50 µL de anticuerpo secundario (Conjugado-Anti IgG ovino 1:2000 de acuerdo a las especificaciones del fabricante) en cada uno de los pocillos, se cubrió con papel aluminio y se volvió a incubar a 37°C por una hora. Transcurrido el tiempo, se eliminó el contenido de la placa. Posteriormente se realizaron nuevamente tres lavados a la placa para eliminar excesos de anticuerpo y evitar así uniones inespecíficas. En seguida se realizó el revelado y la lectura de la placa; para ello se adicionaron a cada pocillo 50µl de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). A partir de este paso la placa fue cubierta de la luz excesiva colocándola en una cámara oscura por un periodo de 5 minutos.

Lectura de la placa. Una vez transcurrido este tiempo y aun en condiciones de oscuridad total, se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro (Biotek) a una longitud de onda de 450nm. Los datos fueron registrados y procesados con el programa Gen5.

7.3 Análisis estadístico

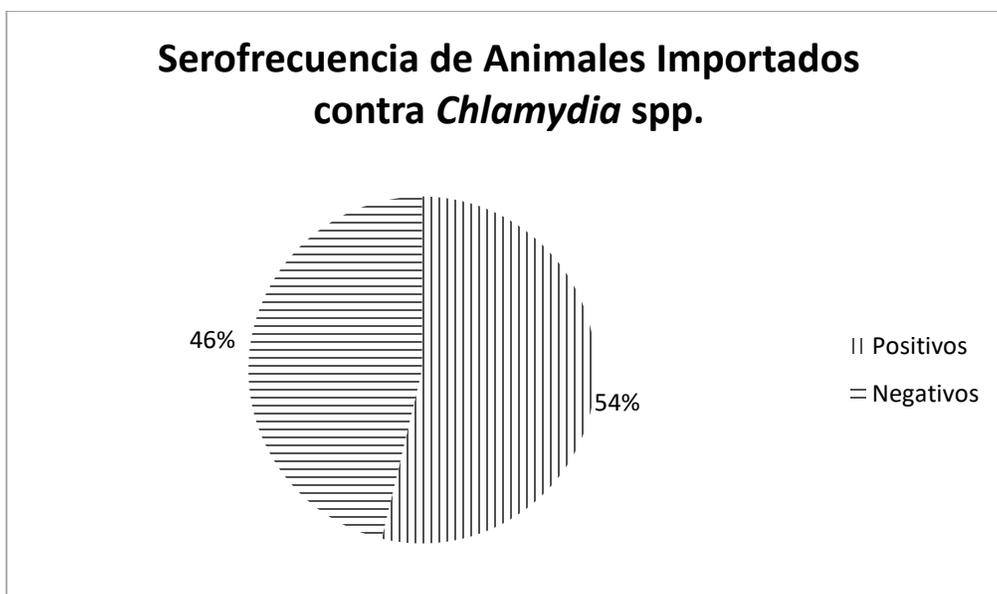
Para el análisis estadístico se usó una estadística descriptiva, en la cual, para determinar la frecuencia de animales seropositivos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$Frecuencia = \frac{\text{Número de animales seropositivos}}{\text{Número de animales muestreados}} \times 100$$

8. Resultados

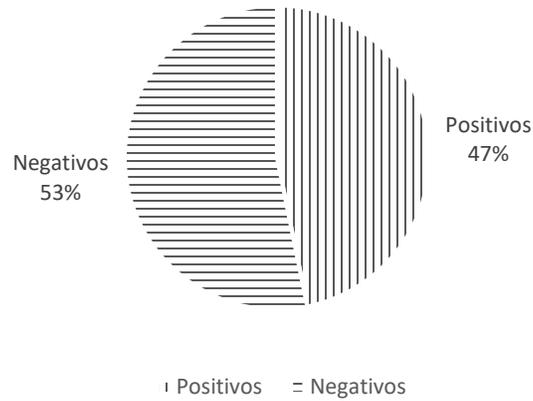
De los 537 sueros de ovino, 276 resultaron positivas y 261 negativas. Con lo que se obtuvo una serofrecuencia de 51% para animales positivos y 49% de negativos a la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia* spp. con la prueba de ELISA Indirecta con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 66%.

Se desglosaron los resultados en animales importados y de un total de 348 ovejas, 187 salieron positivas y 161 negativas a la presencia de anticuerpos por la prueba de ELISA-I, mientras que de los 189 animales nativos, 89 muestras salieron negativas y 100 salieron negativas a la presencia de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. (Gráficas 1 y 2).



Gráfica 1. Serofrecuencia de *Chlamydia* spp. en Animales Importados.

Serofrecuencia de Animales Nativos contra *Chlamydia* spp.



Gráfica 2. Serofrecuencia de *Chlamydia* spp. en Animales Nativos.

A continuación se muestra el total de animales positivos y negativos de *Chlamydia* spp. (Tabla 2) por cada Estado de donde provenían los sueros.

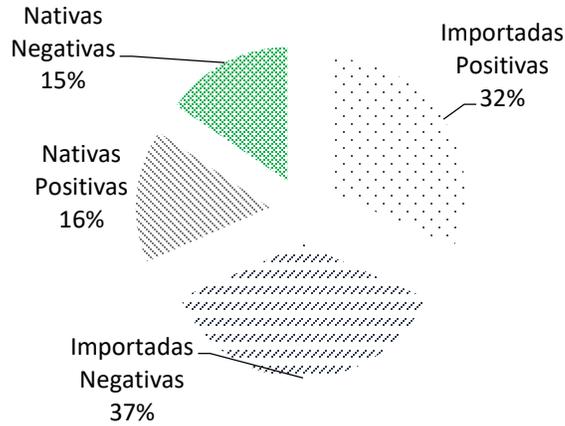
| Tabla 2. Número y Porcentaje de Animales Positivos y Negativos a <i>Chlamydia</i> spp. en los diferentes Estados. | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-------------|-------------|---------|
| | No. de Muestras | Positivos | Negativos | % Positivos | % Negativos | Total % |
| Edo de México | 174 | 83 | 91 | 48 | 52 | 100 |
| Edo de Hidalgo | 279 | 142 | 137 | 51 | 49 | 100 |
| Edo de Querétaro | 84 | 51 | 33 | 61 | 39 | 100 |
| Total | 537 | 276 | 261 | | | |

Se obtuvieron, el número de animales positivos por cada estado, y se hizo un comparativo entre los animales importados y nativos (Tabla 3). Como puede observarse, en el Estado de México, el número de animales positivos fue mayor en los animales importados comparado con los nativos, lo mismo puede notarse para en Hidalgo en el cual se obtuvieron de animales positivos importados mucho mayor obtenido en los nativos, sin embargo, en Querétaro el comportamiento fue distinto, obteniéndose un número mayor de positivos en los animales nativos que en los animales importados.

| Tabla 3. Número de animales Importados y Nativos que son Positivos y Negativos a la Prueba de ELISA-I por Estado. | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------|-----------|-----------|
| | | No. de Muestras | Positivos | Negativos |
| Edo de México | Importadas | 119 | 55 | 64 |
| | Nativas | 55 | 28 | 27 |
| Edo de Hidalgo | Importadas | 197 | 117 | 80 |
| | Nativas | 82 | 25 | 57 |
| Edo de Querétaro | Importadas | 32 | 15 | 17 |
| | Nativas | 52 | 36 | 19 |
| Total | | 537 | | |

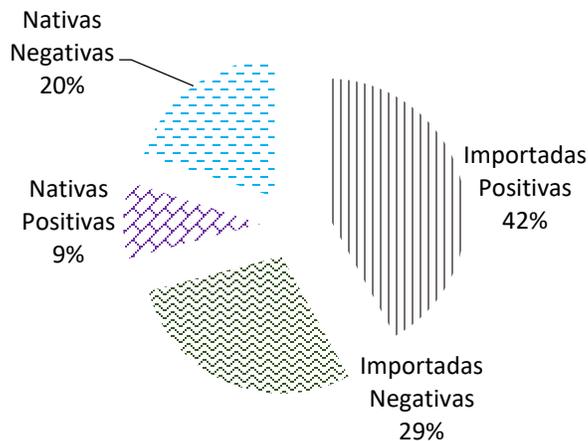
En tanto a los porcentajes de Serofrecuencia por estado se pueden notar las diferencias entre animales importados y nativos, siendo mayor el de Importados para los Estados de México y de Hidalgo, excepto en el de Querétaro siendo mayor los Nativos (Gráficas 3, 4 y 5).

Serofrecuencia de *Chlamydia* spp. entre Animales Importados y Nativos en el Edo. de México



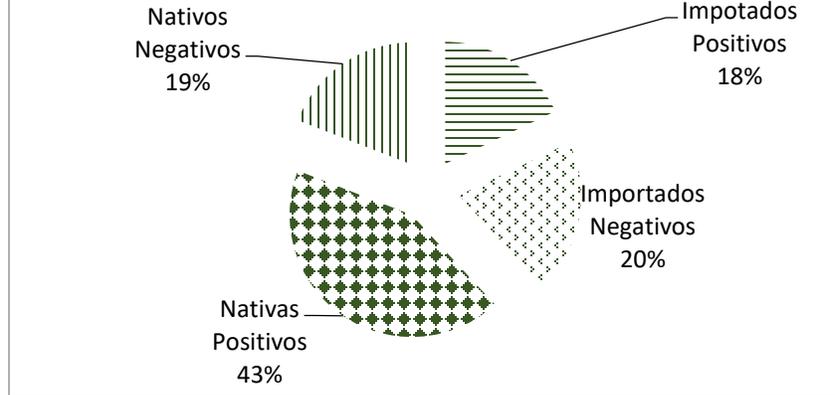
Gráfica 3. Serofrecuencia contra *Chlamydia* spp. comparativa entre Animales Importados y Nativos del Edo. de México.

Serofrecuencia de *Chlamydia* spp. entre Animales Importados y Nativos en el Edo. de Hidalgo



Gráfica 4. Serofrecuencia contra *Chlamydia* spp. comparativa entre Animales Importados y Nativos del Edo. de Hidalgo.

Serofrecuencia de *Chlamydia* spp. de Animales Importados y Nativos en el Edo. de Querétaro



Gráfica 5. Serofrecuencia contra *Chlamydia* spp. comparativa entre Animales Importados y Nativos del Edo. de Querétaro.

9. Discusión

En el presente trabajo, se obtuvo una serofrecuencia general del 51 % en los sueros analizados. Lo cual representa una cifra importante, porque indica que la enfermedad está ampliamente distribuida en la zona centro del país ^{26, 27}. Lo que es ratificado por diversos estudios como el de Sánchez (2014), quien publicó una prevalencia del 9.67% en el Estado de Coahuila, 7.52% en Veracruz, 4.3% Jalisco y 3.22% en Querétaro; aunque en este estudio, se utilizó PCR como herramienta de diagnóstico ²⁷.

Existen más estados en los que se tienen antecedentes de serología positiva, tal es el caso de Baja California Sur, Michoacán, Guerrero, Estado de México, Puebla, Tlaxcala y San Luís Potosí, por citar algunos de ellos ⁴⁴. Estos estados se encuentran distribuidos en el norte, centro, este y oeste del país, lo que indica, que a falta de un diagnóstico rutinario, se ha favorecido el desplazamiento e introducción de animales portadores, resultando en la dispersión de la enfermedad en México ²⁷.

En otros países han realizado estudios epidemiológicos para determinar la serofrecuencia de *C. abortus*. Como en Bosnia y Herzegovina, donde se recolectaron muestras de ovino durante 2012; los animales estaban ubicados en diferentes partes del país y tenían historia de fallas reproductivas (aborto, muerte fetal e infertilidad). En ese estudio, se analizaron 178 sueros de oveja para detectar anticuerpos específicos contra *C. abortus*, el 43.3% (77 sueros) presentaban anticuerpos contra *C. abortus* lo que significa que es altamente endémica en los rebaños de ovejas de ese país. Teniendo en cuenta que en Bosnia y Herzegovina no existe una legislación que permita el monitoreo y la vigilancia de la enfermedad, aunado a que no se han hecho investigaciones sistemáticas que determinen la presencia de clamidiasis en su población ovina; no se ha establecido un programa de prevención y control de la enfermedad, así como las estrategias que permitan su erradicación⁴².

En otro trabajo de serofrecuencia en Suiza, fueron examinados 639 rebaños de ovejas, los cuales representaban el 57% de los rebaños de ovejas suizas y el 60% de la población de ovejas; ellos dieron como resultado un total de 118 (19%)

rebaños seropositivos. La serofrecuencia más alta que encontraron en una de las regiones bajo estudio fue del 41% de animales positivos ⁴³; siendo estos valores menores a los obtenidos en el presente estudio; sin embargo, esto puede asociarse a diferentes razones tales como las formas de producción, que las ovejas eran recién llegadas al país y adicional a ello, acababan de pasar por una situación de estrés complicada, el tipo de prueba diagnóstica empleada, entre otras.

En este estudio, los resultados obtenidos demostraron la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia* spp. en ovejas de diferentes estados, siendo Querétaro en el que se detectó una mayor serofrecuencia de positivos (61%), seguido de Hidalgo (51%), Estado de México (48%). Estos valores obtenidos son a partir de una prueba de ELISA-I basada en el uso de un extracto crudo e inactivado de la cepa A22 de *C. abortus* como antígeno; dichos resultados, son parecidos a los obtenidos por Martínez (2013), quien determinó una serofrecuencia total del 50.87%, el estudio se realizó en la zona centro-norte del país en los estados de Guanajuato (42.6%), Tlaxcala (67.5%), San Luis Potosí (61%) y Guerrero (93.4%); estos resultados también fueron altos en cuanto a serofrecuencia y pueden estar asociados a la prueba de ELISA-I utilizada, ya que también utilizó como antígeno, un extracto crudo purificado e inactivado (principalmente de cuerpos elementales) de la cepa A22 de *C. abortus*, aspecto que disminuye la sensibilidad y especificidad de la prueba, y situación que además, favorece la reacción cruzada con otras especies clamidiales¹³.

Por otra parte, en un trabajo realizado por Fernández (2011) en el Estado de Coahuila, fueron analizadas 439 sueros de cabras, de los cuales el 7.28% resultaron positivos; en ese estudio utilizó la técnica de ELISA con un kit comercial (Serological Diagnosis of *Chlamydophila abortus* by ELISA Method. Instituto Pourquier – Francia), el cual, es altamente específico, ya que no reaccionó con ninguno de los sueros de corderos libres de patógenos específicos y que fueron infectados experimentalmente con varios subtipos de *C. pecorum*; esto podría ser la razón del por qué obtuvo una serofrecuencia más baja ¹⁴.

Al hacer el análisis comparativo general entre animales importados y nativos no se encontró una gran diferencia. Pero al hacer el análisis por Estados si se puede llegar a notar la diferencia entre la serofrecuencia de animales importados positivos (32%) y en animales Nativos positivos (16%) para el Estado de México. Por otro lado, para el Estado de de Hidalgo, se determinó un 42% de animales importados positivos y un 9% de animales nativos positivos, siendo éste, el que mayor diferencia hay entre los animales positivos a anticuerpos anti-*Chlamydia* spp. En tanto, el Estado de Querétaro es el único que muestra un mayor porcentaje en la serofrecuencia de animales positivos nativos (42.8%) y para animales importados un (17.9%). Esta mayor serofrecuencia de los animales importados, podría estar dada por la baja de inmunidad que se dio por el transporte de esos animales desde Nueva Zelanda al puerto de Mazatlán en México, traslado en el que pasaron por un estado de estrés prolongado a causa del hacinamiento en el que estuvieron todo el tiempo del viaje, la alimentación restringida a la que fueron sometidos, aunados a los cambios inmunológicos provocados por la bacteria al final de la gestación.

Por otra parte, se hace mención de para que se dé el aborto clamidial, es necesario que la infección sea en etapas tempranas de la gestación (antes o al comienzo de la misma); esto debido a que *C. abortus*, comienza a invadir la placenta materna alrededor del día 60 de gestación, tiempo en el que comienza el desarrollo de los placentomas maternos; mientras que los cambios patológicos por clamidiasis, se producen hasta después del día 90 de gestación ^{1, 3}; dado que las hembras importadas ya venían gestantes durante el viaje y abortaron poco tiempo después de haber sido distribuidas a diferentes estados, cabe la posibilidad de que hubiesen sido infectadas en el sitio de origen, dado que por el tiempo de gestación y el infección se tuvo que haber dado en etapas tempranas. Sin embargo considerando que Nueva Zelanda es un país libre de la enfermedad, entonces se puede llegar a pensar en que en realidad no es libre de *Chlamydia abortus* o que es otra especie de clamidia involucrada. Así mismo, se considera que debió hacerse un mejor análisis de la situación sanitaria en la que venían los animales, ya que la probabilidad de que se hayan infectado en México, de acuerdo al comportamiento de la enfermedad, resultaría muy baja e incluso, nula. Hay estudios en los que se

han inoculado borregas a los 105 días de gestación sin lograr que los animales abortaran, sin embargo, parieron corderos débiles o vivos acompañados con gran carga bacteriana. Los corderos nacidos vivos infectados, pueden abortar posteriormente durante su primer gestación, retienen la infección en el rebaño o la transmitían a otros rebaños ^{1,3}. En Australia y Nueva Zelanda son los únicos países que se catalogan como libres de *C. abortus*, sin embargo, se encuentra presente la clamidiosis aviar producida por *C. psittaci*, la cual también se ha aislado en ovinos. Cabe señalar que las cepas de *C. psittaci*, están más estrechamente relacionadas con las cepas de *C. abortus* que con otras especies clamidiales ^{1,3}; lo que sugeriría, que el aborto clamidial en los animales estudiados, pudo deberse a otra especie como *C. psittaci* y no necesariamente por *C. abortus*.

10. Conclusión

- Con este estudio, se demuestra una serofrecuencia alta de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. y que puede ser indicativo de que la enfermedad del AEPR, se ha ido distribuyendo entre las unidades de producción de ovinos en los diferentes Estados, sin que se estén tomando las medidas necesarias de diagnóstico, prevención y control contra esta enfermedad.
- El número de animales importados, resultó ser mayor, comparados con los obtenidos en animales nativos, lo que podría ser indicio de que los ovejas llegaron infectados por clamidia, aunque no necesariamente por *C. abortus*, pero sí probablemente por otra especie clamidial como *C. psittaci*.

11. Bibliografía

1. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, 2003; Vol. 128, pp. 217-244.
2. OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal). Clamidiosis ovina. *Manual de la OIE sobre animales terrestres* 2018. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.06_Aborto_enz_ovejas.pdf fecha de consulta 10 de junio de 2018.
3. Rodolakis A, Laroucau K. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology*, 2015; 181:107-118.
4. Ortega N. Diseño de vacunas inactivadas contra el aborto enzoótico ovino: Análisis de la protección inducida en un modelo murino. [Tesis Doctoral]. España, Murcia: Universidad de Murcia; 2005.
5. Andersen AA. Chlamydia. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 3rd ed. Blackwell Publishing, 2004:415-422.
6. Entrican G, Buxton D, Longbottom D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2001; 94:273-277.
7. Karin DE, Everett. *Chlamydia* and Chlamydiales: more than meets the eye. *Veterinary Microbiology*. 2000; 75:109-126.
8. Krieg RN, Staley TJ, Brown RD, Edlund PB, Paster JB, Ward LN, Ludwig W, Whitman BW. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Vol. 4. 2011.
9. Buxton D. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Veterinary Record* 1986; 118: 510-511.

10. Rodolakis A. Clamidirosis en Cabras. International Veterinary Information Service (www.ivis.org) 2001.
11. Papp RJ, Shewen PE, Gartley CJ. Abortion and Subsequent Excretion of Chlamydiae from the Reproductive Tract of Sheep during Estrus. *Infection and Immunity* 1994; 62(9):3786-3792.
12. Rake G, Jones HP. Studies on lymphogranuloma venereum. I. Development of the agent in the yolk sac of the chicken embryo. *Journal of Experimental Medicine* 1942; 75:323-338.
13. Martínez SMG. Desarrollo de una prueba de Inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de la clamidirosis en caprinos. [tesis de maestría]; México, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
14. Fernández TAI. Diagnóstico serológico de *Chlamydia abortus* en cabras de la Comarca Lagunera. [tesis de licenciatura]; México, Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2011.
15. Jones GE, Anderson IE. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion?. *Research in Veterinary Science* 1988; 44:260-261.
16. Información por país/territorio, situación zoonositaria, OIE, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation/index/newlang/es fecha de consulta 27 de Agosto de 2018.
17. Stephens RS. *Chlamydia*. Intracellular biology, pathogenesis and immunity. USA: American Society for Microbiology Press, 1999.
18. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiological Reviews* 1991; 55:143-190.
19. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maguire D. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 2nd Ed. Great Britain: Blackwell, Science 2002; 196-202.

20. Hackstadt T, Scidmore-Carlson MA, Shaw IE, Fischer RE. The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cellular Microbiology* 1999; 1(2):119-30.
21. Stamp JT, McEwen AD, Watt JAA, Nisbet UD. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Veterinary Record* 1950; 62:251-254.
22. Shewen PE. Chlamydial infection in animals: A review. *Canadian Veterinary Journal* 1980; 21:2-11.
23. Escalante OC, Díaz AE, Segundo ZC, Suárez GF. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in México: First Report. *Revista Latinoamericana Microbiología* 1997; 39:117-121.
24. Navarro JA, García de la Fuente JN, Sánchez J, Martínez CM, Buendía AJ, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Ferri EF, Ortega N, Salinas J. Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes. *Veterinary Pathology* 2004; 41:498.
25. Rocchi MS, Wattegedera S, Meridiani I, Entrican G. Protective adaptive immunity to *Chlamydophila abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). *Veterinary Microbiology* 2009; 135:112-121.
26. Aitken ID. Chlamydial abortion. In: Diseases of Sheep Third Edition, Martin WB & Aitken ID. Diseases of Sheep. Third Edition, Oxford, UK: eds. Blackwell Scientific Ltd. 2000.
27. Sánchez RL. Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México [tesis de maestría]; México, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
28. 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 Panamericanos de Ciencias Veterinarias Guadalajara (Jalisco) México; 2008.

29. Soriano VE, Jiménez EJM, Salgado 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.
30. 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.
31. Matthews J. Diseases of the goat. 3rd edition. UK: Wiley-Blackwell, 2009.
32. Griffiths PC, Jane M, Plater J, Horigan MW, Rose MPM, Venables C, Dawson M. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test, Journal of Clinical Microbiology, 1996; Vol. 34, pp. 1512–1518.
33. 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.
34. 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.
35. 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]. España, León: Universidad de León, 2003.
36. 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.

37. Center for Food Security and Public Health. College for Food Security. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. OIE. Zoonotic Chlamydiae from mammals. Chlamydiosis. 2009.
38. Escalante OC, Lazcano C, Soberón A. *Chlamydophila* spp. como agente zoonótico en México. XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 2001.
39. 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.
40. Rodolakis A, Yousef MK. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology*, 2010; 140:382.
41. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. 04 de mayo de 2016.
42. Krkalić L, Šatrović N, Varatanović P, Džaja K, Severin: Seroprevalence of *Chlamydia abortus* in sheep in Bosnia and Herzegovina. *Veterinarski arhiv*, 2016; 86: 373-381.
43. Borel N, Doherr MG, Vretou E, Psarrou E, Thoma R, Pospischil A. Chlamydienabort beim Schaf: Untersuchung der Seroprävalenz in der Schweiz mittels eines kompetitiven ELISA (cELISA). *Schweiz.Arch.Tierheilk*, 2002; 474-482.
44. Arellano Reynoso B. Clamidiosis. *Memorias de la 21a Reunión Anual de CONASA*. Monterrey, Nuevo León; 2013:24.

12. Anexos

Estandarización de la técnica de inmunoensayo enzimático indirecto.

Se sensibilizaron 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). La placa se dejó incubando a 4° C durante toda la noche; posteriormente fue lavada 4 veces con 300 µL de PBS-Tween 20. 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 aislamiento positivo y negativo; se hicieron diluciones quíntuples por duplicado hasta completar una placa.

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.