



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Presencia de genes de resistencia (tet(C)-tetR(C)) a tetraciclina en  
aislamientos de *Chlamydia abortus***

### **TESIS**

Que para optar por el grado de:  
Maestra en Ciencias de la Producción y la Salud Animal

Presenta:

Paola Alexis Hernández Ramírez

Tutor Principal: Dra. Erika Gabriela Palomares Reséndiz  
CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP Palo Alto

Comité tutor:

Dra. Beatriz Arellano Reynoso  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr. Rigoberto Hernández Castro  
Hospital Manuel Gea González

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

Marzo 2020



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.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la UNAM, a la FES Cuautitlán y al Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y la Salud Animal por darme la oportunidad de haber cursado este posgrado e incursionar en el área de la investigación.

Al Laboratorio de Enfermedades de los pequeños rumiantes en el CENID-Salud Animal e Inocuidad del INIFAP Palo Alto, CDMX por abrirme sus puertas para realizar este trabajo de investigación.

A la Dra Gabriela Palomares por haber aceptado ser mi asesora y apoyarme en realizar esta tesis. Al Dr. Enrique Herrera por ayudarme con los muestreos y sus consejos en el trabajo de campo. Al Dr Efrén Díaz también por sus consejos y aprendizaje.

A la Dra Beatriz Arellano y el Dr Rigoberto Hernández por ser parte de mi comité tutor, ayudarme en la realización de la tesis y tomarse el tiempo para corregirla.

A Magda por ayudarme desde el inicio de la maestría, enseñarme el trabajo en el laboratorio, escucharme e intercambiar ideas para formar un buen equipo de trabajo y poder ayudarnos en el proyecto de cada una.

A las personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis.

Al CONACYT por haberme otorgado la beca de manutención para realizar los estudios de maestría. CVU: 859081

## FINANCIAMIENTO

Este estudio fue financiado con el proyecto SAGARPA CONACYT 2017-2-291311: “Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp y *Coxiella burnetii*, en ovinos y caprinos”.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Elisa y Tomas por apoyarme en esta decisión de estudiar un posgrado, creer en mi y escucharme. Gracias por todo.

A mi hermana Karen que siempre es un ejemplo de dedicación en el trabajo que realices. Siempre me escucha y me da consejos.

A mi familia que me ayudo a ser la persona que soy ahora.

Oswaldo por seguir conmigo en todo este tiempo, ser un ejemplo para mi, ayudarme en momentos difíciles y apoyarnos para seguir preparándonos académicamente y ser mejores profesionistas. Te amo

## INDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
Caprinocultura en México .....	2
Generalidades sobre <i>Chlamydia spp</i> .....	3
Clasificación taxonómica .....	3
Características estructurales de <i>Chlamydia spp</i> .....	5
Ciclo de desarrollo de <i>Chlamydia</i> .....	6
Estado de persistencia .....	8
Aborto enzoótico de los pequeños rumiantes .....	9
-Epidemiología .....	9
-Signos clínicos y lesiones .....	11
-Zoonosis .....	12
-Diagnóstico .....	13
*Detección directa .....	13
*Detección indirecta .....	17
-Prevención y Control .....	17
-Vacunación .....	18
-Uso de Tetraciclinas en infecciones por <i>Chlamydia spp</i> .....	19
- Generalidades de las tetraciclinas .....	19
-Movilidad de los genes de resistencia .....	20
-Transferencia horizontal de genes de resistencia .....	21
- Resistencia de <i>Chlamydia</i> a las tetraciclina .....	21
-Tratamiento para el AEPR .....	22
<b>Justificación</b> .....	23
<b>Hipótesis</b> .....	24
<b>Objetivo general</b> .....	24
<b>Objetivos específicos</b> .....	24
<b>Material y Métodos</b> .....	25
<b>Resultados</b> .....	35
<b>Discusión</b> .....	43
<b>Conclusiones</b> .....	48
<b>Bibliografía</b> .....	49

## RESUMEN

Hernández Ramírez Paola Alexis. Presencia de genes de resistencia (tet(C)-tetR(C)) a tetraciclina en aislamientos de *Chlamydia abortus*

*Chlamydia abortus* se caracteriza por causar abortos en los pequeños rumiantes al final de la gestación; por lo que esta enfermedad se considera de alto impacto económico, debido a la disminución del número de cabritos. En México para prevenir el aborto ocasionado por esta enfermedad se practica el tratamiento con tetraciclinas durante la gestación. *Chlamydia* obtiene resistencia a las tetraciclinas probablemente por la transferencia horizontal de genes, ya que se ha demostrado la presencia de éstos en aislamientos de *Chlamydia suis*. El objetivo fue Identificar los genes de resistencia a tetraciclina en cepas de *Chlamydia abortus*, aisladas de cabras con problemas de aborto y tratamiento previo a tetraciclinas.

Se trabajaron con 162 muestras de exudados vaginales, 40 hígados fetales, 13 cotiledones, 1 líquido amniótico y 11 líquidos abomasales, 65 en total, provenientes de diferentes grupos experimentales de cabras primíparas y multíparas con aborto o parto normal, con tratamiento y sin tratamiento con tetraciclinas. El aislamiento se realizó mediante cultivo celular y determinación de cuerpos de inclusión de *Chlamydia* spp. por inmunofluorescencia directa, y mediante PCR tiempo real identificando primero la familia *Chlamydiaceae* y posteriormente la especie *Chlamydia abortus*. Posteriormente se estandarizó una técnica de PCR punto final para identificar los genes de resistencia usando como control positivo una muestra de *C. suis* que contenía los genes de resistencia, aislada de exudado vaginal de una cerda. Se obtuvieron 78 aislamientos positivos a *Chlamydia* spp. Para el PCR tiempo real, 150 muestras de exudado vaginal y 52 de órganos fueron positivas a la familia *Chlamydiaceae*; 119 exudados vaginales, 10 cotiledones, 16 hígados y 7 líquidos abomasales fueron positivos a *Chlamydia abortus*.

Una limitante del trabajo fue que la estandarización de la PCR punto final para identificar los genes de resistencia no se logró, por lo tanto, no se buscaron los genes en las muestras positivas a *Chlamydia abortus* que fueron parte de este trabajo.

En conclusión, este estudio demostró la presencia de *C. abortus* en cabras que provenían de rebaños con problemas de abortos y que en algunos dan tratamiento con tetraciclinas para prevenirlo en el estado de Guanajuato. No hay asociación entre la infección con *Chlamydia abortus* y la aplicación del tratamiento con el antibiótico por lo que hubo hembras que fueron tratadas y que salieron positivas a la infección. Con las muestras de los órganos y exudado vaginal fue posible corroborar, que el tratamiento no evita la infección con la bacteria pudiendo o no generar el aborto.

# INTRODUCCION

## Caprinocultura en México

La caprinocultura en México representa una contribución significativa a la economía rural, ya que se desarrolla de manera preponderante en zonas marginales, con bajo grado de tecnificación, donde tiene un papel trascendente en la cadena alimenticia de las comunidades y representa un medio de sustento principalmente para los pequeños productores que obtienen leche, carne y subproductos lácteos como el queso y la cajeta (INIFAP, 2013).

Algunas de las ventajas de la producción de cabras frente a otras especies son la rusticidad, su capacidad de adaptación a ambientes adversos, particularmente a ambientes áridos debido a su pequeño tamaño, la habilidad para conservar agua; su precocidad y consecuente producción cárnica y láctea a corta edad, además de la habilidad de aprovechar mediante el ramoneo la vegetación que no es utilizada por otros rumiantes (Aréchiga et al., 2008).

Las cabras son el principal sostén de cerca de 1.5 millones de mexicanos; el inventario nacional de caprinos en México asciende a 8,7 millones de cabezas, que producen 167 000 toneladas de leche y 48.000 toneladas de carne. Este sector se distribuye fundamentalmente en cuatro zonas: árida y semiárida 39.7%, centro-bajío 21.4%, región mixteca 26.4% y zona tropical 12.4%. Siendo los principales estados productores: Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Guerrero, Coahuila, Zacatecas, Guanajuato y Michoacán (SIAP, 2017). Dentro de los principales problemas que se observan en la caprinocultura nacional, resaltan la falta de organización de los productores primarios, la presencia de intermediarios que realizan la comercialización de animales e insumos, el escaso uso de tecnología aplicada a la producción que resulta en bajos índices productivos, el ser considerada como una actividad económica secundaria, un apoyo limitado de programas gubernamentales (federales, estatales y municipales), una genética orientada a la adaptación y supervivencia más que a la producción, disminución en su rendimiento reproductivo,

ya que bajo ciertas condiciones suelen tener una alta tasa de abortos (15-18%) y bajos índices de fertilidad (60-70%), así como una alta incidencia de enfermedades zoonóticas, todas estas desventajas provocan una disminución en la producción nacional (INIFAP, 2013).

## **Generalidades sobre *Chlamydia***

El phylum *Chlamydiae* se compone de patógenos intracelulares obligados. Actualmente existe una sola clase (*Chlamydiai*) que comprende dos órdenes (*Chlamydiales* y *Parachlamydiales*) y nueve familias (Figura 1). Dentro del orden *Chlamydiales* se encuentra la familia *Chlamydiaceae* que comprende el género *Chlamydia*; los miembros de este género se consideran patógenos y son responsables de algunas enfermedades en humanos y animales de importancia comercial. Los demás miembros de las familias infectan a varios hospederos en el medio ambiente y se les conoce colectivamente como Clamidias "ambientales" (Bastidas y Valdivia 2016; Chen et al., 2019).

El rango de bacterias residentes en los animales en el orden de los *Chlamydiales* es significativamente más amplio de lo que se pensaba antes, con más de 400 especies hospedadoras documentadas a nivel mundial, la mayoría de ellas son de animales salvajes, incluyendo aves, reptiles, anfibios, peces, ungulados silvestres y marsupiales (Borel et al., 2018).

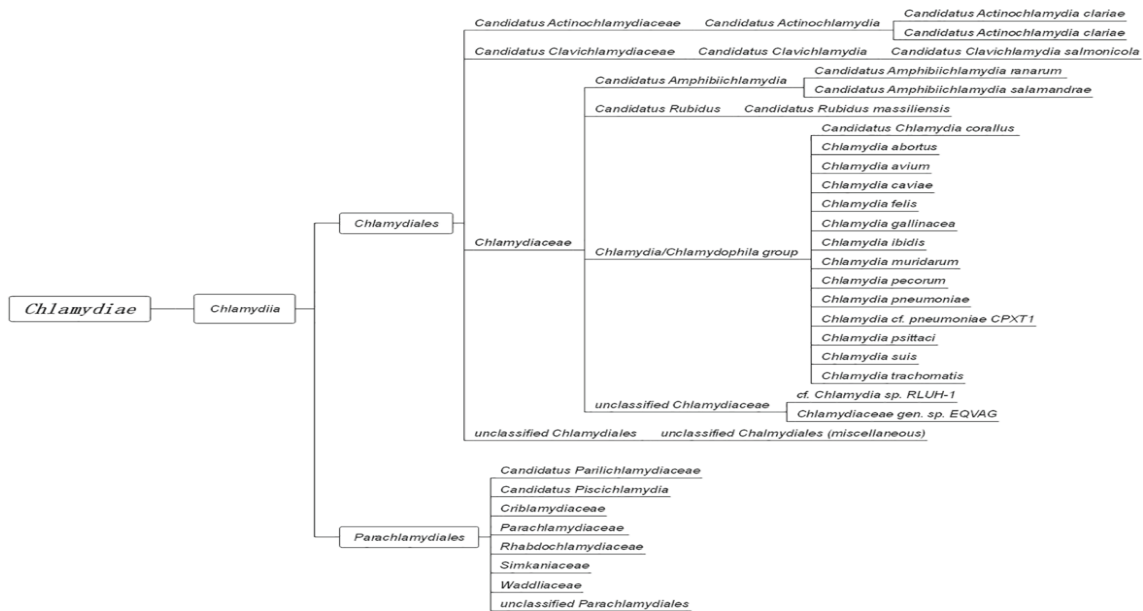
## **Clasificación taxonómica**

El género *Chlamydia* está integrado por bacterias intracelulares obligadas gram negativas que se distinguen por un ciclo de desarrollo bifásico único. *Chlamydia trachomatis* y *C. psittaci* fueron las dos especies reconocidas hasta la década de 1980. Everett, Bush y Andersen (1999) basándose en el análisis de las secuencias del gen del ARN ribosomal (ARNr), propusieron subdividir a *Chlamydiaceae* en dos géneros, *Chlamydia* y *Chlamydophila*, y dividir las especies genéticamente heterogéneas de *C. trachomatis* y *C. psittaci* en tres y cuatro especies,



respectivamente. Esta revisión dio como resultado la definición de nueve especies, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* y *Chlamydia suis*, así como *Chlamydophila abortus*, *Cp. caviae*, *Cp. felis*, *Cp. pecorum*, *Cp. pneumoniae*, y *Cp. psittaci*.

En los siguientes años se generó mucha controversia para esta clasificación, así que se retomaron algunas características para la diferenciación entre géneros bacterianos llegando a la conclusión de que las especies de *Chlamydia* pertenecen a un solo género, integrando a las once especies de la siguiente manera: *C. trachomatis* (humanos), *C. suis* (cerdos), *C. muridarum* (ratón y hámster), *C. psittaci* (aves), *C. felis* (gato), *C. abortus* (ovejas, cabras y vacas), *C. caviae* (cobayos), *C. pecorum* (ovejas, bovinos y koala), *C. pneumoniae* (humanos), *C. avium* y *C. gallinacea* (ambos en aves) (Sachse et al., 2015), recientemente se han agregado 2 nuevas especies: *Chlamydia serpentis* y *Chlamydia poikilothermis* (serpientes) (Staub, 2018), así como tres especies candidatas llamadas *Candidatus Chlamydia ibidis* (aves), *Candidatus Chlamydia corallus* y *Candidatus Chlamydia sanzinia* (serpientes) (Figura 1) (Taylor-Brown et al., 2017; Vorimore et al. 2013).



**Figura 1:** Taxonomía de *Chlamydia*. El filo *Chlamydiae* comprende una sola clase, *Chlamydia*, que contiene dos órdenes, *Chlamydiales* y *Parachlamydiales*. El orden *Chlamydiales* abarca la familia *Chlamydiaceae* donde se clasifican las especies patógenas (Chen et al., 2019).

## **Características estructurales de *Chlamydia***

*Chlamydia* posee un genoma pequeño de entre 1.1 – 1.25 Mb, lo que hace que dependa del huésped para muchos de sus requerimientos metabólicos. Aproximadamente dos tercios de las proteínas que sintetiza se comparten entre las diferentes especies, lo que refleja la conservación genética y las limitaciones evolutivas impuestas por su estilo de vida y su ciclo de desarrollo conservado. Son consideradas Gram negativas, pero los estudios bioquímicos demuestran que la pared celular carece de peptidoglicano (Essig y Longbottom, 2015).

En la membrana externa, la principal proteína es la denominada MOMP (Proteína principal de membrana externa) que al igual que el lipopolisacárido (LPS), es antigénica. MOMP está expuesta en la superficie y se extiende al espacio periplásmico realizando las funciones de: porina (translocación de ATP y otros NTPs), intercambio de nutrientes y otros factores de señales moleculares dentro de la célula huésped. En la envoltura existen otras dos proteínas que son ricas en cisteína: OmcB, que forma una monocapa en el periplasma y OmcA que forma parte de la membrana externa (Omsland et al., 2014; Villegas et al., 2008).

Mediante uniones disulfuro, el entrecruzamiento de MOMP, OmcB y OmcA forman el denominado COMC (Complejo de membrana externa). También en la membrana, se encuentran proteínas polimórficas de membrana (Pmps) cuya función es de autotransporte y son parte de procesos proteolíticos; las cuales se han identificado como antígenos inmunodominantes en huéspedes infectados (Elwell et al., 2016).

La bacteria presenta un ciclo de desarrollo multimórfico asincrónico, el cual cuenta con dos formas de la bacteria, denominadas cuerpo elemental (CE), que es la fase infectiva, y cuerpo reticular (CR), la cual es la fase replicativa una vez que se encuentra dentro de la célula. En el citoplasma celular, estos cuerpos residen dentro de una vacuola a la que se le conoce como inclusión. Durante el inicio del ciclo de desarrollo se observan proyecciones de forma hexagonal conformadas por nueve subunidades que forman un sistema de secreción tipo III (Betts-Hampikian y Fields, 2010; López, 2009).

El cuerpo elemental tiene un tamaño entre 0.2  $\mu\text{m}$ -0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro con forma cocoide, es antigénico, no proliferativo, posee un mayor número de enlaces disulfuro entre las proteínas de membrana que conforman el COMC que lo hace ser osmóticamente estable y su ADN está altamente compactado. La condensación de cromatina es causada por proteínas similares a las histonas bacterianas, como la proteína Hc1 de tipo histona H1, que está presente en *Chlamydia spp* (Omsland et al., 2014).

Dependiendo de la especie afectada, la infección puede ocurrir en células epiteliales, endoteliales, del músculo liso y en monocitos o macrófagos. La unión del cuerpo elemental a la célula huésped es mediada por MOMP y OmcB (Cossé et al., 2016).

El cuerpo reticular tiene un tamaño aproximado entre 0.6  $\mu\text{m}$ -1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, procede de la transformación del cuerpo elemental tras entrar en la célula hospedadora; está menos denso, debido a que en la membrana se disminuyen los puentes disulfuro y las proteínas tienen más función de porinas lo que lo hace más lábil y osmóticamente inestable. No es antigénico y obtiene sus nutrientes del citoplasma de la célula hospedadora, se multiplica por fisión binaria y son incapaces de infectar otras células (Omsland et al., 2014).

### **Ciclo de desarrollo de *Chlamydia***

El cuerpo elemental (CE) inicia la infección mediante la unión a células eucariotas susceptibles, mediante un proceso de adhesión en dos pasos por interacción con receptores proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG) seguida por la unión a través de OmcB (Mehlitz y Rudel, 2013).

Al contacto con las células hospedadoras, *Chlamydia* produce la remodelación de la actina, promoviendo su internalización mediante la activación de pequeñas GTPasas de la familia Rho. La polimerización de actina se acompaña de una extensa remodelación de la membrana, que es impulsada por varios factores del hospedero, que incluyen caveolina, clatrina y microdominios ricos en colesterol. Los

efectores se inyectan a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) para inducir reordenamientos del citoesqueleto que promueven la invasión y activan la señalización del huésped (Betts-Hampikian y Fields, 2010; Valdivia, 2008).

Al penetrar metabolitos como fosfatos ricos en energía y aminoácidos, aumentan su actividad metabólica y el CE se transforma en CR. Las primeras divisiones pueden ser observadas luego de 8-10 horas post infección, la inclusión crece desplazando el núcleo a la periferia, hasta que el citoplasma de la célula hospedera está completamente lleno por la inclusión. Dado que la membrana de *Chlamydia* también contiene lípidos que normalmente se encuentran en las células eucariotas y su genoma no codifica las enzimas necesarias para su síntesis, esta bacteria ha desarrollado un amplio espectro de estrategias para adquirir los lípidos de las células hospederas, incluyendo vías vesiculares y no vesiculares, además del reclutamiento de Rab GTPasas y fragmentación del aparato de Golgi. Veinticuatro horas después de la infección, los cuerpos reticulares madurarán al reducir su tamaño y reorganizar su pared celular, dando a la formación de cuerpos intermedios y posteriormente a los CE; la transformación se da de modo asincrónico por lo que se pueden encontrar mezclados diferentes estadios de maduración de los CR dentro de la misma inclusión en las últimas horas del ciclo. Es así como una inclusión puede contener tanto CE, como CR. Después de 48–72 horas, dependiendo de la especie de *Chlamydia*, se liberan CE de la célula hospedera mediante lisis o extrusión (Figura 2) (Elwell et al., 2016; Omsland, 2014; Villegas et al., 2008).

La lisis es un proceso rápido que se da por la disgregación de la membrana de inclusión y de la membrana plasmática como resultado de la acción de varias proteasas, liberando las clamidias junto con restos de la célula. La extrusión es un proceso lento, en el cual se da el empaquetamiento de varios cuerpos clamidiales en vesículas provenientes de la inclusión, para después ser liberadas envueltas en la membrana celular. Los CE liberados pueden continuar el proceso infeccioso con las células adyacentes o pueden transmitirse a otros hospederos por medio de

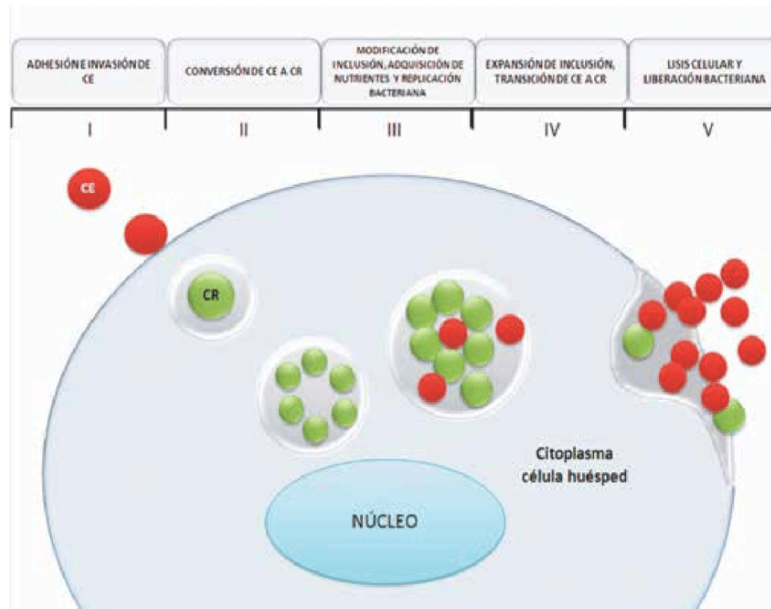
aerosoles, en contacto con la mucosa o la ingestión (Ellwell et al. 2016, Hybiske et al. 2007).

## **Estado de Persistencia**

Si durante la replicación *Chlamydia* encuentra condiciones de estrés no bactericidas, como las que surgen de la exposición a ciertos antibióticos como las penicilinas, producción de citocinas, IFN gamma o privación de nutrientes como el triptofano, la bacteria responde reduciendo notablemente la división de CRs y la producción de CEs, pudiendo reanudar rápidamente la replicación normal, una vez que las condiciones de estrés están ausentes. Esta respuesta se conoce como persistencia o respuesta al estrés (Panzetta et al., 2018).

El estado persistente puede funcionar como una vía de resiliencia siguiendo una secuencia de eventos que involucran: (i) detección de condiciones desfavorables, (ii) entrada en un estado persistente, (iii) supervivencia en condiciones adversas, (iv) detección de condiciones favorables, (iv) salida de la persistencia, y (v) reanudación a la producción normal de progenie infecciosa (Panzetta et al. 2018)

Estos cuerpos persistentes o aberrantes son cuerpos reticulares de mayor tamaño, que limitan la expresión de genes relacionados con la adquisición de nutrientes de la célula hospedera, por lo tanto, se alarga el tiempo de división y de la conversión de cuerpos reticulares a cuerpos elementales. Este estado también conlleva a la reducción en la expresión de antígenos, cambios de la morfología y la pérdida de la infectividad. Se piensa que estas formas podrían tener un papel importante en la patogénesis de la infección crónica, debido, entre otros, a la presencia en este estadio de proteínas de choque térmico (HSP) (Panzetta et al., 2018; Villegas et al. 2008).



**Figura 2** Ciclo de desarrollo de *Chlamydia*; los cuerpos elementales (CE) infectan las células hospedera y luego se convierten en cuerpos reticulares (CR) que se replican dentro de una vesícula llamada Inclusión. Después los CR se convierten en CE, lisan la célula y se liberan para infectar otras células, este proceso tiene una duración de  $48 \pm 72$  horas (Jutinico et al., 2015).

## Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes

### Epidemiología

La clamidiasis, o aborto enzoótico ovino o aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), es una enfermedad infecto-contagiosa, zoonótica, causada por bacterias del género *Chlamydia*. Las especies que más afectan a los pequeños rumiantes son *C. abortus* y *C. pecorum*. La primera es causante de abortos en el último tercio de la gestación debido a una placentitis, mientras que la segunda causa principalmente artritis, conjuntivitis, enteritis e infertilidad, sin descartar la posibilidad de que cause abortos (Rodolakis y Laroucau, 2015).

*C. abortus* es una causa de aborto en ovejas y cabras en casi todas las regiones del mundo que crían rumiantes, con la excepción de Australia y Nueva Zelanda. Este es particularmente el caso en los sistemas de producción, en los que, los animales se manejan de forma intensiva sobre todo en la época de parto. Hay datos

limitados sobre las tasas de prevalencia para diferentes países, en el Reino Unido se recopilan los resultados de los laboratorios de diagnóstico de pruebas como serología y PCR, que se publican anualmente el Informe de Análisis de Diagnóstico de Investigación Veterinaria, en 2013 representó el 44% de los abortos ovinos (Essig y Longbottom, 2015).

Lenzko en 2011 realizó un estudio de prevalencia en Alemania usando diferentes métodos de diagnóstico, mediante ELISA detectó un 94% y por PCR un 78% de rebaños ovinos positivos con bajas tasas de aborto. *C. abortus* juega un papel importante en el aborto en ovejas y cabras en Jordania y causa abortos en ovejas con una tasa de incidencia de 9.07% en Arabia Saudita. En Egipto, detectaron 68% de borregas serológicamente positivas con la prueba de fijación del complemento (Abdelfattah, 2016). El AEPR fue el hallazgo más común en tinciones de Stamp de placentas de fetos abortados en ovinos durante la época de partos en un rebaño con problemas de abortos, ingreso de animales al rebaño y sin vacunación en Escocia 2019 (Anónimo, 2019).

En mayo de 2016, la infección por *Chlamydia abortus* en pequeños rumiantes pasó de ser una enfermedad exótica a una enfermedad endémica de notificación obligatoria mensual (DOF, 2016). El hecho de no reconocer la presencia de la enfermedad en el territorio nacional tuvo como consecuencia el retraso para contar con las herramientas de diagnóstico y de prevención necesarias para su control además de conocer el comportamiento de la infección entre los rebaños.

En 1997 se realizó el primer reporte de aislamiento del agente etiológico a partir de abortos en caprinos. Posteriormente, en el año 2001 se demostró la participación de *Chlamydia* spp., en un proceso zoonótico a partir de ganado caprino (Escalante-Ochoa et al. 1997 y 2001). En 2005 se demostró la presencia de la bacteria en el estado de Michoacán a partir de heces, fetos abortados y cabritos muertos prematuramente. En 2008 se llevó a cabo un estudio serológico en rebaños caprinos lecheros de seis estados del país y se encontraron anticuerpos contra la bacteria. En 2011 también se detectó la presencia de la enfermedad en el estado de Guanajuato, utilizando herramientas diagnósticas como ELISA, aislamiento y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mora et al., 2015).

Durante los años de 2012 y 2013 se obtuvieron 186 muestras procedentes de 49 rebaños de los estados de Coahuila, Jalisco, Puebla, Veracruz y Querétaro, donde se logró el aislamiento bacteriano de 23.1% de las muestras y por PCR se detectó un 9.6%. El análisis de la secuencia de los productos de amplificación mostró una homología del 99% con *C. abortus* cepa A.22, FAS, S26, EBA y VPG, entre otras (Sánchez, 2014).

En 2001 y 2013 se demostró la participación de *Chlamydia* spp., en infecciones zoonóticas en México, que se relacionaron con ganado caprino y ovino infectado con este agente (Escalante-Ochoa et al., 2001; Barbosa et al., 2013).

### **Signos clínicos y lesiones**

Esta enfermedad se caracteriza por provocar abortos en el último tercio de la gestación o el nacimiento de crías débiles, las cuales mueren dentro de las primeras horas de vida, aun cuando reciban cuidados médicos. El aborto ocurre generalmente sin signos previos, aunque se pueden presentar cambios de comportamiento y descargas vaginales que contienen un gran número de cuerpos elementales 24-48 horas previas al aborto, esto ocurre en las dos o tres últimas semanas de gestación, aunque en algunos casos puede ocurrir antes (Gutierrez et al. 2011; Entrican et al. 2010).

Los animales abortados pueden tener una apariencia normal o mostrar edema subcutáneo. No hay lesiones macroscópicas específicas y pueden estar cubiertos de un material de color café amarillento (meconio). Además del edema difuso, también se observan fluidos sanguinolentos en la cavidad abdominal y pleural, así como petequias en la lengua, cavidad bucal y en las pezuñas. La placenta se observa engrosada y de rojizo amarillento, también se puede observar un exudado vaginal de color rosa sucio durante 7 a 10 días después del aborto (Essig y Longbottom et al. 2015).

Los estudios sobre la patogenia de la infección han demostrado que las lesiones se limitan principalmente a la placenta, aunque también pueden ocurrir en el cerebro y el hígado de los fetos. Las lesiones placentarias se desarrollan inicialmente en el



hilio del placentoma y se extienden hasta involucrar la membrana intercotiledonarias. Esto conduce a la destrucción del tejido placentario que afecta la adquisición de nutrientes y la regulación hormonal y puede resultar en la expulsión prematura del feto. Los cambios histológicos en la placenta y la aparición de lesiones ocurren típicamente después de los 90 días de gestación, sin embargo, ha sido demostrado que, en ovejas infectadas experimentalmente, *C. abortus* puede ser identificada a partir de los 85 días de gestación (Livingstone et al. 2017).

El papel del macho en la transmisión de la enfermedad no es muy claro, pero los machos nacidos de hembras infectadas excretan la bacteria a través del semen, que suele ser de baja calidad. También pueden desarrollar epididimitis, vesiculitis seminal e infecciones en los testículos y glándulas accesorias, lo que conduce a la esterilidad e infertilidad (Rodolakis y Laroucau, 2015).

### **Zoonosis**

Se ha descrito que afecta a mujeres embarazadas principalmente después de la exposición con cabras y borregos infectados durante la temporada de partos. Al igual que en los pequeños rumiantes, *C. abortus* tiene la habilidad de colonizar la placenta estableciéndose en las células trofoblásticas ocasionando la muerte fetal. La transmisión de la enfermedad se ha reportado en el Reino Unido, Francia, Estados Unidos, Holanda, Italia y Suiza (Mohamad y Rodolakis 2010).

Los primeros síntomas de la infección en mujeres gestantes son la fiebre, dolor de cabeza, náuseas y vómito, además de dolor abdominal; cuando ocurre en el primer trimestre del embarazo se presentan abortos espontáneos y si ocurre después, provoca un parto prematuro y muerte del recién nacido. Cuando la infección en mujeres no es diagnosticada y tratada puede provocar falla renal, disfunción hepática, coagulación intravascular diseminada y podría provocar la muerte (Essig y Longbottom, 2015; Mohamad y Rodolakis 2010).

También se ha descrito la infección extragestacional de *C. abortus* manifestada como enfermedad inflamatoria pélvica (Walder et al., 2003). Recientemente se ha

informado de neumonía atípica relacionada con *C. abortus* en España (Ortega et al., 2016).

### **Diagnóstico**

Cuando se produce un brote de abortos en un rebaño, es esencial un diagnóstico adecuado, temprano y preciso, esto es de importancia crítica para adoptar medidas de control adecuadas para limitar o prevenir la diseminación de la infección. Un diagnóstico presuntivo de infección por *Chlamydia* se puede hacer sobre la base de antecedentes, hallazgos clínicos y patológicos generales, abortos ocurridos en las últimas 2-3 semanas de gestación, asociados con placentitis necróticas y condiciones epidemiológicas locales; sin embargo, un diagnóstico preciso requiere confirmación a través de pruebas de laboratorio, debido a que otros microorganismos también pueden ser causantes de aborto en pequeños rumiantes como, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Leptospira*, *Brucella*, *Coxiella burnetii*, y *Toxoplasma gondii*, que provocan también lesiones en placenta, por lo que se hace necesario la confirmación a través de un laboratorio. Para diagnosticar el AEPR existen dos propuestas, la primera involucra la detección directa del agente en tejidos o muestras de exudado vaginal, mientras que la segunda involucra pruebas serológicas a partir de muestras sanguíneas para determinar la presencia de anticuerpos anti-clamidiales (OIE, 2018; Sachse et al. 2009).

### **Detección directa**

Se pueden realizar frotis preparados a partir de placenta. Para detectar la presencia de la bacteria a partir de las vellosidades coriónicas afectadas, de hisopos tomados de la vagina en el momento del aborto o de las capas húmedas de fetos y corderos abortados, las técnicas más utilizadas son: Machiavello modificado, Gimenez, Giemsa, Stamp o Ziehl Neelsen modificado, los frotis teñidos muestran pequeños cuerpos elementales cocoides de color rojo/rosa contra un fondo celular azul o verde teñido de contra. Aunque este método funciona bien en casos de tejidos infectados, las muestras con bajos niveles de infección donde los CEs sólo aparecen por

separado se puede pasar por alto fácilmente (Sachse et al., 2009). Cuando se sospecha de una infección por *C. abortus*, esta técnica carece de sensibilidad y especificidad, ya que *Coxiella burnetii* en términos de morfología, características tintoriales y signología clínica, son muy similar (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Uno de los principales tejidos donde *C. abortus* puede ser aislada es la placenta (cotiledones); ésta debe ser recolectada tan pronto como sea posible después del aborto para evitar su contaminación con otros microorganismos. Para su conservación y preservación de la bacteria puede mantenerse en refrigeración a 4°C solo si su procesamiento se realizará dentro de las primeras 48 horas; si esto no sucede debe mantenerse en ultracongelación a -80°C de forma ideal, o bien a -20°C, aunque deben procesarse lo más pronto posible.

Dentro de las secreciones contaminadas que excretan los animales infectados, la que se utiliza con mayor frecuencia es el exudado vaginal recolectado con hisopos. Éste se recomienda realizarlo justo después del aborto y como máximo 14 días después. Para su conservación también debe mantenerse en ultracongelación. De los fetos abortados el líquido abomasal, líquido pleural, líquido peritoneal, o tejidos como pulmón o hígado, pueden muestrearse y mantenerse con las especificaciones que se mencionan para la placenta (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Las muestras colectadas deben ser enviadas al laboratorio de diagnóstico en un medio de sucrosa-fosfato-glutamina (denominado SPG), suplementado con suero fetal bovino y antibióticos. Debe prescindirse del uso de penicilina, tetraciclina o cloranfenicol, ya que inhiben el crecimiento de *Chlamydia* (Sachse et al. 2009).

El aislamiento es considerado la “prueba de oro” para el diagnóstico de la infección, al ser una bacteria intracelular obligada requiere ser aislada y propagada en embrión de pollo o en cultivo celular. *C. abortus* puede ser aislada en una variedad de líneas celulares como McCoy, HeLa, L929, células de riñón de hámster neonato (BHK), entre otras. Este tipo de diagnóstico normalmente no se realiza de forma rutinaria, excepto en algunos laboratorios de investigación, ya que, dependiendo del tipo de muestra presentada para el análisis y el método de detección empleado, también puede haber problemas de contaminación causados por otras especies bacterianas

Gram negativas que reducen la posibilidad de aislar al agente o pueden dar lugar a reacciones falsas positivas y, por lo tanto, un diagnóstico erróneo. Además, el enfoque de aislamiento también requiere mucho tiempo y experiencia especializada e instalaciones adecuadas para el cultivo celular (Sachse et al., 2009). Para la detección de los antígenos, las técnicas que existen de manera comercial son a partir de *C. trachomatis*, aunque en teoría también deberían ser adecuadas para detectar infecciones de otras especies de *Chlamydia* en animales debido a que se elaboran a partir del LPS específico de la familia. Estos inmunoensayos incluyen pruebas de anticuerpos fluorescentes directos (IFD) (IMAGEN, Celltech; Chlamydia Direct IF, BioMerieux; Vet-IF, Cell Labs) con el fin de demostrar la presencia de inclusiones clamidiales intracitoplasmáticas en el microscopio de fluorescencia (OIE 2018; Sachse et al. 2009).

Con las muestras de tejido se pueden realizar preparaciones histológicas usando una variedad de procedimientos de tinción como Giemsa o azul de metileno, pero con la desventaja que son poco específicos y puede haber reacción cruzada con otras bacterias, además de que, por esta razón se debe tener especial cuidado en su interpretación. En la técnica de inmunohistoquímica que usan anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie como el LPS o MOMP, aumenta la sensibilidad y especificidad de este tipo de técnicas, aunque aún su interpretación dependa mucho del resultado de otras pruebas (Sachse et al., 2009).

La detección de ADN de clamidias en las muestras de placenta e hisopos mediante PCR ha cambiado radicalmente el diagnóstico de las infecciones en los pequeños rumiantes, esto es debido a las ventajas en la facilidad de uso, mayor sensibilidad y rápida disponibilidad de resultados de una gran cantidad de muestras en comparación con las técnicas de inmunodetección de antígenos. La detección de ADN de *C. abortus* en muestras de fetos abortados es suficiente para concluir que esta bacteria ha producido el aborto. Por otro lado, la presencia del ADN de *Chlamydia* en hisopos vaginales o placenta no siempre se puede asociar con el aborto, ya que *C. abortus* a menudo se detecta en hisopos vaginales y placenta de

ovejas o cabras con parto normal hasta 2 semanas posparto (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Mientras que la PCR en punto final solo puede confirmar la presencia o ausencia del patógeno, la PCR en tiempo real (qPCR) permite además cuantificar la cantidad del agente presente en la muestra. La acumulación de producto amplificado se controla midiendo la señal fluorescente generada por la digestión con exonucleasa de una sonda fluorogénica de doble marcado. Además, la qPCR no requiere el manejo de la muestra posterior a la PCR, lo que impide la posible contaminación por transferencia de productos de PCR y da como resultado ensayos más rápidos y de alto rendimiento (Sachse et al., 2009).

Las pruebas de qPCR específicas de la familia *Chlamydiaceae* desarrolladas por Everett, Bush y Andersen (1999), DeGraves et al. (2003) y Ehrlich et al. (2006) que están dirigidas al gen 23S RNAr han sido validadas y utilizadas en pruebas de rutina. Con las investigaciones que se realizan en el estudio del genoma de esta bacteria se han identificado genes candidatos para elaborar técnicas de PCR que sean específicas para las diferentes especies del género *Chlamydia*; como el gen de la proteína de membrana externa (*ompA*), el cual fue utilizado por Pantchev et al. (2009) para hacer la discriminación entre *C. abortus* y *C. psittaci* debido a su estrecha relación genética, y el hecho de que tienen hospedadores que pueden infectarse con ambas especies como el caso de los rumiantes y las aves generando un cuadro clínico similar.

Para el diagnóstico se recomienda un sistema que incluya una PCR específica de *Chlamydiaceae* basada en las secuencias de ARN ribosomal 23S (Ehrlich et al., 2006) y si el resultado es positivo, realizar una PCR específica de *C. abortus* basada en secuencias *ompA* (Livingstone et al., 2009; Pantchev et al., 2009) o ensayos de hibridación de microarreglos de ADN.

La técnica de microarreglos de ADN es capaz de verificar la secuencia exacta de nucleótidos de una región objetivo a través de la hibridación. Además, un ensayo de esta naturaleza puede diseñarse para apuntar a una gran cantidad de loci genómicos (limitados solo por el tamaño de la matriz) para garantizar la

discriminación entre especies microbianas, cepas, genotipos, serotipos, tipos de resistencia, siendo una alternativa de diagnóstico prometedora (Abdelfattah, 2016; OIE, 2018).

#### Detección indirecta

La detección de anticuerpos en infecciones por clamidias en animales tiene múltiples propósitos: confirmación de la enfermedad clínica, presencia o ausencia de infección, realización de encuestas epidemiológicas para estimar la prevalencia de infección o la determinación del estado inmune después de la vacunación, por nombrar algunos. En general, los anticuerpos se identifican después de la unión a inclusiones, CE o antígenos de clamidias individuales (Sachse et al., 2009).

Después del aborto, los títulos de anticuerpos maternos contra *C. abortus* aumentan, esto puede ser medido por la técnica de fijación del complemento (FC), pero la reacción de antigenicidad cruzada entre *C. abortus* y *C. pecorum*, así como de otras bacterias Gram negativas que pueden complicar la interpretación de resultados (OIE, 2018).

Existen pruebas serológicas más sensibles y específicas como la técnica de ELISA, basados en la detección de anticuerpos monoclonales específicos de *C. abortus* que reconocen regiones específicas de la proteína mayor de la membrana externa (MOMP) y fragmentos de proteína recombinante de la familia POMP (Sachse et al., 2009).

#### **Prevención y control**

Una práctica común en los rebaños a considerar es la introducción de animales a estos sobre todo si no se sabe que enfermedades son frecuentes en el lugar del que provienen. Cuando una cabra aborta, ésta debe ser inmediatamente aislada del rebaño hasta que las descargas vaginales cesen. Todos los fetos abortados, las placentas y la cama del corral deben sacarse y eliminarse (lo ideal es incinerar, o bien enterrar los desechos adicionando una capa de cal antes de tapar con tierra), a fin de evitar su ingestión por parte de carnívoros domésticos o salvajes que podrían diseminar la enfermedad. Si es posible, los nacimientos deben limitarse a

un lugar específico que permita la desinfección sin generar aerosoles (Entrican et al., 2010; Longbottom et al., 2013; Rodolakis y Laroucau, 2015).

Para evitar la infección en los humanos, las mujeres embarazadas y personas inmunosuprimidas no deben trabajar con los animales durante la temporada de partos y deben evitar el contacto con todas las posibles fuentes de infección, incluyendo la ropa contaminada. Se deben aplicar normas de higiene básicas, como lavarse las manos después de trabajar con animales infectados y el uso de guantes para trabajar con la placenta y abortos.

### **Vacunación**

Por el momento no es posible la vacunación en México, aunque en otras partes del mundo existen y se comercializan inmunógenos elaborados a partir de cepas de *Chlamydia* vivas atenuadas o inactivadas. En Europa, se ha utilizado con éxito una vacuna comercial viva atenuada sensible a la temperatura basada en una cepa mutante de AB7 que tiene una tasa de crecimiento reducida a 39.5°C, que es la temperatura corporal de los pequeños rumiantes (cepa 1B; Enzovax, MSD Animal Health; vacuna Ceva Chlamydia, CEVA Animal Health). Recientemente, se ha informado que la vacuna puede causar abortos en una proporción de animales vacunados probablemente debido a la administración de altas dosis de CE que estimulan la inmunidad protectora y no a la atenuación de la temperatura inducida por nitrosoguanidina (NTG) de la cepa vacunal (Longbottom et al., 2018). Esta vacuna debe administrarse al menos 4 semanas antes del empadre y no puede usarse en combinación con el tratamiento con antibióticos. Las vacunas inactivadas también están disponibles en países europeos, éstas se pueden aplicar durante la gestación.

Las vacunas vivas atenuadas inducen tanto una respuesta inmune de tipo celular como humoral y los estudios realizados en ellas se correlacionan con una disminución del 80% al 7.1% de abortos en comparación con animales no vacunados (Chalmers, 1997); aunque tienen el inconveniente de no impedir la colonización del microorganismo, además de que, no se pueden distinguir animales vacunados de infectados con las pruebas serológicas. En el caso de las bacterinas,

se ha comprobado una menor eficacia debido a que estimulan principalmente una respuesta inmune de tipo humoral, lo que ocasiona una menor eficiencia para eliminar a bacterias intracelulares, ya que se han reportado brotes en rebaños vacunados (Essig y Longbottom, 2015; OIE, 2018).

## **Uso de Tetraciclinas en infecciones por *Chlamydia***

### **Generalidades de las tetraciclinas**

Las tetraciclinas (TET) se usan ampliamente en medicina humana y veterinaria por su bajo costo, amplio espectro de actividad y excelente distribución tisular. La mayoría de las bacterias Gram negativas, Gram positivas, responden a dosis terapéuticas de este antibiótico. Las TET son antibióticos bacteriostáticos que impiden la unión del aminoacil-tRNA (ARN de transferencia unido químicamente a un aminoácido) al sitio A del ribosoma bacteriano, uniéndose directamente a la proteína S7 de la subunidad 30S e inhiben, en forma reversible, la síntesis de proteínas. Desde su descubrimiento inicial hace varias décadas, un gran porcentaje del volumen total de antibióticos utilizados en medicina veterinaria para la terapia y la promoción del crecimiento fueron TET, por lo que, solo 7 años después se descubrieron fenotipos de resistencia en diferentes géneros bacterianos (Jara, 2007).

Se han descrito tres mecanismos principales de resistencia a tetraciclinas (Roberts, 2005):

- Eflujo activo. - codifican proteínas asociadas a membranas que expulsan TET de la célula, disminuyendo la concentración intracelular de la droga, protegiendo de esta manera los ribosomas.
- Protección ribosomal. - Estos genes codifican proteínas citoplasmáticas que se agrupan dentro de la superfamilia de factores de traducción de GTPasas y protegen al ribosoma de la acción de las TET.



- Inactivación enzimática. - Uno de los genes codifica una enzima, que modifica químicamente la tetraciclina en presencia de oxígeno y NADPH, inactivándola.

Todos los genes *tet* de eflujo codifican proteínas Tet asociadas a membranas que expulsan tetraciclinas de la célula, disminuyendo la concentración intracelular de la droga, protegiendo de esta manera los ribosomas. Las proteínas de eflujo son las proteínas Tet mejor estudiadas. Los genes *tet* se encuentran tanto en bacterias gram-positivas como en gram-negativas. El eflujo de tetraciclinas está mediado por bombas de eflujo dependientes de energía (Jara, 2007).

Se han identificado y caracterizado 45 genes diferentes que confieren resistencia a la tetraciclina; que incluyen 29 genes que codifican proteínas de eflujo activo, 12 genes que codifican proteínas de protección ribosomal y 3 que codifican una enzima inactivante, además de un gen con un mecanismo de acción desconocido. Un total de 126 géneros diferentes (76 Gram negativos y 50 Gram positivos) se han identificado como portadores de genes de resistencia a la tetraciclina. Las TET tienen la capacidad de acumularse en las células eucariotas, mediante el paso a través de difusión de la membrana con ayuda de glicoproteínas (Bambeke et al., 2006; Chifiriuc et. al., 2016).

### **Movilidad de los genes de resistencia**

Los genes *tet* se encuentran en una variedad de bacterias aisladas del hombre, animales y del medio ambiente. La mayoría de estos determinantes se ubican en el cromosoma o en plásmidos conjugativos o no conjugativos. Muchos genes *tet* están asociados con transposones conjugativos o no conjugativos y pueden localizarse en plásmidos o en el cromosoma. También pueden ser parte de integrones y casetes genéticos que se recombinan en un sitio específico y codifican resistencia a un antibiótico. Junto con los transposones, son los sistemas que más actúan en la adquisición de resistencias por parte de los plásmidos. El casete es un elemento que incluye un gene y un sitio recombinante. La naturaleza móvil de muchos genes de resistencia a la tetraciclina puede explicar en parte su amplia distribución entre diferentes especies bacterianas (Jara, 2007; Roberts y Schwarz, 2017).

## **Transferencia horizontal de genes de resistencia**

La transferencia horizontal de genes (THG) de resistencia a antibióticos juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos en bacterias. Existen tres métodos de transferencia de ADN en la naturaleza: conjugación bacteriana, transformación y transducción (Von Wintersdorff et al., 2016).

A través de la THG, el ADN exógeno puede transferirse de una bacteria a otra. Con la acumulación de genes involucrados en diferentes mecanismos de resistencia del ADN exógeno, las bacterias pueden adquirir multiresistencia a diferentes antibióticos rápidamente (Roberts y Schwarz, 2017).

Se piensa que la conjugación es el mecanismo más importante de diseminación de la resistencia entre las bacterias y puede realizarse vía plásmidos conjugativos o transposones conjugativos. Los genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(Y)*, *tet(30)* y *tet(31)* se han encontrado exclusivamente en géneros gram-negativos. La mayoría de estos géneros corresponden a entéricos facultativos (Jara, 2007).

### **Resistencia de *Chlamydia* a las tetraciclinas**

A mediados de la década de 1990, se aislaron las primeras cepas resistentes a TET de *Chlamydia suis* de cerdos enfermos y sanos en los Estados Unidos. En el año 2001 se estableció la resistencia fenotípica mediante el desarrollo de la bacteria y la formación de cuerpos aberrantes en cultivos celulares con medio que contenía tetraciclina en altas concentraciones (Lenart, et al. 2001) Para el 2004 Dugan et al. realizaron la caracterización genética de la resistencia fenotípica, encontrando que de las 13 determinantes de resistencia a tetraciclinas que buscaron (*tet: A,B,C,D,E,G,H,K,L,M,O,Q,S*) solo *tet(C)* junto con su gen represor *tet R(C)* dio positivo, éstas secuencias de los aislamientos revelaron la presencia de islas genómicas (que varían en tamaño de 5 a 13,5 kb) en diferentes cepas de *C. suis* que se integraron a su cromosoma . Cada isla porta genes que codifican una bomba de flujo TET y un represor regulador (*tet(C)* y *tetR(C)*, respectivamente), una secuencia de inserción única (IScs605) y genes adicionales implicados en la replicación y movilización del plásmido. Las islas *tet(C)* de *C. suis* comparten más

del 99% de identidad con secciones de un plásmido de resistencia aislado de *Aeromonas salmonicida*, por lo que, el descubrimiento de las islas *tet(C)* representa la primera identificación de resistencia a antibióticos adquirida a través de la transferencia horizontal de genes en cualquier bacteria intracelular obligada (Sandoz y Rockey, 2010).

Los experimentos *in vitro* han demostrado la transferencia horizontal de *tet* de *C. suis* a cepas que infectan al humano como *C. trachomatis*. Por el contrario, no se observó la transferencia de *tet* de *C. suis* a *C. caviae* (Suchland et al., 2009). En un estudio más reciente que examinó la transferencia horizontal de genes de la 16S RNAr en organismos procarióticos, se descubrió que cuatro cepas de *C. trachomatis* tenían genes 16S RNAr de *C. suis*. Estos datos indican que la transferencia de genes entre *C. suis* y *C. trachomatis* ocurre en la naturaleza y queda la incógnita de que, estos genes de resistencia a antibióticos se transfieran a otras especies de *Chlamydia*. Sin embargo, no hay estudios que demuestren que otras especies de *Chlamydia*, tengan determinantes de resistencia TET (Borel et al., 2016).

Existen estudios que describen el aislamiento de cepas de *C. trachomatis* resistentes a los antibióticos. Aunque 11 de los 15 aislamientos resistentes se asociaron con el fracaso del tratamiento clínico, todos los aislamientos seleccionados mostraron características de 'resistencia heterotípica', una forma de resistencia fenotípica, en la que una pequeña proporción de una especie microbiana infectante es capaz de expresar resistencia en cualquier momento (Sandoz y Rockey, 2010).

### **Tratamiento para el AEPR**

Si se sospecha que existe la presencia de la enfermedad en un rebaño de cabras gestantes, se pueden administrar oxitetraciclinas de larga duración a dosis de 20 mg/kg vía intramuscular de dos a tres aplicaciones cada 48 horas, para disminuir la severidad de la infección. Este tratamiento reduce la cantidad de bacterias eliminadas, pero no erradica la enfermedad y mucho menos influye en los daños patológicos sufridos en la placenta, aunque previene daños adicionales; por lo que algunas cabras posiblemente aborten o tengan crías débiles, además de continuar

eliminando la bacteria (Longbottom et al. 2013). Por estas razones, la terapia con antibióticos no debe administrarse como profilaxis de la infección, ya que podría conducir la aparición de resistencia adquirida a las tetraciclinas y debe ser utilizada en circunstancias excepcionales durante los brotes para reducir los abortos (Bommana y Polkinghorne, 2019; Essig y Longbottom, 2015).

Hasta la fecha, las cepas resistentes a la tetraciclina en *C. abortus* aún no se han aislado, sin embargo, las reinfecciones o la eliminación de *C. abortus* después del tratamiento sugiere un fracaso del tratamiento y el posible establecimiento de un estado de persistencia de la bacteria al contacto con el antibiótico. Se ha informado la detección simultánea de *C. suis* y *C. abortus* en el semen de jabalíes y la conjuntiva de cerdas en la producción porcina (Schautteet et al., 2010), destacando aún más el riesgo potencial de propagación de la resistencia TET a otras especies de *Chlamydia* si se mantiene una presión selectiva (Suchland et al., 2009). A pesar de ser un importante patógeno de importancia zoonótica, parece haber una falta de modelos / estudios *in vitro* e *in vivo* que investiguen el papel de los antibióticos en el tratamiento de las infecciones por *C. abortus* en humanos y animales (Bommana y Polkinghorne, 2019).

## JUSTIFICACIÓN

Las infecciones generadas por *Chlamydia* spp., pueden causar pérdidas en la producción caprina tanto lechera como cárnica debido a la disminución de cabritos por los abortos producidos. El AEPR causado por *Chlamydia abortus* en nuestro país ha sido recientemente aceptado como endémico, por lo tanto, es posible realizar estudios sobre prevalencia, incidencia, diagnóstico y tratamiento para combatirla y controlarla.

El uso de antibióticos como la tetraciclina (TET) han sido utilizados desde el descubrimiento de las infecciones con *Chlamydia* spp. en diferentes especies como medida de control, pero la resistencia a las TET se ha ido incrementando, dificultando así la eliminación del microorganismo del huésped, generándose

infecciones persistentes y favoreciendo la diseminación de la bacteria entre los hospederos.

Diversos estudios han demostrado que algunas especies de *Chlamydia* como *C. suis* contienen genes de resistencia a tetraciclinas y que han sido adquiridos por transferencia horizontal. En el caso de *Chlamydia abortus* aun no se ha reportado la presencia de estos genes de resistencia, pero si hay evidencias de abortos aun con cabras a las que se les da el tratamiento con tetraciclinas, por lo que es importante descartar la resistencia a este antibiótico en *C. abortus*.

## HIPÓTESIS

Los aislamientos de *Chlamydia abortus* en rebaños de cabras que recibieron tratamiento con tetraciclinas presentarán resistencia a este antibiótico, debido a la presencia de los genes que codifican para la bomba de eflujo *tet(C)* y el gen represor regulador *tetR(C)*.

## OBJETIVO GENERAL

1. Identificar los genes de resistencia a tetraciclina en cepas de *Chlamydia abortus*, aisladas de cabras con problemas de aborto y tratamiento previo a tetraciclinas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener aislamientos mediante cultivo celular de *Chlamydia* spp. confirmándolo mediante inmunofluorescencia directa, a partir de muestras de hisopos vaginales de cabras en el estado de Guanajuato
2. Estandarizar la técnica PCR en tiempo real para identificar a la familia *Chlamydiaceae*.
3. Estandarizar la técnica PCR en tiempo real para determinar la especie *Chlamydia abortus*.
4. Detectar la presencia de genes de resistencia en las cepas de *C. abortus* mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa punto final.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó en el estado de Guanajuato con rebaños lecheros caprinos que presentaron problemas de aborto, en algunos de estos rebaños se administró tratamiento preventivo con tetraciclinas como medida de control para evitar el aborto.

Se aplicó un cuestionario en cada rebaño con la finalidad de obtener información de los animales muestreados y las características del rebaño del que provenían, tomando en cuenta aspectos como edad y raza de la cabra, número de partos, antecedentes de abortos y tratamiento con tetraciclina.

Como parte del proyecto del que se integró este trabajo se analizaron las muestras para descartar *Brucella* spp. y *Leptospira interrogans* para diferentes serovariedades

La administración de las tetraciclinas en los diferentes rebaños de acuerdo con el cuestionario realizado fue: dosis de 20mg/Kg de oxitetraciclinas por vía intramuscular o subcutánea dependiendo del producto que utilizaron. El momento de la aplicación fue, de los 2 meses hasta los 4 meses de gestación; además la duración del tratamiento que fue de 1-3 aplicaciones. Tomando en cuenta, el tratamiento con tetraciclinas, número de partos y la presencia de aborto se formaron siete grupos experimentales (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Grupos experimentales en los que se dividieron la procedencia de las muestras recolectadas.

Grupo	Descripción
1	Hembras de primer parto a las que se les administró tratamiento con tetraciclinas en promedio a los 2 meses de gestación y que presentaron aborto.
2	Hembras de primer parto a las que se les administró tratamiento con tetraciclinas en promedio a los 3 meses y medio de gestación y que parieron de forma normal.

3	Hembras de más de 2 partos a las que se les administró tratamiento con tetraciclinas en promedio a los 2 meses de gestación y que presentaron aborto.
4	Hembras de más de 2 partos a las que se les administró tratamiento con tetraciclinas en promedio a los 3 meses de gestación y que parieron de forma normal.
5	Hembras de primer parto que no recibieron ningún tratamiento preventivo durante la gestación y que presentaron aborto.
6	Hembras de primer parto que no recibieron tratamiento preventivo durante la gestación y parieron de forma normal.
7	Hembras de más de 2 partos que no recibieron tratamiento preventivo durante la gestación y que presentaron aborto.

### **Muestreo**

Se recolectaron muestras de exudado vaginal desde el día que se presentó el parto o aborto y hasta 3 semanas después; con hisopo estéril en 2 mL de medio sacarosa-fosfato-glutamina, denominado SPG (217 mM sacarosa, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1% L-glutamina), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO, USA) y antibióticos (200 mg/mL estreptomina, 50 mg/mL gentamicina, 75 mg/mL vancomicina y 25 unidades/mL nistatina (Invitrogen™)) (Sachse et al., 2009). Estas muestras se mantuvieron en congelación hasta su llegada al laboratorio. Al llegar las muestras de hisopos vaginales se descongelaron a temperatura ambiente para después agitar los tubos con el hisopo en vórtex 30 s y hacer 2 alícuotas de 0.5 mL en tubos de 1.5 mL; todos los tubos se guardaron en ultracongelación a -80°C hasta su uso.

En cuanto a órganos se colectaron: placentas, fetos y en algunos casos órganos de neonatos que fueron sacrificados como parte del otro proyecto. Estos también se congelaron hasta su llegada al laboratorio, una vez ahí se descongelaron a

temperatura ambiente; de las placentas se seleccionaron entre 3-4 cotiledones de diferentes zonas.

En el caso del feto y los neonatos se realizó la necropsia y se colectó el líquido abomasal y el hígado, de este último se seleccionaron fragmentos de diferentes zonas aproximadamente de 2x2 cm, solo en un caso se logró recolectar líquido amniótico (Cuadro 2). Todos los tejidos obtenidos se maceraron y mezclaron con 5-8 mL de medio SPG; al final se depositaron en tubos cónicos, se realizaron alícuotas y se almacenaron en ultracongelación hasta su uso. Todas las muestras colectadas se trabajaron en el laboratorio de enfermedades de los pequeños rumiantes en el CENID-Salud Animal e Inocuidad del INIFAP Palo Alto. CDMX.

**Cuadro 2.** Muestras recolectadas por grupo experimental (órganos e hisopos vaginales).

<b>Grupos experimentales</b>	<b>Hisopos vaginales</b>	<b>Cotiledones</b>	<b>Hígado fetal</b>	<b>Líquido abomasal fetal</b>	<b>Líquido amniótico</b>	<b>Total de órganos y fluidos/grupo</b>
<b>1.-Primiparas CON tratamiento CON aborto</b>	10					*-
<b>2.-Primiparas CON tratamiento SIN aborto</b>	20	3				3
<b>3.-Múltiparas CON tratamiento CON aborto</b>	23		2	2	1	5
<b>4.-Múltiparas CON tratamiento SIN aborto</b>	27	4	**1			5



<b>5.-Primalas SIN tratamiento CON aborto</b>	24	2	22	5		<b>29</b>
<b>6.-Primalas SIN tratamiento SIN aborto</b>	29	2	***12	***2		<b>16</b>
<b>7.-Multíparas SIN tratamiento CON aborto</b>	29	2	3	2		<b>7</b>
<b>Total</b>	<b>162</b>	<b>13</b>	<b>40</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>65</b>

\*Sin muestras

\*\*Obtenidas de una cría que nació muerta

\*\*\*Obtenidas de neonatos

### **Aislamiento e identificación de *Chlamydia* spp., en cultivo celular**

Previo a la infección se propagaron monoestratos de la línea celular L929 de fibroblastos de ratón en botellas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup>, cultivándolas con Medio Mínimo Esencial (MEM) (Invitrogen, USA), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB)(GIBCO, USA), aminoácidos no esenciales 1% (Invitrogen, USA) y L-Glutamina 1% (Invitrogen, USA) e incubándolas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (Escalante-Ochoa, 1997).

Se utilizaron portaobjetos tipo “Chamber slide” con una cámara extraíble de poliestireno dividida en 8 pozos adherida a un portaobjetos (Nunc® Lab-tek®) a los cuales se les adicionó una concentración celular de 1.5x10<sup>5</sup> células/mL mezcladas con medio MEM complementado (MEM-C) se dejaron incubar 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia de 80-90%.

Para el proceso de infección de las células se comprobó la confluencia de 80-90% y se retiró el MEM-C de cada uno de los pozos. Previo a la infección se preparó el inóculo de cada muestra a una dilución 1:5 con medio SPG; se agregaron 100 µL de ellos en cada pozo de la cámara, posteriormente se colocaron en un agitador orbital (Max Q4450, Thermo Scientific) 37°C 15 min para después centrifugar a 353 x g 15 min. Al finalizar se incubaron 1 h a 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de MEM-C, con gentamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (GIBCO, USA) a cada pozo (8 en total) y se puso en incubación a 37°C con 5%  $\text{CO}_2$  durante 65-72 h. Concluido este tiempo se retiró el medio de cada pozo y se realizaron 2 lavados con 100  $\mu\text{L}$  por pozo de una solución tamponada de fosfatos (PBS), después se procedió a quitar el sistema de cámaras, para dejar el portaobjetos con las 8 divisiones. Para fijar la laminilla se utilizó metanol absoluto frío por 15 min a -20°C.

Transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con PBS 100  $\mu\text{l}$  por pozo y se dejó secar el portaobjetos a temperatura ambiente.

### **Identificación de los cuerpos de inclusión**

Para la determinación de las inclusiones intracitoplasmáticas en los cultivos infectados se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando el kit comercial IMAGEN™ *Chlamydia* test (Oxoid, UK). Esta prueba comercial usa anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína para detectar el lipopolisacárido (LPS) de *Chlamydia* spp.

La técnica se realizó con los portaobjetos previamente fijados, a cada división del portaobjeto se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de Reagent (Anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína) previamente diluidos 1/5 con PBS y se incubaron en cámara húmeda por 15 min a 37°C; posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS y se secaron a temperatura ambiente.

Para el montaje de los portaobjetos se agregó una gota del medio proporcionado en la prueba comercial. El cubreobjetos se fijó con una pequeña cantidad de barniz de uñas alrededor de los bordes y posteriormente, se observaron al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40x.

### **Extracción de ADN de *Chlamydia***

Las muestras de exudado vaginal y de los diferentes tejidos de los abortos fueron descongeladas y después homogeneizadas para la extracción de ADN; para ello se utilizó el kit comercial Qiamp DNA Blood Mini Kit ® (Qiagen, Alemania), siguiendo

las especificaciones del fabricante. Posterior a la extracción se evaluó la calidad y cantidad de ADN utilizando un micro-espectrofotómetro de luz UV (Nanodrop).

### **Identificación de la Familia *Chlamydiaceae***

Se utilizaron los iniciadores y sonda de hidrólisis reportados por Ehricht et al. 2006, que amplifican una región de 111 pb del gen 23S rRNA de la familia Chlamydiaceae.

Ch23S-F (5'-CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT-3')

Ch23S-R (5'-ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC-3')

Sonda de hidrólisis: Ch23S-p (FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-TAMRA)

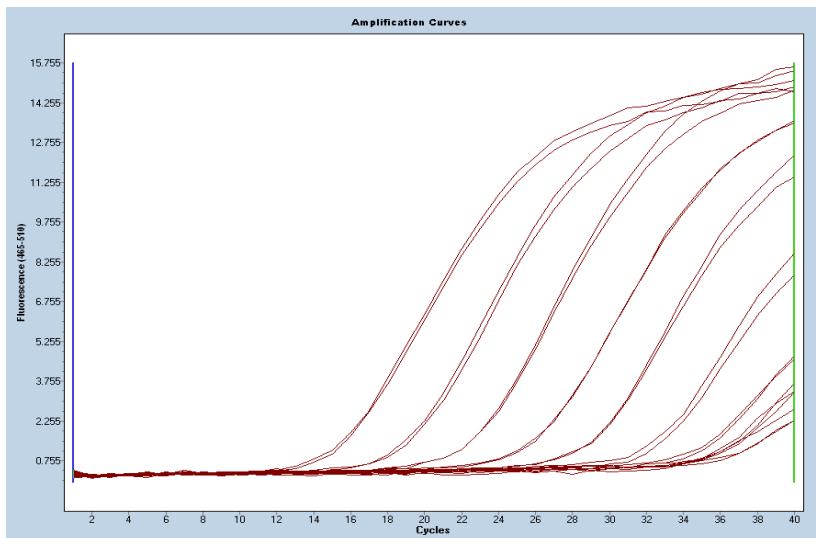
La estandarización de la prueba, se determinó mediante una curva estándar, utilizando ADN previamente purificado del fragmento del gen 23S rRNA de 111 pb, de la cepa AB7 de *Chlamydia abortus*, con una concentración de 0.06 ng, a partir de ésta se realizaron diluciones decuples seriadas  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$  hasta establecer un límite de detección con el ciclo umbral (Ct) que se determinó en ciclo 36 (Figura 3).

A todos los ADNs extraídos de las muestras recolectadas tanto de hisopos como de órganos se les realizó este PCR.

Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ L con los siguientes reactivos: 2x QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix, que contiene: QuantiNova DNA Polymerase compuesta de: Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard, QuantiNova Probe, RT-PCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Qiagen®); con las siguientes concentraciones de los reactivos: 0.4  $\mu$ M de cada primer, 0.2  $\mu$ M de la sonda y 2  $\mu$ l de ADN de las muestras,

Las reacciones se realizaron en un termociclador Light Cycler480® (Roche); usando las siguientes condiciones: un primer ciclo de desnaturalización inicial: 95°C 3 min,

después 40 ciclos compuestos de una desnaturalización 95°C 5 s, con alineamiento y extensión de 65°C 2 s. Por último, un paso de enfriamiento a 40°C 40 s.



**Figura 3.** Curva Estándar para la PCR tiempo real de familia *Chlamydiaceae*

### Identificación de *Chlamydia abortus* mediante PCR tiempo real

Se utilizaron los iniciadores y sonda de hidrólisis reportados por Pantchev et al., 2009 que amplifican una región de 82 pb del gen *ompA* de *Chlamydia abortus*.

CpaOMP1-F GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA

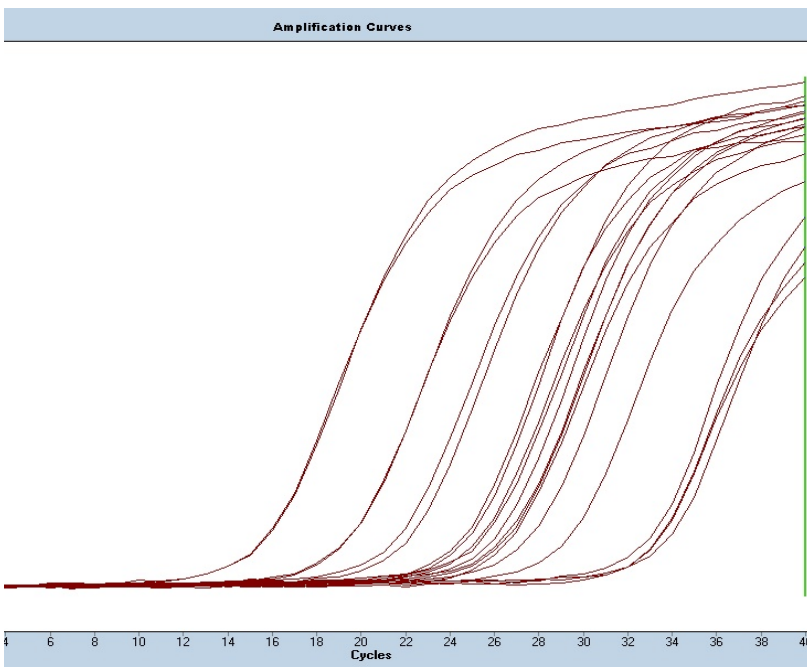
CpaOMP1-R ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA

Sonda: CpaOMP1-S FAM-TAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTAGCG-TAMRA

La estandarización de la prueba se determinó mediante una curva estándar, utilizando el gen *ompA* de *Chlamydia abortus* que se encuentra clonado en el plásmido pGEM-T-Easy (Santiago, 2019). Con este ADN se realizaron diluciones,  $10^{-1}$  -  $10^{-10}$  con una concentración inicial de ADN de 8 ng hasta establecer un límite de detección con el ciclo umbral (Ct) que se determinó en 35 (Figura 4).

Las muestras que resultaron positivas a la PCR de familia *Chlamydiaceae* se les realizó este PCR.

Para cada reacción se utilizó 2x QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix®, que contiene: Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard, QuantiNova Probe, RT-PCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Qiagen). El volumen final de la reacción fue de 20  $\mu$ l incluyendo 2  $\mu$ l de ADN, la concentración final de los primers fue de 0.4  $\mu$ M y de la sonda TaqMan de hidrólisis 0.2  $\mu$ M. Las amplificaciones se realizaron con el termociclador Light Cycler480® (Roche) usando los siguientes parámetros: al inicio un primer ciclo de desnaturalización inicial 95°C por 2 min, después 40 ciclos que incluyen; desnaturalización 95° por 3 s y alineamiento con extensión 60°C por 5 s. Al último un ciclo de enfriamiento 40°C durante 40 s.



**Figura 4.** Curva Estándar para qPCR de *Chlamydia abortus*.

### **Identificación de genes de resistencia a tetraciclina**

#### Propagación de la cepa de *Chlamydia suis*

Se utilizó como control positivo una muestra de exudado vaginal de una cerda de un rebaño en Tenancingo, Estado de México, con problemas de abortos; de la cual

previamente se identificó la presencia de los genes de resistencia *tet* en la Unidad de zoonosis bacterianas del laboratorio de salud animal ANSES (French Agency for Food, Environmental Jans Occupational Health and Safety, Francia). Posteriormente se propagó la bacteria en cultivo celular con células McCoy obteniendo los aislamientos positivos de los cuales se hizo la extracción de ADN con el kit comercial Qiamp DNA Blood Mini Kit ® (Qiagen, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

### PCR punto final para *tet(C)* y *tetR(C)*

Para la estandarización de la técnica se utilizaron los iniciadores reportados por Dugan et al. 2004 (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Iniciadores utilizados en el PCR para identificar los genes de resistencia a tetraciclina y el tamaño de fragmento esperado.

Primers	Secuencia	Tamaño (pb)
<i>tet(C)</i> CS43-F	AGCACTGTCCGACCGCTTTG	525
<i>tet(C)</i> CS47-R	TCCTCGCCGAAAATGACCC	
Codifica: Bomba de eflujo		
<i>tetR(C)</i> CS33-F	CAAGACCGCCGATGATGAGAG	400
<i>tetR(C)</i> CS38-R	CCAAGGGATGACGACGACTG	
Codifica: Represor		

Para cada reacción se utilizó: Iniciadores directo y reverso: 0.4µm, 0.5 µL PolTaq (Thermo Scientific), 2.5 µL de 10X Taq Buffer con KCL, 2.5µm de MgCl<sub>2</sub>, 0.2µm de dNTPs (2mM de cada nucleótido), 5 µL de ADN para amplificar el gen *tetC* y 7 µL para amplificar el gen *tetR* del ADN extraído de *C. suis* y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 25 µL.

El programa que se utilizó fue el siguiente: un primer ciclo de desnaturalización inicial 95°C 3 min, seguido de 33 ciclos que inician con la desnaturalización a 95°C durante 30 s, seguida de un alineamiento a 58°C para *tet(C)* y a 61°C para *tetR(C)* 30 s; al final una extensión 72°C 45 s. El último ciclo es de extensión final 72°C 5 min. Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa al 1.5% (Thermo Scientific), teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL).

### **Secuenciación**

La muestra de *Chlamydia suis* positiva a la PCR punto final fue purificada utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, para posteriormente enviarlos a la unidad de síntesis y secuenciación de DNA en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para la reacción de secuenciación se utilizaron 100 ng del ADN purificado, mezclado con 10 pm de cada iniciador para secuencias en ambos sentidos en un volumen final de 16 µL. La reacción de secuenciación fue realizada en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia de nucleótidos fue determinada en ambas direcciones mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fourescence-Based Sequencing.

Una vez obtenida la secuencia completa se visualizó en el programa de bioinformática Unipro UGENE (<http://www.ugene.net>) para posteriormente ser sometida a la base de datos del GenBank para buscar homologas mediante el programa BLAST.

## RESULTADOS

Se muestrearon un total de 22 rebaños de diferentes municipios del estado de Guanajuato (Cuadro 3), las muestras se reorganizaron dependiendo de sus características, en alguno de los siete grupos previamente descritos.

**Cuadro 4.** Número de rebaños y muestras de exudado vaginal para el diagnóstico de *Chlamydia abortus*.

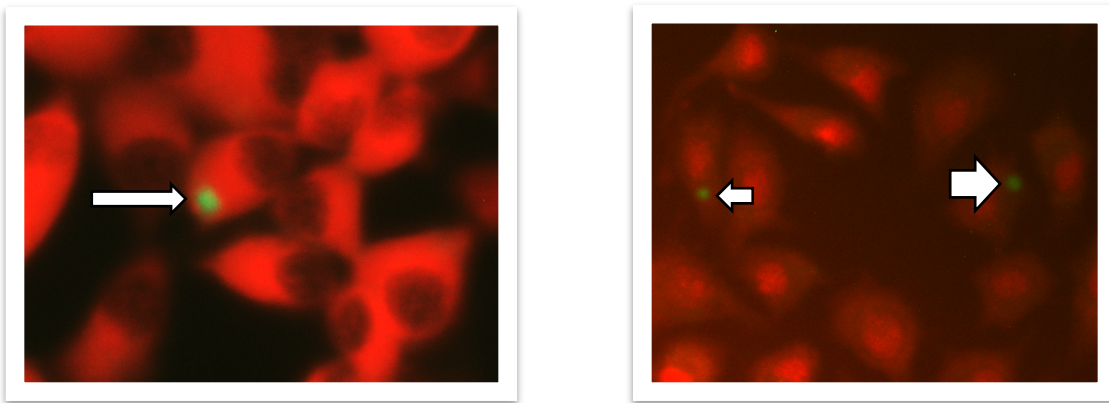
# Rebaño	Municipio	Cantidad de muestras	# Rebaño	Municipio	Cantidad de muestras
1	Acambaro	30	12	Juventino Rosas	21
2	Apaseo El grande	11	13	Juventino Rosas	15
3	Apaseo El grande	9	14	Juventino Rosas	3
4	Apaseo El grande	4	15	Juventino Rosas	2
5	Apaseo El grande	1	16	Juventino Rosas	1
6	Apaseo El grande	1	17	Juventino Rosas	1
7	Cortazar	1	18	Juventino Rosas	1
8	Jaral del Progreso	10	19	Salamanca	39
9	Jaral del Progreso	4	20	Villagrán	2
10	Jaral del Progreso	3	21	Villagrán	1
11	Jaral del Progreso	1	22	Villagrán	1
Total de muestras de exudado recolectadas: 162					



### Inmunofluorescencia directa

Se trabajaron 162 muestras de exudado vaginal que se recolectaron de los 7 grupos experimentales. En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la técnica de inmunofluorescencia directa; Se encontraron 78 muestras positivas. Para esta técnica no se trabajaron las muestras de órganos debido a la contaminación en cultivo celular infectado con otras bacterias presentes en el tejido.

En la figura 5 se muestran aislamientos positivos a *Chlamydia* spp., mediante inmunofluorescencia, a partir de muestras de exudado vaginal de cabras.



**Figura 5.** Aislamiento positivo de *Chlamydia* spp: Derecha: Muestra de una hembra primípara que recibió tratamiento preventivo con tetraciclinas y que abortó; Izquierda: Hembra múltipara que recibió tratamiento y que abortó. En rojo se observan las células L929; las flechas indican la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. Ambas imágenes se visualizan en un microscopio de fluorescencia a 100x.

**Cuadro 5.** Resultados de la técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de *Chlamydia* spp.

Grupo	Descripción del grupo	Fluorescencias		
		Muestras (n)	Positivos	Negativos
1	Primaras CON tratamiento CON aborto	10	5	5
2	Primaras CON tratamiento SIN aborto	20	13	7
3	Múltiparas CON tratamiento CON aborto	23	14	9
4	Múltiparas CON tratamiento SIN aborto	27	14	13
5	Primaras SIN tratamiento CON aborto	24	4	20
6	Primaras SIN tratamiento SIN aborto	29	10	19
7	Múltiparas SIN tratamiento CON aborto	29	18	11
Totales		162	78	84

#### **PCR Tiempo Real para Familia *Chlamydiaceae* y *C. abortus* en muestras de exudados vaginales**

De las 162 muestras de ADN extraídos de exudado vaginal se obtuvieron 150 positivos para la familia *Chlamydiaceae* y 12 negativos (Cuadro 6). Todos los grupos tuvieron muestras positivas. En los grupos 1 y 2 de hembras primaras que recibieron tratamiento con tetraciclinas con 10 y 20 muestras respectivamente, el 100% de éstas fueron positivas, sin importar que haya o no presentado aborto; los grupos 3 y 4 de múltiparas solo tuvieron una muestra negativa en cada uno. Donde se presentaron mayor número de muestras negativas fue en el grupo 5 con las primaras que no recibieron tratamiento y que presentaron aborto.

Las muestras que resultaron positivas a la familia *Chlamydiaceae*, se les realizó PCR tiempo real para la identificación de *C. abortus*, de las 150 muestras, se

obtuvieron 119 positivas y 31 negativas (Cuadro 6). Los grupos 1, 5 y 7 fueron los que tuvieron mayor cantidad de muestras positivas a la especie *C. abortus*.

**Cuadro 6.** PCR tiempo real para la identificación de la familia *Chlamydiaceae* y *C. abortus* a partir del ADN obtenido de exudados vaginales.

Grupo	Descripción	qPCR Familia <i>Chlamydiaceae</i> *P/N	qPCR <i>C.abortus</i> P/N
1	Primiparas CON tratamiento CON aborto	10/0	8/2
2	Primiparas CON tratamiento SIN aborto	20/0	15/5
3	Múltiparas CON tratamiento CON aborto	22/1	16/6
4	Múltiparas CON tratamiento SIN aborto	26/1	18/8
5	Primiparas SIN tratamiento CON aborto	18/6	16/2
6	Primiparas SIN tratamiento SIN aborto	26/3	20/6
7	Múltiparas SIN tratamiento CON aborto	28/1	26/2
Total		150/12	119/31

\*P positivo; N negativo

### PCR Tiempo Real para identificar a la Familia *Chlamydiaceae* a partir de muestras de órganos y fluidos

En total se analizaron 65 muestras de ADN de los diferentes órganos, de las cuales 52 resultaron positivas y 13 negativas para la familia *Chlamydiaceae*. En el grupo 1 no fue posible obtener muestras de órganos debido a que no se lograron recolectar en el momento adecuado, así que este grupo no se incluyó en el cuadro 7. Las 13 muestras de cotiledones fueron positivas; De las 40 muestras de hígado fetal solo 28 fueron positivas; en el caso de líquido abomasal 10 muestras resultaron positivas, la muestra de líquido amniótico fue positiva. Las muestras de los grupos 2, 3, 4 y 7 fueron positivos a la familia *Chlamydiaceae* (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** PCR tiempo real para la identificación de la familia *Chlamydiaceae* a partir de muestras de órganos de los diferentes grupos experimentales.

Grupos experimentales	Cotiledón *P/N	Hígado fetal P/N	Líquido abomasal fetal P/N	Líquido amnió- tico P/N	Positivos/grupo
2.- Primíparas CON tratamiento SIN aborto	3/0				3
3- Multíparas CON tratamiento CON aborto		2/0	2/0	1/0	5
4- Multíparas CON tratamiento SIN aborto	4/0	**1/0			5
5.- Primíparas SIN tratamiento CON aborto	2/0	15/7	5/0		22
6.- Primíparas SIN tratamiento SIN aborto	2/0	***7/5	***1/1		10
7.- Multíparas SIN tratamiento CON aborto	2/0	3/0	2/0		7
Total de órganos/ grupo					
Positivos	13	28	10	1	52
Negativos	0	12	1	0	13

\*P= positivo; N= negativo

\*\*Obtenidas de una cría que nació muerta

\*\*\*Obtenidas de neonatos

### PCR en tiempo real para el diagnóstico de *Chlamydia abortus* a partir de muestras de órganos y fluidos

De las 52 muestras positivas a la familia *Chlamydiaceae*, se encontraron en total 33 positivos a *C. abortus*; que corresponden a 10 muestras de cotiledones, 16 de hígado y 7 de líquido abomasal (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** PCR tiempo real para el diagnóstico de *C. abortus* a partir de ADN de hígado, cotiledones, líquido abomasal y líquido amniótico.

Grupos experimentales	Cotiledón *P/N	Hígado P/N	Líquido abomasal P/N	Líquido. amniótico P/N	Positivos/grupo
2.- Primíparas CON tratamiento SIN aborto	3/0				3
3- Multíparas CON tratamiento CON aborto		0/2	1/1	0/1	1
4- Multíparas CON tratamiento SIN aborto	2/2	1/0			3
5.- Primíparas SIN tratamiento CON aborto	2/0	8/7	3/2		13
6.- Primíparas SIN tratamiento SIN aborto	2/0	4/3	1/0		7
7.- Multíparas SIN tratamiento CON aborto	1/1	3/0	2/0		6
Total positivos	10	16	7	0	33

\*P positivo; N negativo

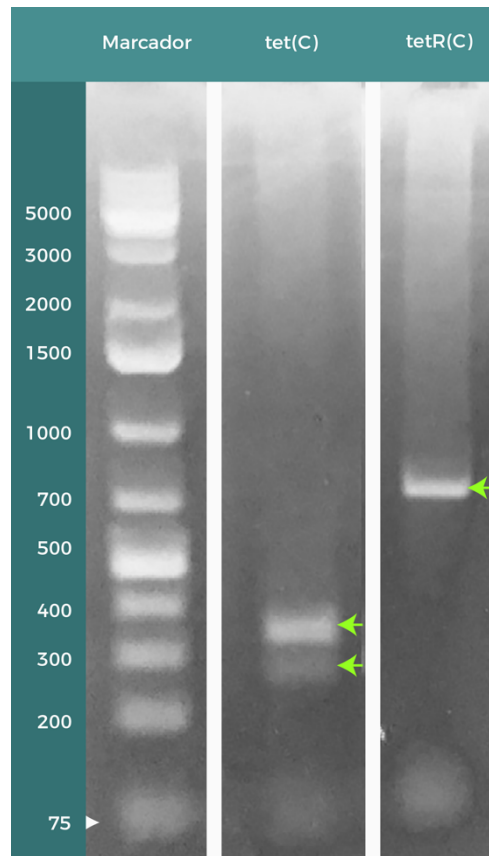
\*\*Obtenidas de una cría que nació muerta

\*\*\*Obtenidas de neonatos

### PCR punto final para identificar resistencia a tetraciclinas

Durante la estandarización de la PCR se amplificaron: para el gen *tet(C)* dos bandas, una de 300 pb y otra de 350 pb, para el gen *tetR(C)* una banda de 700 pb, observándose una diferencia en el peso molecular entre los amplicones y los productos reportados por Dugan et al. 2004 (Figura 6).

Estos resultados fueron una limitante del trabajo para lograr el objetivo propuesto.



**Figura 6.** Amplificación de los genes de resistencia a tetraciclina *tetC* y *tetRC* de *Chlamydia suis*. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb (Thermo Scientific); carril 2: fragmentos amplificados con los iniciadores para el gen *tet(C)* se visualizaron 2 bandas una de 350 pb y otra de 300pb (flechas verdes); carril 3: fragmento amplificado con los iniciadores para el gen *tetR(C)* se visualizó una banda de 700pb (flecha verde).

### Secuenciación

Los productos de PCR amplificados fueron purificados utilizando el sistema comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, y enviados a secuenciar. Para el caso del fragmento de *tet(C)* solo se purificó la banda de 350 pb.

Las secuencias fueron sometidas a la base de datos del GenBank utilizando el programa Blast-n para determinar homologías, no se encontró ninguna similitud entre los fragmentos secuenciados y secuencias de genes de resistencia para

tetraciclinas reportadas en la base de datos. Solo se encontraron coincidencias con secuencias reportadas para el genoma del ratón (Figura 7).

**Mus musculus chromosome 15, clone RP24-351J19, complete sequence**

Sequence ID: [AC116808.10](#) Length: 164398 Number of Matches: 1

Range 1: 140369 to 140645 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
512 bits(277)	3e-141	277/277(100%)	0/277(0%)	Plus/Plus
Query 12	CGCAGCTGCTCCAGCACGCTTCGGACGTTGGTGTGCTTGGTAGTTTAAGGTCTGGTTCC			71
Sbjct 140369	CGCAGCTGCTCCAGCACGCTTCGGACGTTGGTGTGCTTGGTAGTTTAAGGTCTGGTTCC			140428
Query 72	TTTGTGTCCCCGCTACTTAGCCGATCCAGACTTAGATACTTCATTCAAAGTTGTGAAGT			131
Sbjct 140429	TTTGTGTCCCCGCTACTTAGCCGATCCAGACTTAGATACTTCATTCAAAGTTGTGAAGT			140488
Query 132	AATAGCAGTCTGCACCTGATCTTAGTTTAGTGCCTTGAATGGTATTTTTTATTTCTGGAT			191
Sbjct 140489	AATAGCAGTCTGCACCTGATCTTAGTTTAGTGCCTTGAATGGTATTTTTTATTTCTGGAT			140548
Query 192	CCAGTAAACATATAATCAATTTCCGCCATTTCCATGCATTCAGCACCATTCTAGTTCCTG			251
Sbjct 140549	CCAGTAAACATATAATCAATTTCCGCCATTTCCATGCATTCAGCACCATTCTAGTTCCTG			140608
Query 252	GCTTAGTACTAACTGCTTTGACATTCATGGGTCATT		288	
Sbjct 140609	GCTTAGTACTAACTGCTTTGACATTCATGGGTCATT		140645	

**Figura 7** Resultado de la búsqueda en el programa BLAST-n donde solo se encontraron coincidencias con el genoma de ratón (*Mus Musculus*). Query es la secuencia que obtuvimos que tuvo una identidad del 100% con este fragmento del genoma del mamífero.

Con los resultados del análisis de secuencias para *C. suis* corroboramos que los fragmentos que se amplificaron con los indicadores fueron inespecíficos ya que, no correspondieron a los fragmentos reportados para genes de resistencia a tetraciclina.

Se realizaron diversas modificaciones al protocolo de la PCR punto final con el objetivo de continuar con la estandarización de la técnica. Sin embargo, no se lograron obtener los resultados reportados de los productos amplificados, por lo que no se pudo determinar la presencia de los genes que codifican para la bomba de eflujo *tet(C)* y el gen represor regulador *tetR(C)* en las muestras de exudado vaginal y de tejido que resultaron positivas en la PCR tiempo real para *C. abortus* aisladas de cabras con problemas de aborto que recibieron tratamiento con tetraciclinas.

## DISCUSION

Con los resultados positivos a la familia *Chlamydiaceae* y a la especie *C. abortus* se confirma que esta bacteria se encuentra en el estado de Guanajuato ampliamente distribuida en los 7 municipios que se muestrearon. Desde 1997 se buscó detectar la bacteria en pequeños rumiantes para conocer su participación en las diferentes enfermedades que afectan a estos animales sobre todo aquellas que estuvieran relacionadas con el aborto (Escalante-Ochoa et al. 1997). Como se menciona en el Diario Oficial de la Federación, hasta 2016 la enfermedad cambió de ser exótica a endémica en nuestro país, por lo que el diagnóstico de la enfermedad se facilitó. Aun no se cuenta con una técnica de diagnóstico nacional, pero existen diferentes protocolos de técnicas de diagnóstico que se han implementado en otros países, que se desarrollaron y adaptaron para realizarlo en el país. De igual manera se han hecho escaneos de anticuerpos contra *Chlamydia* spp en ovejas y cabras usando técnicas de serología para conocer el grado de seropositividad que tienen los rebaños (López, 2011; Mora et al, 2015).

Con el conocimiento de la enfermedad los productores han podido establecer algunas medidas de control basadas en recomendaciones de artículos de países donde consideran a la enfermedad de gran impacto en su producción estableciendo factores de riesgo involucrados para que se presente la enfermedad dentro del rebaño como: el contacto entre animales sanos con enfermos, el sistema de producción y la introducción de animales nuevos al rebaño (Longbottom et al. 2013). En los rebaños muestreados en este trabajo existe el contacto estrecho entre animales, el sistema de producción que se maneja es de tipo intensivo y los productores introducen animales de otras explotaciones para reemplazo o como préstamo por lo que la presentación de la infección aumenta si tomamos en cuenta estos factores de riesgo.

El diagnóstico de *Chlamydia* spp. con la técnica de inmunofluorescencia directa se realizó únicamente con muestras de exudado vaginal debido a que, con las muestras de placenta y del feto abortado obtenidas no fue posible hacer el aislamiento por problemas de contaminación, limitando su uso en el cultivo celular.



Por lo que el exudado vaginal parece ser la opción más viable para el diagnóstico de esta enfermedad debido a su fácil recolección y mejor preservación (Essig y Longbottom, 2015; Rodolakis y Laroucau, 2015; Sachse et al. 2009).

En este estudio se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real para la identificación de ADN clamidial en las muestras recolectadas tomando en cuenta ventajas que la técnica ofrece como evitar el manejo posterior al PCR de la muestra ya que no es necesario visualizar la cantidad de ADN amplificado usando geles de agarosa y el procesamiento de un mayor número de muestras en menor tiempo (OIE, 2018; Rodolakis y Laroucau, 2015; Sachse et al., 2009). El presente estudio es el primer reporte de identificación de *Chlamydia abortus* en México, que usó esta técnica y que pudiera servir como un método de diagnóstico rápido en los rebaños que tengan problemas de aborto, además del rendimiento que puede tener esta técnica con solo tener muestras de hisopos vaginales.

De las muestras que fueron positivas a la familia *Chlamydiaceae* pero negativas a la especie *C. abortus* que corresponden al 20.6% (31/150) se puede inferir que pertenecen a otras especies que también afectan a las cabras como es el caso de *C. pecorum* que ha sido reportada por diferentes autores siendo parte de infecciones oculares como conjuntivitis en pequeños rumiantes, poliartritis y encefalomieltis en cabritos y corderos; además, se han identificado como agentes comensales en el tracto gastrointestinal de éstos animales (Borel et al., 2018; Rodolakis y Laroucau, 2015, Walker et al., 2015). También se ha reportado la presencia de *C. psittaci* en pequeños rumiantes en estudios de prevalencia identificándose en animales asintomáticos; tomando en cuenta como antecedente la estrecha relación que hay entre esta especie y *C. abortus* (Lenzko et al., 2011; Osman et al. 2011).

En este estudio también se logró la identificación de la bacteria en placenta, hígado y líquido abomasal de fetos abortados mediante la técnica de PCR en tiempo real; en un estudio previo Campos-Hernández et al. en 2014, identificaron *C. abortus* en una muestra de bazo de un feto abortado mediante PCR punto final. Anteriormente en un estudio hecho por Livingstone et al. en 2009 se tomaron muestras de 10 placentas de borregas previamente infectadas con *C. abortus*; donde el 100%

abortaron y tuvieron un promedio de  $2.7 \times 10^7$  genomas de *Chlamydia* por microgramo de tejido corroborando que la infección de este órgano predispone al aborto. Por lo que con el diagnóstico de la infección de estos tejidos podemos corroborar el alcance de la infección que tuvo la hembra y evidenciar que tanto la placenta como el feto son fuentes de contaminación que predisponen a la infección de *Chlamydia abortus*.

Cabe mencionar que nuestro estudio es el primero en realizar un muestreo en cabras a las que se les administró tratamiento con tetraciclinas para la prevención del aborto formando diferentes grupos para observar si había alguna diferencia entre los animales tratados, lo que nos podría sugerir que el tratamiento en estas cabras ya no evita el aborto cuestionando el uso rutinario del tratamiento (Bommana y Polkinghorne, 2019; Essig y Longbottom, 2015).

Con la finalidad de establecer una posible asociación entre el uso del tratamiento y la presentación de la infección se realizó un análisis estadístico usando la prueba de chi-cuadrada que se evaluó en un cuadro de distribución de frecuencias entre diferentes variables (SAS, 2014). Se encontró que con una significancia de 0.05, con un valor de  $p=0.8307$  no hay diferencia estadística entre el uso del antibiótico que tuvo una probabilidad aparente de 71.25% contra un 75.61% para los animales que no recibieron tratamiento ya que se aceptó diferencia estadística con valores de  $P < 0.15$ ; por lo que independientemente del tratamiento están excretando la bacteria en el momento del parto o aborto y se convierten en una gran fuente de infección para las demás hembras que pueden no estar infectadas contribuyendo a la diseminación y el establecimiento de la enfermedad en estos rebaños (Bommana y Polkinghorne, 2019; Essig y Longbottom, 2015; Rodolakis y Laroucau, 2015).

Las variables que si tuvieron asociación con la presencia de la infección son: el sistema de producción, el tamaño del rebaño, la edad de la cabra y el número de partos, algunas de ellas son consideradas factores de riesgo de acuerdo a un estudio de 2013 en UK. (Longbottom et al., 2013)

Lenzko et al. 2011, en Alemania realizó un estudio sobre prevalencia en 32 rebaños los cuales tenían bajas tasas de abortos; realizando la identificación mediante PCR en tiempo real se encontraron 28/53 muestras positivas a *C. abortus* que corresponden al 52.8%, el resto de los positivos correspondieron a *C. pecorum* y *C. psittaci*, estos resultados de alta prevalencia evidencian la distribución que puede tener la bacteria en un área determinada sin llegar a provocar problemas serios de abortos. Como en el caso de este estudio donde tuvimos alto número de muestras positivas tanto en PCR como en inmunofluorescencia en los grupos donde no hubo presencia de aborto pero que la excreción de la bacteria está presente y favorece la diseminación de la enfermedad dentro del rebaño.

Una variable importante es la forma en que se administra el tratamiento ya que en todos los rebaños la dosis que se maneja es, 20 mg/kg la cual coincide con las recomendaciones en experimentos hechos hace más de 30 años (Aitken et al., 1982; Greig et al. 1982; Rodolakis 1980) y sustentan el uso de esta dosis para evitar los abortos y la pérdida de crías. La variación que tienen estos experimentos radica en el momento de la aplicación del tratamiento, ya que se menciona que el momento óptimo de la administración de las tetraciclinas tiene que ser al inicio del último tercio de gestación, pero este periodo puede ampliarse entre los 90 días hasta los 120 días, con las posteriores aplicaciones que se lleguen a manejar, ya que una sola dosis no es capaz de prevenir los abortos y se recomiendan mínimo 2 con intervalo de 2 semanas (Bommana y Polkinghorne, 2019; Essig y Longbottom, 2015; Rodolakis y Laroucau, 2015). Los estudios previos se realizaron en ambientes controlados sobre todo al momento de la infección con la bacteria y en nuestro caso el muestreo se realizó en rebaños que tenían antecedentes de aborto, por lo tanto, no supimos el momento en el que se infectaron las hembras gestantes. De acuerdo a otros estudios sobre la patogenia de la enfermedad, *Chlamydia abortus* para el día 90 puede ser evidenciada en los placentomas y para el día 120 de gestación se pueden observar cambios patológicos en la placenta independientemente del momento de infección (Maley et al. 2009). Así que, en este estudio también identificamos que, sin importar la división de los diferentes grupos experimentales tanto de primíparas como de múltiparas, la presencia o ausencia de aborto y el

tratamiento con tetraciclinas no descartaron la excreción de la bacteria en todos estos grupos; por lo que el tratamiento solo reduce la cantidad de pérdidas, pero no erradica la infección ni revierte ningún daño patológico que ya haya ocurrido, por esta razón algunas cabras de este estudio abortaron así como también eliminaron la bacteria al momento del parto (Essig y Longbottom, 2015).

Hasta la fecha, aún no se han aislado cepas resistentes a la tetraciclina en *C. abortus*, sin embargo, el tratamiento sigue administrándose de forma rutinaria durante la gestación de los pequeños rumiantes; y como en este estudio se demostró que la eliminación de la bacteria y los abortos a pesar del tratamiento no se evitan y que podría desarrollarse la resistencia por la presión selectiva de la bacteria hacia el antibiótico como ocurrió con *Chlamydia suis* (Borel et al., 2012).

Se ha informado la detección simultánea de *C. suis* y *C. abortus* en diferentes muestras analizadas en la producción porcina, destacando aún más el riesgo potencial de propagación de la resistencia TET a otras especies de *Chlamydia* si se mantiene una presión selectiva. A pesar de ser un importante patógeno veterinario de importancia zoonótica, parece haber una falta de estudios *in vitro* e *in vivo* que investiguen el papel de los antibióticos en el tratamiento de las infecciones por *C. abortus* en humanos y animales (Bommana y Polkinghorne, 2019).

Aunque en el presente trabajo no se logró identificar la presencia de genes de resistencia a la tetraciclina, es importante seguir trabajando en la estandarización de esta técnica de PCR para establecer si existe o no la presencia de estos genes en las muestras de los diferentes grupos experimentales que se establecieron en este trabajo, ya que, como se observó en los resultados el tratamiento no elimina la excreción de la bacteria y la presión selectiva del antibiótico contra la bacteria puede favorecer la presencia de resistencia; además de la presencia de infecciones cruzadas con otras especies de *Chlamydia* donde podría darse la transferencia horizontal de genes de resistencia.

## CONCLUSIONES

Este estudio demostró la presencia de *C. abortus* en cabras que provenían de rebaños con problemas de abortos y que en algunos dan tratamiento con tetraciclinas para prevenirlo en el estado de Guanajuato.

De acuerdo con el análisis estadístico no hay asociación entre la infección con *Chlamydia abortus* y la aplicación del tratamiento con el antibiótico por lo que hubo hembras que fueron tratadas y que salieron positivas a la infección.

Con las muestras de los órganos y exudado vaginal fue posible corroborar, que el tratamiento no evita la infección con la bacteria pudiendo o no generar el aborto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelfattah S. (2016). *Chlamydomphila abortus* infection in small ruminants: A review. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, Vol. 11: 587-593.
2. Aitken, I. D., Robinson, G. W., and Anderson, I. E. (1982). Long-acting oxytetracycline in the treatment of enzootic abortion in ewes. Veterinary Record. Vol. 111, pag. 445–446.
3. Anonymous, *Chlamydia abortus* the most common finding in ovine abortions in early 2019 Veterinary Record 185, 44-47, 2019.
4. Aréchiga, C.F.; Aguilera, J.I.; Rincón, R.M.; Méndez de Lara, S.; Bañuelos, V.R.; Meza-Herrera, C.A. (2008). Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización, Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol. 9, pag. 1-14.
5. Barbosa Mireles M., Salazar García F., Fernández Rosas P., Montes de Oca R. (2013). Detección de anticuerpos serológicos contra *Chlamydomphila abortus* en dos grupos de personas expuestas a riesgo en explotaciones ovinas en Xalatlaco, México. Tropical and Subtropical Agroecosystems, Vol. 16, pag. 483-486.
6. Bambeke F., Pages M. y Lee V. (2006) Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux, Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. Vol: 157.
7. Bastidas R. J., Valdivia R. H. (2016) Emancipating *Chlamydia*: Advances in the Genetic Manipulation of a Recalcitrant Intracellular Pathogen, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 80 No. 2.
8. Betts-Hampikian H. y Fields K. (2010). The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut, Frontiers in Microbiology, Vol. 1.
9. Bommana S, Polkinghorne. A Mini Review: Antimicrobial Control of Chlamydial Infections in Animals: Current Practices and Issues. Frontiers in Microbiology. Vol.10, Artículo:113, 2019.
10. Borel N., Regenscheit N., Di Francesco A., Donati M., Markov J., Masserey Y. y Pospischil A. Selection for tetracycline-resistant *Chlamydia suis* in treated pigs. Veterinary Microbiology. Vol. 156, pag. 143-146.

11. Borel N., Leonard C., Slade J., Schoborg V. R. (2016). Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine, *Current Clinical Microbiology Reports*, vol. 3, pag: 10–18.
12. Borel N., Polkinghorne A., Pospischil A. (2018). A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? *Veterinary Pathology*, Vol. XX, pag.: 1-17.
13. Campos-Hernandez E., Vazquez-Chagoyan C., Salem AZ, Saltijeral-Oaxaca J. A., Escalante-Ochoa C., Lopez-Heydeck S. M., De Oca-Jimenez RM. 2014. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. Vol. 46, pag. 919-924.
14. Chalmers W. S., Simpson J., Lee S. J., Baxendale W. (1997) Use a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Veterinary Record*, Vol. 141 (3).
15. Chen H, Wen Y. y Li Z. (2019). Clear Victory for *Chlamydia*: The Subversion of Host Innate Immunity. *Front. Microbiol.* Vol. 10, Artículo: 1412.
16. Chifiriuc M. Holban A. Iordache C., Ditu, L., Mihaescu G., Oprea S., Grumezescu A. y Lazar V. (2016). Antibiotic Drug Delivery Systems for the Intracellular Targeting of Bacterial Pathogens. *Smart Drug Delivery System* Vol. 10.
17. Cossé M.M., Hayward R.D., Subtil A. (2016) One Face of *Chlamydia trachomatis*: The Infectious Elementary Body. In: Häcker G. (eds) *Biology of Chlamydia. Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer Cham Vol, 412.
18. Degraeves F.J., Gao D. y Kalteboeck B. (2003). High-sensitivity quantitative PCR platform. *Biotechniques*, Vol. 34, 106–115.
19. DOF, Diario oficial de la federación publicación en mayo 2016. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018).
20. Dugan Jae, Rockey Daniel D., Jones Loren y Andersen Arthur A. Tetracycline Resistance in *Chlamydia suis* Mediated by Genomic Islands Inserted into the

- Chlamydial inv-Like Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, pag. 3989–3995, 2004.
21. Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. (2006) Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 20, pag. 60–63.
  22. Elwell C., Mirrashidi K. y Engel J. (2016) *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 14, pag.: 385–400.
  23. Entrican G., Wattedgedera S., Wheelhouse N., Allan A., Rocchi M. (2010) Immunological Paradigms and the Pathogenesis of Ovine Chlamydial Abortion, *American Journal of Reproductive Immunology* vol. 64 pag. 287–294.
  24. Escalante- Ochoa C., Lazcano C., Soberón A. (2001) *Chlamydophila* spp. como agente zoonótico en México XXXVIII Reunión nacional de investigación pecuaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
  25. Escalante-Ochoa C., Diaz-Aparicio E., Segundo-Zaragoza C., Suarez-Guemes F. (1997) Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: first report. *Revista Latinoamericana de Microbiología* Vol.39, pag.,117-121.
  26. Essig A. y Longbottom D. (2015) *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women, *Current Clinical Microbiology Report*, Vol. 2, pag. 22–34.
  27. Everett, K. D. E., Bush, R. M. y Andersen, A. A. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol*, Vol. 49, 41 5440.
  28. Greig, A., Linklater, K. A. y Dyson, D. A. (1982). Long-acting oxytetracycline in the treatment of enzootic abortion in ewes. *Veterinary Record*. Vol. 111, pag. 445–446.
  29. Gutierrez J., Williams E.J., O'Donovan J., Brady C., Proctor A.F., Marques PX., Worrall S., Nally J.E., Mcelroy M., Bassett H.F., Sammin D.J., Markey B.K.



- (2011). Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydophila abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Veterinary Microbiology* 147:119-26.
30. Hybiske K., Stephens R.S. (2007). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 104, pag.:11430–11435.
31. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. (2013). Guía práctica para la Evaluación de la Canal Caprina, Libro Técnico No. 4 Ajuchitlán, Colón, Querétaro.
32. Jara María Antonieta (2007), Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana, *Avances en Ciencias Veterinarias* 22, pag. 49-55
33. Jutinico S., Mantilla A., Sanchez A. Mora R. (2015). Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. *Nova*, Vol 13.
34. Lenart J, Andersen A. A., Rockey D.D. (2001) Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; Vol. 45, pag. 2198–2203.
35. Lenzko H., Moog U., Henning K., Lederbach R., Diller R., Menge C., Sachse K., Sprague L.D. (2011) High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Veterinary Research*.; 7:29.
36. Livingstone M, Wheelhouse N, Maley SW, Longbottom D (2009). Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Veterinary Microbiology* 135:134–141.
37. Livingstone M., Wheelhouse N., Ensor H., Rocchi M., Maley S., Aitchison K., (2017). Pathogenic outcome following experimental infection of sheep with *Chlamydia abortus* variant strains LLG and POS, *PLoS ONE* Vol. 12.
38. Longbottom, D., Entrican, G., Wheelhouse, N., Brough, H.A., & Milne, C.A. (2013). Evaluation of the impact and control of enzootic abortion of ewes. *Veterinary journal*, 195 2, 257-9.

39. Longbottom, D., Sait, M., Livingstone, M., Laroucau, K., Sachse, K., Harris, S. R. (2018). Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine* Vol. 36, pag. 3593– 3598.
40. López Villegas E. O. (2009). Estudio de las características del ciclo de desarrollo de *Chlamydia trachomatis* relacionadas a la presencia del plásmido 7.5kb. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, México.
41. Maley S. W., Livingstone M., Rodger S. M., Longbottom D. y Buxton D. (2009) Identification of *Chlamydophila abortus* and the development of lesions in placental tissues of experimentally infected sheep. *Veterinary Microbiology*. Vol. 135, tag. 122-127
42. Mehlitz A. y Rudel T. (2013). Modulation of host signaling and celular responses by *Chlamydia*. *Cell Communication and Signaling*, vol. 11.
43. Mohamad K.Y. y Rodolakis A. (2010). Recent advances in the understanding of *Chlamydophila pecorum* infections, sixteen years after it was named as the fourth species of the Chlamydiaceae family. *Veterinary Research*. Vol. 41.
44. Mora Díaz J. C., Díaz A. E., Herrera L.E., Suárez G.F., Escalante-Ochoa C., Jaimes V.S., Arellano-Reynoso B. (2015) Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Veterinaria México*. Vol. 2 (1).
45. Omsland A., Susanne B., Horn M. y Hackstadt T. (2014). Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 38, pag. 779–801.
46. Organización mundial de sanidad animal OIE (2018). Manual terrestre de la OIE. Capítulo 3.7.5. Aborto enzoótico de las ovejas (Clamidiosis ovina) (Infección por *Chlamydia abortus*).
47. Ortega, N., Caro, M.R., Gallego, M.C., Murcia-Belmonte, A., Álvarez, D., Del Río, L., Cuello, F., Buendía, A.J., Salinas, J. (2016) Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Irish Veterinary Journal* Vol. 69.

48. Osman, K.M., Ali, H.A., El Jakee, J.A., Galal, H.M., (2011). *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt. *Revue Scientifique et Technique* Vol. 30, pag. 939–948.
49. Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila abortus* from tissue samples. *The Veterinary Journal* Vol.181, pag. 145–150.
50. Panzetta M.E., Valdivia R.H. y Saka H.A. (2018) Chlamydia Persistence: A Survival Strategy to Evade Antimicrobial Effects in-vitro and in-vivo, *Frontiers in Microbiology* Vol. 9.
51. Roberts M. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 245, 2. pag.: 195–203.
52. Roberts M.C., Schwarz S. (2009) Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In: Mayers D.L. (eds) *Antimicrobial Drug Resistance. Infectious Disease*. Humana Press.
53. Rodolakis A., Souriau A., Raynaud J. P. y Brunault G. (1980) Efficacy of a long-acting oxytetracycline against chlamydial ovine abortion. *Annals of veterinary Research*. Vol. 11(4), pag. 437-44.
54. Rodolakis A. y Laroucau K. (2015) Chlamydiaceae and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology*, Volume 181 pag.107–118.
55. Sánchez Rocha L., Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
56. Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischila A. y Longbottom D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (Review). *Veterinary Microbiology*. 135, 2–21.
57. Sachse K., Bavoil P.M., Kaltenboeck B., Stephens R.S., Kuo C.C., Rosselló-Móra R. y Horn M. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 38, pag. 99–103.

58. Sandoz KM, Rockey DD. (2010) Antibiotic resistance in *Chlamydiae*, Future Microbiology, vol. 5, pag.1427–1442.
59. Schautteet K., Beeckman D., Delava P. y Vanrompay D. (2010). Possible pathogenic interplay between *Chlamydia suis*, *Chlamydophila abortus* and PCV-2 on a pig production farm. The Veterinary record. 166. 329-33.
60. SAS Institute Inc. 2014. SAS/STAT® 13.2 User's Guide: High-Performance Procedures. Cary, NC: SAS Institute Inc.
61. SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, órgano de la SAGARPA, Población ganadera <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/165999/caprino.pdf>. (2017). Resumen nacional de la Producción Ganadera, [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecResumen.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp), páginas consultadas en diciembre.
62. Suchland, R. J., Sandoz, K. M., Jeffrey, B. M., Stamm, W. E., and Rockey, D. D. (2009). Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. in Vitro. Antimicrobial Agents Chemotherapy. Vol. 53, pag 4604–4611.
63. Staub E., Marti H., Biondi R., Levi A., Donati M., Leonard C., Ley S. D., Pillo-nel T., Greub G., Seth-Smith H. M. B., Borel N., (2018) Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin, Scientific Reports, Vol. 8.
64. Taylor-Brown A, Spang L., Borel N. y Polkinghorne A. (2017). Culture-independent metagenomics supports discovery of uncultivable bacteria within the genus *Chlamydia*, Scientific Reports, Vol. 7.
65. Valdivia H. R., (2008). Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology. Current Opinion in Microbiology, vol. 11.
66. Villegas E., Sorlózano A., Camacho A. y Gutiérrez J. (2008). *Chlamydophila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Vol.26, pag.: 627-35.
67. Von Wintersdorff C.J.H., Penders J. , van Niekerk J.M. , Mills N.D. , Majumder S., van Alphen L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolffs P.F.G. (2016) Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer Frontiers in Microbiology., Vol. 7, pag. 173.

68. Vorimore F., Hsia R., Huot-Creasy H., Bastian S., Deruyter L., Passet A., Sachse K., Bavoil P., Myers G., Laroucau K. (2013) Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*, PLOS ONE, Volumen 8.
69. Walder G., Meusbürger H., Hotzel H., Oehme A., Neunteufel W., Dierich M.P. Wurzner R. (2003) *Chlamydophila abortus* pelvic inflammatory disease. Emerging Infectious Disease., Vol. 9, pag.1642–1644.
70. Walker E, Lee EJ, Timms P, Polkinghorne, A. (2015). *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: a common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. The Veterinary Journal. Vol. 206 (3) pag. 252–260.