



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

Detección de *Chlamydia abortus* en calostro y leche de oveja, y en aparato reproductor de carneros, en un rebaño con problemas reproductivos

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ SERRANO

Director de Tesis:
Dr. Efrén Díaz Aparicio
CENID-SAI, INIFAP

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN-UNAM
Dr. Hugo Ramírez Álvarez
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN-UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre 2021



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.

CONTENIDO

Agradecimientos.....	I
Dedicatorias.....	II
Resumen.....	VII
Summary	VIII
Introducción.....	1
Justificación.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivo	18
Material y métodos.....	19
Material biológico.....	19
Infección de la monocapa celular	25
Bacteriología de semen	26
Inmunofluorescencia directa	27
Extracción de ADN	28
PCR múltiple para otros patógenos involucrados en la epididimitis del carnero	29
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para <i>C. abortus</i>	30
Histopatología	31
Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E)	31
Inmunohistoquímica.....	32
Serología (ELISA)	33
Inmunodifusión en gel de agarosa	34
Resultados	35
Cultivo de muestras y prueba de inmunofluorescencia directa (periodo de septiembre a diciembre de 2016)	35

Muestras colectadas de hembras en el periodo de 2017	36
Semen	40
Estudio bacteriológico para otras especies bacterianas implicadas en falla reproductiva en carneros.....	40
Extracción de ADN	40
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple	41
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para <i>Chlamydia abortus</i>	41
Órganos de aparato reproductor de sementales	44
Estudio patológico (cotiledones)	45
Descripción de lesiones macroscópicas en diferentes tejidos de aparato reproductor de machos	46
Descripción de lesiones microscópicas en diferentes tejidos de aparato reproductor de machos	47
Serología (primer muestreo -septiembre a diciembre de 2016-)	49
Muestras colectadas en el periodo marzo-abril de 2017	49
Sementales	50
Discusión.....	51
Conclusiones.....	56
Literatura citada.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1A y 1B	Cotiledón de oveja con inmunomarcaje positivo a la presencia de antígeno clamidial por la prueba de IHQ	45
Figura 2A y 2B	Prepucios de carneros que resultaron positivos a la presencia de antígeno y ADN clamidial por las pruebas de IFD y qPCR en semen respectivamente	47
Figura 2C	Presencia de líquido en cavidad torácica de uno de los sementales	47
Figura 2D	Coágulo localizado en parénquima testicular del mismo animal	47
Figura 2E	Corte transversal de testículo de uno de los sementales positivos a IFD y qPCR en muestra de semen, mostrando parte del coágulo en el parénquima testicular	47
Figura 2F	Se muestran nodulaciones blanquecinas en parénquima testicular del semental positivo a IFD y qPCR en muestra de semen	47
Figura 3A y 3B	Presencia de quistes intraepiteliales	49
Figura 3C	Se observa la presencia de material sugestivo a calcio en la luz de túbulos seminíferos	49
Figura 3D	Túbulo seminífero atrésico con ligero infiltrado linfocítico	49
Figura 3E y 3F	Vesículas seminales teñidas con tinción de Stamp (E) y con inmunomarcaje positivo por IHQ (F).....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Género <i>Chlamydia</i>	2
Cuadro 2.	Nuevas especies del género <i>Chlamydia</i> y especies que infectan.	3
Cuadro 3.	Relación de muestras colectadas al momento del sacrificio de cada uno de los sementales positivos a IFD y qPCR en semen para <i>C. abortus</i>	22
Cuadro 4.	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para el aislamiento de los principales agentes involucrados en la epididimitis infecciosa ovina	27
Cuadro 5.	Resultados obtenidos de las 534 muestras de suero sanguíneo por serología en el primer muestreo	36
Cuadro 6.	Resultados obtenidos de las muestras que se procesaron para aislamiento en cultivo celular y por la prueba de IFD en el primer muestreo	36
Cuadro 7.	Resultados del aislamiento en cultivo celular de <i>Chlamydia</i> spp del total de las muestras colectadas de ovinos durante el año 2017 en el CEIEPO-UNAM	37
Cuadro 8.	Muestras (n=66 calostros e hisopos vaginales y n=65 leches) positivas (25.3 %) al aislamiento en cultivo celular e IFD.....	38
Cuadro 9.	Se muestran los resultados positivos y negativos del aislamiento en cultivo celular de <i>Chlamydia</i> spp. de las muestras colectadas de ovinos durante el periodo de pariciones en el CEIEPO-UNAM	39
Cuadro10	Resultados al aislamiento bacteriológico y a la prueba de PCR múltiple a colonias sugestivas de <i>B. ovis</i> , <i>H. somni</i> y <i>A. seminis</i>	41

Cuadro 11	Resultados obtenidos de 31 calostros positivos para IFD, evaluados con la prueba de qPCR	42
Cuadro 12	Resultados obtenidos de 31 calostros positivos para IFD, evaluados con la prueba de qPCR.....	42
Cuadro 13	Resultados a qPCR de 31 hisopos vaginales positivos a IFD.....	43
Cuadro 14	Resultados serológicos de madres, corderos y sementales del CEIEPO-UNAM, por la técnica de ELISA-I.....	50

Agradecimientos

- La tesis fue realizada con el financiamiento del 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.
- Al CENID-SAI, INIFAP y Doctores que en él laboran, por la facilidad de instalaciones, equipo y tiempo para la realización de las diferentes técnicas realizadas en el presente trabajo.
- A la FES-C, UNAM y Doctores que nos apoyaron en la realización de este trabajo.
- Agradecemos a los directivos y veterinarios responsables del CEIEPO de la FMVZ de la UNAM, por facilitar el uso y manejo de los animales de estudio.
- Estamos agradecidos con la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, España, por el apoyo brindado en la capacitación para la realización de las técnicas de cultivo y qPCR para Diagnóstico de *C. abortus*.
- Al CONACyT por la beca otorgada durante los cuatro años de estudios.

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

A "Pátaro": por tu apoyo y comprensión, por tu tiempo y dedicación, por formar parte de la continuidad en este camino que, pareciera ahora sí, la recta final. Y principalmente, gracias por tu AMISTAD. ¡Este trabajo, es de los dos 😊!

GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA HOY Y SIEMPRE

A mis amigos y amigas que en el trayecto de todos estos años han contribuido con una sonrisa, una palmada en la espalda y palabras de aliento que si bien, en su momento fueron las más oportunas para salir de las adversidades y juntos alcanzar grandes logros como éste. Marlene, Gladys, Miryí, Angel †, Juanito, Humberto, Jehielí, Adrianita, Ángeles, Marisol y Ana Morales, Evelinda, Edencita, Selenita y Gabý Navarro, Sarita, Ricky, Dra. Rosita, Señó Silvia, Cristi, Teresita, Ernesto Pedro, Perlita, Pato, Nan, Alex, Carito y Betty, Familias Serna Chávez y Gaona Cerna, y a todos aquellos que me han brindado ese tesoro tan maravilloso que es su AMISTAD.

A la FES-C, porque fue en ella donde me formé como MVZ y a la FMVZ, por darme la oportunidad de continuar en este crecimiento hasta hoy y que pareciera, ya es la recta final... ahora sí ☺

A los doctores que han contribuido en mi formación académica; particularmente a los Drs. Gerardo García Tovar, Pablo Martínez Labat, Alfredo Cuéllar, Oscar Molina, Francisco Morales, Juan Carlos del Río, Jaime Orozco †, García Alcaráz, Guillermo Oviedo †, Citlali Hernández, Beatriz Arellano, Jorge Tórtora y Hugo Ramírez.

A mi comité tutor integrado por los doctores Jorge Tórtora, Hugo Ramírez, Efrén Díaz y Francisco Morales; así como también a mi jurado evaluador, los doctores Andrés Ducoing, Víctor Díaz, Efrén Díaz, Francisco Morales y Hugo Ramírez, por su tiempo y dedicación para leer y hacer las correcciones y los comentarios oportunos para la mejora de este trabajo.

A los Drs. y amigos que me apoyaron en mi proceso de formación, en la teoría y en la práctica: Dra. Rosaura Romero, al Dr. Óscar Pérez y a mis primos los Drs. Estela y Marco que son un gran ejemplo a seguir como personas y como profesionistas.

Al CENID-SAI, INIFAP, por abrirme las puertas al conocimiento y a la ciencia, a los Drs. que han estado también a mi lado brindándome su apoyo y su amistad, su tiempo, su dinamismo y comprensión, GRACIAS Drs. Beatriz Arellano, Efrén Díaz, Gabý Palomares, Rómulo, Marco Santillán, Víctor Tenorio, Francisco Aguilar, Dionicio Córdoba, Enrique Herrera y José Luis Hernández, a Isabel.

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

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

Y porque la vida sigue y aún hay mucho por recorrer en ella, GRACIAS también a las personas que han estado y quienes han llegado durante este proyecto y en la recta final del mismo, Dr. Ricardo Flores, Memo Chan, Elisa y Paulo, por su compañerismo, apoyo y por tenderme la mano cuando inicié una nueva etapa en mi vida, lejos de más de 15 años de lo que amé tanto en mi vida profesional. A mis compañeros de trabajo Flor, Dave, Rey, Chema y Kari, por su apoyo durante esta "recta final" del camino, porque siempre se aprende algo nuevo.

A mis enanos Nabiky †, Mougly †, Katty †, Negra †, Tamarindo †, Clavesina † y Clavesín †, Daisy, Apocalipto †, Nacha †, Isis †, Osiris †, Copo de Nieve †, Rayita †, Daysí Lucas †, Chuchó y a todos aquellos animalitos que contribuyeron con un poco de sí para mi formación profesional y en la realización de este trabajo.

GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA HOY Y SIEMPRE

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

GRACIAS DIOS POR TODO

*Si jamais j'oublie, les nuits que j'ai passées
Les guitares et les cris
Rappelle-moi qui je suis, pourquoi, je suis en vie
Si jamais j'oublie les jambes à mon cou,
Si un jour je fuís,
Rappelle- moi qui je suis, ce que je m'étais promis.*

(Si jamais j'oublie, ZAZ)

Resumen

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) es causado por *Chlamydia abortus* y puede resultar en aborto durante las últimas 2-3 semanas de gestación. No existen reportes de aislamientos o identificación de *C. abortus* en calostro o leche de ovejas infectadas, por lo que resulta importante determinar si la bacteria se excreta en estas secreciones, que son el único alimento de los corderos. La excreción de *C. abortus*, también ha sido descrita en semen de carneros, sin embargo, no se conoce la localización de la bacteria en órganos y en el tracto reproductor de los sementales. Con el objetivo de aislar e identificar *C. abortus* en calostro y leche de ovejas, así como determinar el sitio en aparato reproductor del carnero en el que se aloja la bacteria, se colectaron 66 muestras de calostro, 65 de leche y 66 de hisopos vaginales durante un periodo de partos y en una segunda época de parición, se colectaron nuevamente 14 muestras de calostro e hisopos vaginales al momento del parto, 14 leches a los 15 días posparto y 14 leches de las mismas hembras a los 30 días posparto. Además, se colectó semen en tres ocasiones y diferentes tejidos de aparato reproductor de cuatro sementales positivos a qPCR para *C. abortus*. Durante el primer muestreo en las hembras, se obtuvieron 19 de 66 muestras de calostro positivas al aislamiento (28,7%), 14 de 65 muestras de leche (21,5%) y 17 de 66 hisopos vaginales (25,7%). Las 50 muestras positivas junto con 42 negativas se sometieron a qPCR para amplificar un fragmento del gen *ompA* de *C. abortus*; 38 de las 92 muestras procesadas por esta técnica fueron positivas para *C. abortus*. Respecto al segundo muestreo, se obtuvieron seis calostros positivos de 14 muestras, cuatro de 14 leches colectadas a los 15 días posparto resultaron positivas, una leche de 14 muestras colectadas a los 30 días posparto y nueve hisopos vaginales de los 14 colectados al momento del parto. En relación a la prueba de qPCR, se obtuvieron cuatro calostros positivos (4/14) (28.57 %), de las leches colectadas a los 15 días, se obtuvieron tres positivas de 14 (3/14) (21.4 %), 2 leches colectadas a los 30 días positivas (2/14) (14.28 %) y siete hisopos vaginales (7/14) (50 %) positivos a la presencia de ADN de *C. abortus*. En el primer muestreo de semen, se obtuvieron tres positivos de 15 muestras a la prueba qPCR. En el segundo muestreo se colectaron 19 muestras de las cuales se obtuvieron cinco positivos a la presencia de ADN de *C. abortus*. De los diferentes órganos de aparato reproductor de macho, se detectó ADN clamidial en linfonodo retrofaringeo para un semental; conducto deferente, prepucio, linfonodos mesentérico y poplíteo en otro; y vesículas seminales, hígado y testículo en otro carnero. Además, se detectó antígeno clamidial por la prueba de IHQ en vesículas seminales de uno de los cuatro sementales. Con estos resultados se concluye que *C. abortus* se elimina

en calostro y leche de ovejas infectadas y está presente en diferentes órganos de aparato reproductor de sementales, en especial vesículas seminales, ambas situaciones pueden contribuir en la transmisión y permanencia de la infección en los rebaños afectados.

Summary

Ovine enzootic abortion (OEA) is caused by *Chlamydia abortus* and can result in abortion during the last 2-3 weeks of gestation. There are no reports of isolations or identification of *C. abortus* in colostrum or milk of infected sheep, so it is important to determine if the bacteria are excreted in these secretions, which are the only food of the lambs. The excretion of *C. abortus* has also been described in semen of rams, however, the location of the bacterium in organs and in the reproductive tract of stallions is not known. In order to isolate and identify *C. abortus* in colostrum and sheep milk, as well as to determine the site in the reproductive system of the sheep where the bacterium is housed, 66 colostrum, 65 milk and 66 vaginal swabs were collected. During a calving period and in a second calving season, 14 colostrum samples and vaginal swabs were collected again at the moment of calving, 14 milks at 15 days postpartum and 14 milk from the same females at 30 days postpartum. In addition, semen was collected on three occasions and different reproductive tissues from four sires with positive *C. abortus* qPCR. During the first sampling in the females, 19 of 66 colostrum samples (28.7%), 14 of 65 milk samples (21.5%) and 17 of 66 vaginal swabs (25.7%) were obtained. The 50 samples positive for isolation together with 42 negative samples were subjected to qPCR to amplify a fragment of the *ompA* gene from *C. abortus*; 38 of the 92 samples processed by this technique were positive for *C. abortus*. Regarding the second sampling, six positive colostrums were obtained from 14 samples, four out of 14 milks collected at 15 days postpartum were positive, one milk from 14 samples collected at 30 days postpartum and nine vaginal swabs of the 14 collected at the time of delivery. In relation to the qPCR test, four positive colostrums (4/14) (28.57%) were obtained, of the milks collected at 15 days, three positive colostrums of 14 (3/14) (21.4%) were obtained, 2 milks collected at 30 days positive (2/14) (14.28%) and seven vaginal swabs (7/14) (50%) positive for the presence of *C. abortus* DNA. In the first semen sampling, three positives out of 15 samples were obtained in the qPCR test. In the second sampling, 19 samples were collected, of which five were positive for the presence of *C. abortus* DNA. From the different organs of the male reproductive system, chlamydial DNA was detected in retropharyngeal lymph node for one stallion, vas deferens, foreskin, mesenteric and popliteal lymph nodes in another, and seminal vesicles, liver and testis in another ram. In addition, chlamydial antigen was detected by the IHC test in seminal vesicles from one of the four stallions. With these results it is concluded that *C. abortus* is eliminated in colostrum and milk of infected sheep and is present in different organs of the reproductive system of stallions, in special seminal vesicles,

both situations can contribute to the transmission and permanence of the disease in herds affected.

Introducción

Generalidades del Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) provoca importantes pérdidas económicas en muchas áreas del mundo dedicadas a la cría ovina y caprina, particularmente cuando los rebaños se juntan durante el periodo de partos. Es una enfermedad infecciosa causada por bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae*, que producen aborto en el último tercio de la gestación y que afecta principalmente a ovinos, caprinos, bovinos y humanos (Longbottom, *et al.* 2003; OIE, 2004).

Aunque la mayoría de los reportes sobre el AEPR están basados en ovejas, la enfermedad tiene un gran impacto económico y de salud pública en un gran número de explotaciones caprinas en el mundo (Rodolakis, *et al.* 2001).

La clamidiasis o AEPR fue reportada por primera vez en Escocia en 1936 por Greig, denominándola Aborto Enzoótico Ovino (AEO), quien sugirió que los abortos eran resultado de factores medioambientales, como deficiencias nutricionales de los animales, las que impedían llevar a término la gestación; sin embargo, en 1950, Stamp *et al.* demostraron que esta enfermedad era causada por un agente infeccioso perteneciente al grupo de “psitacosis – linfogranuloma venéreo” (psitacosis-LGV) (Longbottom, *et al.* 2003; Ortega, 2005).

Debido a su morfología e incapacidad de multiplicarse en medios inertes, durante este periodo fue discutida la naturaleza de las clamidias, que hasta entonces habían sido consideradas como virus. Fue en 1966 cuando Page, determinó su naturaleza bacteriana y dos años más tarde Weiss las define como bacterias intracelulares obligadas (Longbottom *et al.*, 2003; Ortega, 2005).

C. abortus se clasifica como un miembro de la familia *Chlamydiaceae*, que actualmente comprende el género único *Chlamydia*, el cual contiene 11 especies (*C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. suis* y *C. trachomatis*) y una nueva especie candidata llamada *C. ibidis* (Vorimore *et al.* 2013) (cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Género <i>Chlamydia</i>		
Especie	Hospedero	Enfermedad/Sígnos
<i>C. trachomatis</i>	Humanos	Conjuntivitis crónica (tracoma), enfermedades de transmisión sexual, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad.
<i>C. muridarum</i>	Ratón, hámster	Infección en tracto respiratorio y genital.
<i>C. suis</i>	Cerdos	Enfermedad intestinal, respiratoria y reproductiva.
<i>C. pneumoniae</i>	Humanos	Neumonía, bronquitis, faringitis, se le relaciona con aterosclerosis, artritis reactiva y asma.
<i>C. psittaci</i>	Aves silvestres y de corral	Enfermedad respiratoria (zoonosis).
<i>C. abortus</i>	Rumiantes y cerdos	Aborto (zoonosis).
<i>C. pecorum</i>	Rumiantes y cerdos	Enfermedad entérica, neumonía, conjuntivitis, poliartritis, metritis y encefalomiелitis.
<i>C. felis</i>	Gatos	Conjuntivitis (probable zoonosis).
<i>C. caviae</i>	Cerdo de guinea	Infección ocular y en tracto genital.
<i>C. ibidis</i>	Ibis sagrado (<i>Threskiornis aethiopicus</i>).	
<i>C. gallinacea</i>	Aves de corral	
<i>C. avium</i>	Palomas y psitácidos	

Adaptado de Kerr *et al.*, 2005; Vorimore F., 2013; Siarkou VI., 2015

Cuadro 2. Nuevas especies del género <i>Chlamydia</i> y especies animales que infectan.				
Orden	Familia	Género	Especie	Especie afectada
<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>ibidis</i>	Ibis sagrado (<i>Threskiornis aethiopicus</i>).
			<i>gallinacea</i>	Cepas de aves de corral
			<i>avium</i>	Palomas y psitácidos

(Vorimore, 2013; Siarkou, 2015).

Los métodos basados en la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales, los patrones de restricción del gen *ompA* y el análisis filogenético de los genes de ARNr dieron como resultado, poca o ninguna evidencia de diversidad con respecto al hospedero, enfermedad asociada u origen geográfico de las cepas (Siarkou, 2015).

Los miembros del género *Chlamydia* afectan a diferentes especies, desde aves de corral hasta grandes mamíferos, incluyendo al hombre produciendo diversas enfermedades con manifestaciones clínicas variables según la especie y el hospedero afectados. Pueden dañar tejidos oculares, genitales y respiratorios, produciendo así abortos, neumonías, gastroenteritis, encefalomiелitis, queratoconjuntivitis, artritis, orquitis, vesiculitis seminal y epididimitis; sin embargo, no todos los animales portadores de organismos desarrollan enfermedades clínicas (Karin y Everett, 2000; Longbottom *et al.*, 2003; Rodolakis *et al.*, 2010).

Aun cuando el AEPR no se describe con frecuencia en humanos, existe un riesgo considerable de infección en mujeres gestantes, asociado en la mayoría de los casos a un contacto directo con ovejas o cabras infectadas (García, 2003; Buxton, 1986; Karin *et al.*, 2000). Si el contagio se produce durante el primer tercio de la gestación sobreviene el aborto, mientras que, si tiene lugar al final puede producir septicemia y mortalidad perinatal (Papp *et al.* 1994).

Antecedentes

En 1936 Greig descubre por primera vez el aborto clamidial, denominándolo aborto enzoótico ovino. La enfermedad fue asociada a deficiencias nutricionales en los animales y a factores medioambientales. Sin embargo, Stamp *et al.* en 1950 demostraron que la enfermedad era ocasionada por un agente infeccioso perteneciente al grupo "psitacosis - linfogranuloma venéreo" (Ortega, 2005). En Alemania en 1959, se informó por primera vez sobre abortos por *Chlamydia*; después la enfermedad fue diagnosticada en Bulgaria, España, USA, Francia, India, Japón, Reino Unido, Chad, Grecia y Túnez. Con excepción de Australia y Nueva Zelanda, en muchas partes del mundo el AEPR es la segunda causa de abortos infecciosos después de brucelosis y la principal en países donde la brucelosis está controlada o erradicada (Rodolakis, 2001; García, 2003; Papp, 1994; Rake, 1942; Stamp, 1950).

En México, el primer reporte del AEPR se hizo en 1997 por Escalante *et al.* mediante evidencias serológicas y de aislamiento, que indicaban la presencia de la infección en el territorio nacional.

En 2016, la enfermedad fue reconocida por las autoridades zoonositarias en México, ubicando a la enfermedad dentro del grupo 3, el cual incluye enfermedades endémicas de reporte obligatorio en nuestro país (Acuerdo de enfermedades de notificación obligatoria, 2018).

En 2005, se realizaron estudios de esta enfermedad en rebaños caprinos, demostrando la presencia de la bacteria en el Estado de Michoacán, a partir de una muestra de heces (Lazcano, 2006). En 2008, se hizo un estudio serológico en rebaños caprinos lecheros de seis Estados del país, encontrando anticuerpos

contra el agente (Mora, 2008); en 2010, nuestro grupo de investigación determinó también la presencia de anticuerpos en cabras del Estado de Guanajuato y la identificación del microorganismo se confirmó con la prueba de PCR a partir de hisopos vaginales (Mora, 2010), en 2011, Soriano *et al.* identificaron mediante inmunofluorescencia la presencia de *C. abortus* en un aborto ovino procedente de Almoloya de Juárez, México, mismo que fue confirmado con una PCR.

Etiología

Chlamydia abortus es el agente etiológico del AEPR, es una bacteria pequeña que tiene una pared celular con características similares a la pared de las Gram negativas; sin embargo, carecen de la presencia de una capa rígida de péptidoglicano, probablemente como consecuencia de la adaptación al medio intracelular; aunque se ha descrito la presencia de ácido murámico (Kosma, 1999) (cuadro 3). A causa de su aparente inhabilidad para producir ATP, estos microorganismos dependen del metabolismo de las células hospederas para su multiplicación, privándolas de nutrientes y fuentes de energía, por esta razón, *C. abortus* necesariamente crece en el citoplasma de las células eucariotas en un ciclo de desarrollo único, en donde una forma infecciosa resistente, los cuerpos elementales (CE), se alterna con una forma metabólicamente activa no infecciosa, los cuerpos reticulares (CR) (Kosma, 1999; Moulder, 1991; Quinn, 2002).

Cuerpos elementales

Los CE son la forma infecciosa de *C. abortus*, son electro-densos, miden entre 0.2 – 0.3 μm de diámetro y están rodeados por una doble envoltura trilaminar: membrana interna o citoplasmática y membrana externa, que es propiamente la pared celular bacteriana, que se caracteriza por tener gran cantidad de proteínas ricas en aminoácidos azufrados, tal es el caso de la proteína principal de membrana externa (MOMP) y las proteínas de membrana externa 2 y 3 (Omp2 y Omp3 respectivamente) formadas por una fuerte unión de puentes disulfuro que le dan rigidez y escasa permeabilidad (Karin *et al*, 2000; Kosma, 1999; Brade

et al., 1986; Escalante *et al.* 1998). Los CE son muy resistentes a las condiciones ambientales estando fuera de la célula del hospedero; además, cuando se encuentran en el medio extracelular son metabólicamente inactivos, lo que les facilita se transmitan de célula a célula y de hospedero a hospedero; de tal forma que, al ingresar nuevamente a una célula inician inmediatamente su síntesis de ARN y de proteínas (Kosma, 1999; Escalante *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Caro, 2008).

Cuerpos reticulares

Los CR miden entre 0.5 - 1.3 μm de diámetro, obtienen nutrientes de la célula hospedadora y son la forma metabólicamente activa no infecciosa que se multiplica por fisión binaria dentro de la célula (Ortega, 2005; Karin *et al.*, 2000; Brade *et al.*, 1986; Escalante *et al.*, 1998). En comparación con el CE, su pared es más fina y frágil, tiene una membrana citoplasmática más definida. Su interior es de aspecto granular y con mayor número de ribosomas presentes. Se ha demostrado que los CR pueden sintetizar en forma independiente ciertas proteínas de la célula hospedadora e incluso fuera de la célula, si se les asegura un aporte adecuado de ATP exógeno (Caro *et al.* 2008; Hatch *et al.* 1986).

Entre los CE y CR, aparecen unas estructuras denominadas corpúsculos intermedios (CI) que constituyen tanto morfológica como estructuralmente una etapa de transición en la condensación del CR para originar el CE (Ortega, 2005; García, 2003)

Ciclo de desarrollo

El ciclo evolutivo de las clamidias inicia cuando la forma extracelular del microorganismo, el CE, infecta a una célula susceptible induciendo su propia internación por endocitosis. La familia de las *Chlamydiaceae* presenta un ciclo de desarrollo único, bifásico que dura entre 48 y 72 horas aproximadamente y consta de cinco etapas, dando inicio cuando los CE se adhieren a las células epiteliales (Ortega, 2005; Wheelhouse *et al.* 2012; Marques *et al.* 2010) y continúan con los pasos que enseguida se describen:

- 1) Penetración de la forma infecciosa o cuerpo elemental en la célula hospedera, con la inmediata transformación en la forma metabólicamente activa o cuerpo reticular.
- 2) Multiplicación por fisión binaria del CR para dar lugar a una micro colonia o inclusión citoplasmática.
- 3) Conversión de los CR en CE, seguida de la liberación bacteriana mediante lisis o por exocitosis (Ortega, 2005; Caro et al. 2008).

Además del ciclo de desarrollo típico con sus dos fases, una de cuerpos elementales y otra de cuerpos reticulares, se ha descrito también una tercera forma persistente *in vitro*, donde los cuerpos reticulares tras diversos estímulos son capaces de mantenerse por más tiempo dentro de la célula hospedera; estas estructuras son conocidas como “formas aberrantes o de persistencia” (Ortega, 2005; Caro et al. 2008; Wheelhouse et al. 2012; Marques et al. 2010).

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

En el ciclo evolutivo de las clamidias, las formas infecciosas o CE, son los que tras adherirse a la célula hospedera ingresan en una vacuola cuya pared parece originarse por una invaginación de la célula citoplasmática, esta vesícula formada retrasa su maduración, manteniéndose en etapas tempranas de la vía endocítica, evitando de este modo la fusión con los lisosomas (Moulder, 1991; Quinn *et al.*, 2002), lo que les da la característica propia de los microorganismos intracelulares obligados, es decir, tienen la capacidad de promover su propia ingestión por los fagocitos no profesionales, permitiéndoles mantenerse al interior de las células y evitar así la interacción con las defensas del hospedero (Escalante *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el responsable de la inhibición de esta fusión es un factor termolábil, presente exclusivamente en la superficie de los cuerpos elementales (Martínez, 2006); este proceso resulta diferente cuando se trata de un macrófago infectado, pues las vesículas infectadas forman parte del sistema endosómico. En cuanto a los polimorfonucleares (PMN), sí se ha demostrado la presencia de fagolisosomas; sin embargo, la mayor parte de las bacterias son capaces de evadir la acción de los PMN al introducirse de manera inmediata en otras células, quedando limitada su acción a las primeras fases de

la infección; incluso, se les considera incapaces de resolver la infección por sí solas (Ortega, 2005).

Estructura antigénica

Los agentes pertenecientes al orden de las *Chlamydiales*, comprenden un gran número de microorganismos relacionados tanto estructural como antigénicamente (Henderson *et al.*, 2004).

Los antígenos presentes en las bacterias de la familia *Chlamydiaceae*, son complejos y sólo parcialmente conocidos. Se localizan en la pared celular y se han agrupado de acuerdo con su naturaleza en antígenos glicolípidicos y antígenos proteicos (Ortega, 2005; Henderson *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 2008).

Inmunopatología de la infección por clamidias

Las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* comprenden un grupo diverso de organismos e infectan gran variedad de hospederos, causando un amplio número de enfermedades (Kerr *et al.*, 2005), además de tener el potencial para establecer infecciones persistentes por periodos prolongados, a menudo sin signos evidentes de enfermedad y sin inducir respuesta inmune protectora; sin embargo, las infecciones crónicas pueden estimular el sistema inmune del hospedero (Quin *et al.*, 2002; Rocchi *et al.*, 2009).

Una vez que la bacteria ingresa al organismo, el principal sitio de infección y multiplicación son las tonsilas; también pueden alojarse en epitelio intestinal causando una infección subclínica, y a partir de estos sitios se diseminan por sangre o linfa, ocasionando una primera clamidemia a órganos de colonización secundaria como hígado, bazo y pulmón, en donde permanecen en estado latente (Mora *et al.*, 2008; Kerr *et al.*, 2005; Buxton *et al.*, 1996).

Una vez establecida la infección, *C. abortus* no puede ser detectada, sino hasta el día 90 de la siguiente gestación, que es cuando el microorganismo invade la placenta. Cuando una oveja no está gestante y es infectada, se establece una infección persistente bajo el control de IFN- γ hasta que, en algún momento,

durante la futura gestación la infección se reactiva, es entonces cuando el microorganismo invade la placenta y se multiplica en ella, provocando una placentitis (Del Río *et al.*, 2013); además *C. abortus* se replica en las células trofoblásticas, lo que conduce a su destrucción y al estímulo de una respuesta inflamatoria (Marques *et al.*, 2010). Los cambios fisiológicos que se producen durante la gestación inducen una segunda clamidemia y a partir de los órganos de colonización secundaria, el microorganismo llega a células epiteliales del trofoblasto, extendiéndose la infección a cotiledones y espacios intercotiledonarios entre los días 40 y 50 de gestación, resultando en daño epitelial, edema e inflamación (Caro *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2010; Rocchi *et al.*, 2009; Buxton *et al.*, 1996); esta inflamación es el resultado de la infiltración de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas; sin embargo, no todos los placentomas se infectan y el nivel de inflamación y necrosis en los cotiledones y las membranas es variable (Kerr *et al.*, 2005). Entre los días 60 y 90, el daño causado por *C. abortus* en los placentomas compromete el intercambio materno-fetal de nutrientes y oxígeno, lo que contribuye a la muerte del feto y al aborto en las últimas dos o tres semanas de gestación, o bien, al nacimiento de crías débiles que mueren en los primeros días de vida (Caro *et al.*, 2008; Marques *et al.*, Kerr *et al.*, 2005; Rocchi *et al.*, 2009; Buxton *et al.*, 1996). Las lesiones fetales incluyen necrosis focal en hígado y pequeños focos de necrosis en pulmón, bazo, cerebro y linfonodos (Kerr *et al.*, 1996). La presencia de anticuerpos en sangre de corderos recién nacidos, antes de la ingestión del calostro, es indicativa de infección intrauterina. Marques *et al.*, (2010) demostraron en ovejas que al día 30 posinfección se pueden detectar en líquidos amniótico y alantoideo la presencia de inmunoglobulinas G y M, y que la concentración de estas inmunoglobulinas se incrementa de forma gradual y proporcional al avance de la gestación (Marques *et al.* 2010; Kerr *et al.* 2005).

Mecanismos de persistencia

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

células para el crecimiento de clamidias (Hogan *et al.*, 2004; Schoborg *et al.*, 2011).

Muchos estudios han descrito cuerpos reticulares de mayor tamaño, cuya multiplicación por fisión binaria se desacelera y por consecuencia disminuye su diferenciación a cuerpos elementales, lo que estimula la formación de “cuerpos o formas aberrantes clamidiales”. Estos cambios resultan reversibles tras la eliminación del factor inhibidor del crecimiento. Por lo tanto, la persistencia parece ser un mecanismo que permite a las clamidias “sobrellevar” condiciones hostiles y mantener a largo plazo la infección dentro de una célula hospedera (Hogan, 2011; Schoborg *et al.*, 2011).

Estudios *in vitro* han descrito diferentes mecanismos de inducción de estas formas aberrantes, tales como la presencia de antibióticos en el medio, disminución de nutrientes esenciales como aminoácidos, glucosa y privación de hierro, la multiplicación en presencia de monocitos, infección por clamidiófagos, inducción de choque térmico, el mantenimiento de manera prolongada de un cultivo infectado y producción de citosinas; todos pueden inducir la modificación del metabolismo y limitar la multiplicación de las clamidias (Ortega, 2005; Rocchi *et al.*, 2009; Hogan *et al.*, 2004; Schoborg *et al.*, 2011). Desde 2004, se han descrito nuevos modelos inductores de persistencia clamidial, como la exposición a los componentes del humo de cigarro, la adenosina extracelular y a la coinfección con el virus del herpes simple (HSV) en humanos o con el virus de la diarrea epidémica porcina (Schoborg *et al.*, 2011).

INF- γ , enzima IDO y triptófano

La producción de IFN- γ induce la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), resultando en la degradación de triptófano intracelular, lo que genera la privación de este nutriente esencial para el crecimiento de las clamidias; sin embargo, los efectos anti-*Chlamydia* del IFN- γ se pueden revertir mediante la adición de triptófano exógeno, lo que resulta consistente con los estudios de la secuencia del genoma de *C. abortus*, que han puesto de manifiesto que esta bacteria carece de la capacidad para sintetizar triptófano por

sí misma, haciéndola dependiente de la célula hospedera. Esto plantea una paradoja interesante, la placenta es un sitio favorable para el crecimiento de *C. abortus*, debido a que la expresión de citocinas tales como el IFN- γ es muy restringida en la interfase materno fetal y por otro lado, resulta ser un sitio desfavorable, ya que las células trofoblásticas en humanos y ratones expresan la enzima IDO, lo que perjudica al microorganismo que requiere del triptófano para poder infectar las células (Entrican *et al.*, 2009; Wattedgedera *et al.*, 2009).

En general, la fase latente de la infección por clamidias surge durante la primera infección y la inmunosupresión asociada a la gestación puede ser un factor en la reactivación de la bacteria (Brown *et al.*, 1996). El control inmunológico del microorganismo depende de la habilidad del hospedero para montar una respuesta inmune mediada por células y la protección se encuentra relacionada fuertemente con la producción de IFN- γ , situación demostrada para las infecciones por *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Sin embargo, el control del crecimiento de *C. abortus* por IFN- γ en células ovinas se encuentra relacionado con el catabolismo del triptófano, la adición de este último a los medios de cultivo revierte los efectos del IFN- γ , disminuyendo la síntesis de IDO, mediador de la persistencia en cultivos celulares. Cualquier relación entre el IFN- γ , el catabolismo del triptófano y el control del crecimiento de *Chlamydiaceae* resulta compleja y es dependiente tanto del hospedero como de factores del patógeno, tales como la sensibilidad al IFN- γ , disponibilidad de triptófano intracelular y ausencia de genes que codifican la producción del aminoácido en el genoma clamidial (Entrican *et al.*, 2002).

Excreción y transmisión de la clamidiasis ovina

En rebaños infectados, los animales se contagian mediante la ingestión de cuerpos elementales contenidos en secreciones vaginales y membranas placentarias al momento del parto o del aborto, o bien, a través de aerosoles; es importante señalar que la permanencia del microorganismo en el medio se debe principalmente a la rigidez de la envoltura celular, que a su vez es estable y permeable osmóticamente, lo que facilita que los CE permanezcan viables en el

medio ambiente durante varios días contaminando el alimento, camas y agua de los animales (Caro *et al.*, 2009; Elwell *et al.*, 2016).

Algunos estudios demuestran la susceptibilidad del epitelio vaginal a la infección experimental con *C. abortus*, lo que sugiere que la transmisión venérea es posible. Por último, la infección directa del feto a través de la placenta se considera una vía de transmisión (Quinn *et al.*, 2002; Caro *et al.*, 2009; Kerr *et al.*, 2005).

Se ha reportado que tanto ovejas como cabras pueden excretar *C. abortus* hasta dos semanas después de un aborto y que los CE pueden seguir siendo infecciosos durante varias semanas a partir de este momento, situación que aumenta la propagación del microorganismo (Caro *et al.*, 2009).

En general, se sabe que *C. abortus* puede ser excretada en diversas secreciones de las ovejas en al menos dos estados fisiológicos de las mismas, estro, parto o aborto; sin embargo, no se tienen reportes de la eliminación de la bacteria a través del calostro o de la leche de ovejas, situación que de ser posible, favorecería la permanencia de la bacteria en los rebaños afectados (García, 2003; Rodolakis *et al.*, 1998; Nietfeld, 2002).

Poco se sabe del papel de las infecciones clamidiales en machos (Eckert *et al.*, 2019), sin embargo, el patógeno ha sido detectado en infecciones en carneros y toros, teniendo como resultado esterilidad e infertilidad en los sementales afectados. Además, *Chlamydia* spp. se ha aislado de testículos, epidídimo y semen de carneros infectados y de toros con vesiculitis seminal; la bacteria, también ha sido reconocida como un agente causal de epididimitis en carneros. Se ha recuperado de órganos genitales en sementales experimentalmente infectados y en semen de toros clínicamente sanos (Teankum *et al.*, 2007; Amin, 2002).

La infección venérea es una ruta de transmisión clásica para la *C. trachomatis* en humanos, sin embargo, hay evidencia limitada de esta vía de transmisión para *C. abortus* en carneros (Eckert *et al.*, 2019).

Lesiones y cuadro clínico

La infección por *C. abortus* en cabras y ovejas induce aborto, muerte fetal o el nacimiento de crías débiles. El aborto sucede principalmente en el último tercio de la gestación, sin signos clínicos previos a que éste ocurra; en ocasiones, se observan descargas vaginales días previos al aborto, siendo más frecuentes en cabras que en ovejas (Caro *et al.*, 2019).

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

La retención placentaria es más común en cabras y vacas, lo que puede producir metritis. En terneros y corderos nacidos de hembras infectadas, puede haber un cuadro de conjuntivitis y neumonía. El feto no presenta lesiones macroscópicas específicas (Rodolakis *et al.*, 2010); tras el aborto, las lesiones características del AEPR son: membranas placentarias necróticas, engrosadas y exudado placentario. Los fetos abortados están generalmente bien desarrollados y no tienen anomalías anatómicas, lo que sugiere que la placentitis es un elemento clave en la patogénesis del aborto enzoótico de los ovinos (AEO) (Rocchi *et al.*, 2009).

Los machos adultos pueden contagiarse al momento de la monta con hembras infectadas, la infección puede llegar a vesículas seminales y causar epididimitis y orquitis, disminuyendo la calidad del semen (Rodolakis *et al.*, 2010).

Diagnóstico

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

puede resultar en falsos positivos en las pruebas de diagnóstico serológico (Buendía *et al.*, 2002).

Un diagnóstico temprano y preciso de la causa de aborto es muy importante, ya que con éste se pueden establecer las medidas de control apropiadas para limitar o prevenir la propagación de la infección. Cuando el aborto ocurre entre las dos o tres últimas semanas de gestación, con una severa placentitis, se puede sospechar de infección por clamidias sin embargo, otros microorganismos como *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus sp fetus*, *Toxoplasma gondii* y brucelas lisas, pueden causar lesiones placentarias (Longbottom *et al.*, 2003; OIE, 2000), lo que hace que el diagnóstico de la infección sea complicado y requiera la intervención de pruebas de laboratorio (Buendía *et al.*, 2002).

En el diagnóstico de la clamidiosis lo más importante y que no incluye el aislamiento ni la identificación del microorganismo a partir de los abortos, es la detección de la bacteria en aquellos animales aparentemente sanos que han estado en contacto con animales ya enfermos y que pueden ser portadores del agente. Por esta razón, el diagnóstico individual es de menor valor que el colectivo, que incluye a todo el rebaño. Actualmente existen diferentes procedimientos que se pueden realizar en el laboratorio y se agrupan en métodos directos y métodos indirectos; con los primeros se busca la identificación del agente etiológico, *C. abortus*, en las muestras recibidas, mientras que, en los indirectos se detecta la respuesta inmune generada por el animal como consecuencia de la infección (García, 2003).

Según la OIE, el método más comúnmente usado para el serodiagnóstico de la clamidiosis es la prueba de fijación del complemento (CFT); sin embargo, además de ser una técnica laboriosa, es de sensibilidad limitada y a menudo afectada por reacciones cruzadas entre especies de clamidias (Pospischil, 2006).

Control y profilaxis

El control de esta infección no sólo es importante desde el punto de vista de la sanidad animal, sino también para prevenir su contagio al hombre. La medida de control más aconsejada para esta infección es la vacunación (Ortega *et al.*, 2003), sin embargo, se pueden establecer medidas de control y prevención del AEPR en base a tres aspectos: medidas de manejo o no específicas, tratamiento con antimicrobianos e inmunización (García, 2003).

Las medidas de manejo consisten en el aislamiento de animales enfermos y su progenie, todos los corderos muertos, placentas y ropa de cama, deben desecharse de forma segura; los corrales de parición, comederos y bebederos deben ser desinfectados para evitar que se propague la contaminación a otros lugares de las instalaciones. Es importante lavarse bien las manos y de ser posible, cambiar la ropa del médico o trabajadores antes de atender otros animales (Longbottom *et al.*, 2003; Kadra *et al.*, 2006).

Chlamydia es susceptible a la mayoría de los desinfectantes y detergentes, incluyendo una dilución de 1:1000 de compuestos de cuaternario de amonio, 1% de hipoclorito de sodio, etanol al 70%, entre otros. También puede ser destruida por calor húmedo a 121° C durante 15 min., o calor seco entre 160 y 170° C durante una hora (Center for Food Security and Public Health, 2005).

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

cloranfenicol pueden ser usados (Longbottom *et al.*, 2003; Center for Food Security and Public Health, 2005).

Finamente, la vacunación es considerada como la única solución eficaz para controlar la infección por *Chlamydia* en los rebaños (Longbottom *et al.*, 2003; Center for Food Security and Public Health, 2005).

Cuando ingresan animales al rebaño y se tiene duda sobre su procedencia, deberán ser vacunados antes de ingresar al mismo, si la infección ya ha sido diagnosticada, las ovejas deben ser vacunadas antes de la época reproductiva, repitiendo la vacunación en tres años cuando el rebaño se encuentra muy infectado (Longbottom *et al.*, 2003); dado que la enfermedad en México fue considerada durante mucho tiempo como exótica, actualmente no se cuenta con cuadros de vacunas para prevenir o controlar la enfermedad.

Las vacunas inactivadas fueron las primeras en utilizarse, son inactivadas con formalina y tienen como desventaja conferir protección limitada y no impiden la eliminación del microorganismo durante el parto, pero pueden conferir cierta protección residual, que puede ser adecuada en rebaños donde la carga clamidial aún es baja. Las vacunas atenuadas mejoran el nivel de protección, pero al tratarse de una vacuna viva, el daño potencial la hace menos atractiva como alternativa. Del mismo modo, el uso de vacunas subcelulares no ha dado buenos resultados, así como tampoco los ensayos realizados con vacunas basadas en ADN (Rodolakis *et al.*, 2010; Kadra *et al.*, 2006).

En los 80's, se desarrolló una vacuna viva termosensible que crece a 38° C, pero a 39° C se restringe su crecimiento; ésta, se encuentra constituida por la cepa 1B, que es una mutante nitrosoguanina procedente de la cepa de campo AB7 de *C. abortus* (Kadra *et al.*, 2006; Sambrock *et al.*, 1989). Esta vacuna ha resultado ser más eficiente, ya que disminuye la presentación de signos clínicos y previene la infección en ovejas y cabras desafiadas (Rodolakis *et al.*, 2010), pero el uso de este tipo de vacunas interfiere en la interpretación de un diagnóstico serológico rutinario y puede causar estados temporales de inmunosupresión

acompañados de un aumento de susceptibilidad a otras infecciones (Ortega, 2005).

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

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

La capacidad de *C. abortus* para establecer una infección persistente en ovejas es reflejo de una adaptación compleja entre el hospedero y el patógeno. La respuesta inmune que se genera durante esta etapa de la infección aún no es del todo clara, sin embargo, la inmunidad que se genera después del aborto se sabe que es protectora; por lo que el objetivo de una nueva vacuna contra el AEPR debe ser el imitar o mejorar esta respuesta protectora (Entrican *et al.*, 2012).

Justificación

Se han realizado estudios en los que se ha demostrado que la vía principal de entrada de *C. abortus* es la oral, especialmente al ingerir alimento o agua contaminados con membranas placentarias o secreciones vaginales presentes al momento del parto o aborto de animales infectados; sin embargo, existen otro tipo de secreciones en las que aún no se ha demostrado si la bacteria es eliminada, tal es el caso del calostro y de la leche, alimentos fundamentales de los corderos, donde al presentarse microorganismos viables pueden propiciar el contagio a las crías.

Otras vías posibles de eliminación de la bacteria incluyen al semen, sin embargo, en los estudios que se han realizado hasta ahora, no se ha determinado el sitio del aparato reproductor del macho en el que se encuentra la bacteria.

Hipótesis

Los ovinos infectados con *C. abortus* eliminan la bacteria en el calostro, la leche y el semen; lo que favorece la transmisión y la permanencia de la bacteria en el rebaño.

Objetivo

Detectar la presencia de *Chlamydia abortus* en calostro y leche de ovejas, así como en el semen y los órganos del aparato reproductor de sementales infectados.

Materiales y métodos

- **Material biológico**

Con el objetivo de seleccionar un rebaño que permitiera la realización del estudio, durante el periodo de septiembre a diciembre de 2016, se pudo tener acceso a rebaños de diferentes Estados del centro de la República Mexicana. Se muestrearon ovejas con historia de aborto o recién abortadas o paridas; se visitó un total de 23 productores en los Estados de Querétaro, Puebla, Estado de México, Morelos e Hidalgo, obteniendo un total de 534 muestras.

Hembras: dentro de las unidades de producción que se consideraron, se encontraba el Centro de Investigación y Producción Ovina (CEIEPO) de la FMVZ-UNAM, en el municipio de Huitzilac Morelos, donde se acordó dar continuidad al proyecto mediante el muestreo inicial de 66 hembras que se encontraban gestantes, por lo que, durante los meses de marzo-abril de 2017 se realizaron guardias de fines de semana; se contó con el apoyo de servicios sociales y médicos de guardia, quienes fueron capacitados para la toma de muestras diarias. En un primer muestreo, se colectó sangre de las hembras que se encontraban en el rebaño (n= 274); posteriormente, se colectaron durante el periodo de marzo – abril de 2017, 66 muestras de calostro, 66 de cotiledones y n=66 de hisopos vaginales que provenían de 66 hembras recién paridas y de un caso de aborto; un mes después de los partos, se colectaron 65 leches y sangre para separar el suero sanguíneo de todos los corderos (n=116) que nacieron entre marzo y abril.

Durante un periodo diferente de partos en el mismo rebaño se realizó un segundo muestreo a 14 hembras que fueron sincronizadas y puestas en empadre entre agosto y septiembre de 2018; nuevamente se colectó calostro, leche e hisopos vaginales durante los meses de enero-febrero de 2019. Las leches se colectaron por duplicado en diferentes tiempos, el primer muestreo se realizó a los 15 días posparto y el segundo al mes del parto. El objetivo de realizar los dos muestreos fue para descartar que las leches colectadas en 2017 resultaron negativas a qPCR porque fueron tomadas al mes posparto y la excreción de la bacteria

podiera no suceder después de un periodo largo (un mes) o bien, porque es menor la cantidad o definitivamente no se elimina la bacteria en esta secreción.

En total, durante el primer y segundo muestreo de las hembras se obtuvieron 320 muestras entre calostros, leches, hisopos vaginales y cotiledones, además de las 390 muestras de sangre para separar sueros sanguíneos de las hembras y corderos.

A todas las muestras se les hizo extracción de ADN y se almacenaron a -20 °C, para posteriormente ser procesadas con la prueba de PCR en tiempo real.

Sementales: se consideró a los sementales que montaron a las hembras que parieron en el primer muestreo antes mencionado; se colectó sangre para separar suero sanguíneo y semen (54 y 19 muestras respectivamente).

El suero sanguíneo se obtuvo de manera anual durante tres años para análisis serológico y descartar la presencia de otros agentes involucrados en la epididimitis del carnero, mientras que el semen se colectó en dos ocasiones diferentes con espacio de un año entre cada muestreo.

Un año posterior al primer muestreo, se colectaron 19 muestras de semen más, las cuales fueron procesadas para aislamiento en cultivo celular y qPCR.

Para obtener muestras que permitieran detectar en tracto reproductor de macho la presencia de clamidias, los sementales que resultaron positivos al aislamiento bacteriológico y detección de antígeno clamidial por la prueba de IFD, así como también a la prueba de qPCR para *C. abortus* en semen, fueron comprados y sacrificados mediante la utilización de Eutafin®, 190 mg de pentobarbital sódico; 50 mg de fenitoína; cipermetrina y glucosa, a razón de 10 mL en cada semental con un promedio de 130 kg de peso vivo.

Se enlistan y se detallan en el Cuadro 3 las muestras que se obtuvieron de los sementales, algunas de ellas se conservaron en medio SPG y posteriormente fueron maceradas, alicuotadas y conservadas a -80° C para luego ser inoculadas en cultivo y hacer extracción de ADN; mientras que las que se conservaron en

paraformaldehído fueron procesadas para análisis histopatológico con dos métodos de tinción y para la prueba de inmunohistoquímica (IHQ).

Cuadro 3. Relación de muestras colectadas al momento del sacrificio de cada uno de los sementales positivos a IFD y qPCR en semen para *C. abortus*.

Identificación del semental	Fecha de sacrificio	Muestras colectadas	Condiciones de conservación
8502	22 enero 2019	Testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo, "S" sigmoide, conducto deferente, glándula bulbouretral, próstata, linfonodos mesentéricos, mediastínicos, poplíteos, inguinales y retrofaríngeos, pulmón, hígado y bazo.	Paraformaldehído al 4 %
601W	18 febrero 2019	Testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo, conducto deferente, uréter, glándula bulbouretral, próstata, prepucio, linfonodos mesentéricos, mediastínicos y poplíteos, hígado y pulmón.	Paraformaldehído al 4 %
8409	21 febrero 2019	Testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo, glande, "S" sigmoide, glándulas bulbouretrales, vesículas seminales, prepucio, conducto deferente, linfonodos	Paraformaldehído al 4 %

		retrofaríngeo, poplíteo y mediastínico.	
8414	21 febrero 2019	Testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo, glande, "S" sigmoide, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, próstata, conductos deferentes, prepucio, linfonodos poplíteos, mesentéricos, retrofaríngeos, mediastínicos y submandibular, hígado, bazo y pulmón.	Paraformaldehído al 4 %
8502		Hígado, bazo, pulmón, testículos, epidídimo, conducto deferente, prepucio, vesículas seminales y linfonodos.	Medio SPG en congelación.
601W			
8414			
8409			

- **Preparación de las muestras para el cultivo**

Los hisopos vaginales fueron colectados al momento del parto o aborto y puestos inmediatamente en medio Sucrosa-Fosfato-Glutamina (SPG) a 4° C hasta su traslado al laboratorio, donde se almacenaron a -80° C.

Los calostros fueron colectados al momento del parto y las leches a los 30 días posparto en el primer muestreo, en la segunda toma de muestras, se colectaron a los 15 y 30 días posparto. Se colectó un volumen de 5 ml del cual se hizo una dilución en medio SPG a una proporción de 1:1. En ambos casos, fueron conservados a 4° C hasta su traslado al laboratorio, donde se almacenaron a -80° C.

Durante el primer muestreo en el rebaño (periodo comprendido de marzo-abril de 2017) se colectaron al menos cinco cotiledones por animal, estas muestras fueron conservadas de dos formas: se pusieron en refrigeración a 4° C hasta su traslado al laboratorio, donde se almacenaron a -80° C y al menos uno de los cinco cotiledones, se conservó en formol al 10 % y se almacenó a temperatura ambiente; el resto de las muestras fueron maceradas y se tomó una fracción para ser puesta en dos ml de medio SPG; tanto la porción diluida en medio como el sobrante del macerado fueron conservados a -80° C hasta su uso.

Con ayuda de vagina artificial, se colectó semen de los animales que participaron en las montas de las ovejas que fueron consideradas en los muestreos durante las dos épocas de parición. El volumen de semen obtenido (aproximadamente 1 mL por animal) fue puesto en la misma proporción (1:1) de medio SPG y conservado a -4° C hasta su traslado al laboratorio, donde se almacenaron a -80° C.

Tras el sacrificio de los machos, se obtuvo cuidadosamente gran parte del aparato reproductor de cada uno de ellos. Algunas de las muestras fueron conservadas en fresco, maceradas y suspendidas en medio SPG para posteriormente obtener ADN a partir de ellas.

- **Infección de la monocapa celular**

Se utilizó la línea celular L929 proviene de tejido conectivo de ratón la cual se conservó en congelación utilizando nitrógeno líquido.

Las células fueron descongeladas y puestas en cultivo; para ello, el criotubo donde se encontraban se puso en baño María a 37° C en agitación suave; este procedimiento debe ser lo más rápido posible para evitar la formación de cristales intracelulares que dañen la estructura celular. Una vez descongeladas, se resuspendieron en 5 mL de medio D-MEM (*Invitro*®) enriquecido con 1 % de L-glutamina 2 mM, 10 % de suero fetal bovino (SFB), aminoácidos no esenciales (aane) al 1 % y piruvato de sodio 1 mM; se centrifugaron durante 10 minutos a 214 g; el sobrenadante que contenía el crioprotector dimetil sulfoxido (DmsO, Sigma, USA) fue retirado y el botón de células resuspendido en 1 ml medio D-MEM enriquecido; finalmente se distribuyeron en botellas para cultivo celular (nunc®) de 25 cm³ a una proporción de 1X10⁵ células/mL en un volumen final de 5 mL de D-MEM (*Invitro*®) enriquecido; las botellas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una estufa con 5 % de dióxido de carbono (CO₂). El medio de las células fue sustituido por medio nuevo para eliminar células muertas y restos celulares en suspensión.

Se prepararon células en placas de ocho pocillos (Labtek® USA); para ello, las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y se diluyeron para obtener una concentración total de 1.5X10⁵ células/mL. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37° C con 5 % de CO₂. Al día siguiente, se revisó que el monoestrato celular tuviera al menos un 70 % de confluencia para ser infectadas.

Se eliminó el medio de las placas y se colocaron 50 µL de cada muestra (hisopos vaginales) en diferentes pocillos. Las placas fueron centrifugadas a 211 g durante 15 minutos. Posteriormente se incubaron durante una hora a 37° C con 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo se eliminó el inóculo y se hizo un lavado con una solución amortiguadora de fosfatos estéril al 1X (PBS 1X). Se eliminó el PBS 1X y se adicionaron 300 µl de medio D-MEM enriquecido y suplementado con 10 mg/mL de gentamicina.

Las placas se incubaron a 37° C durante 48 horas, con atmósfera del 5 % de CO₂.

Las muestras se descongelaron a 37° C durante 30 minutos, posteriormente se agitaron vigorosamente en un agitador Vortex Genie 2® (Scientific Industires, USA) y enseguida, fueron diluidas 1/5 en medio SPG (10 µl de leche o calostro más 40 µl de SPG). La inoculación de las células se realizó bajo las mismas condiciones empleadas que para los hisopos vaginales.

El semen fue centrifugado a 1148 g durante 10 minutos para precipitar la mayor cantidad posible de células espermáticas, posteriormente se diluyó 1/5 en medio SPG y se inocularon las células bajo las mismas condiciones usadas en los hisopos vaginales.

- **Estudio bacteriológico de semen**

Para descartar que los sementales estuvieran infectados por otro agente patógeno, estas muestras concentradas fueron puestas en cultivo en diferentes medios (Cuadro 4).

Cuadro 4. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para el aislamiento de los principales agentes involucrados en la epididimitis infecciosa ovina.

Medio de cultivo	Condiciones de crecimiento	Microorganismo considerado para aislamiento
Agar chocolate suplementado con extracto de levadura 5 %.	37° C con 5 % CO ₂ .	<i>H. somni</i>
Agar TSA/ agar sangre enriquecido con 5 % de sangre.	37° C con 5 % CO ₂ .	<i>B. ovis</i>
Agar sangre.	37° C con 10 % CO ₂	<i>A. Seminis</i>

Inmunofluorescencia directa

Se determinó la presencia de antígeno clamidial en los cultivos infectados con las diferentes muestras con la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando el estuche comercial (Imagen™ Chlamydia, Oxoid® USA). Esta prueba utiliza un anticuerpo monoclonal específico para el LPS clamidial marcado con fluoresceína, dicho antígeno se encuentra presente en todas las especies del género *Chlamydia*, por lo que no es posible diferenciar entre especies. La técnica se realizó conforme las indicaciones del fabricante.

Los frotis fueron fijados con metanol frío (4° C) durante una hora, enseguida, a cada uno se le agregaron 25 µL del anticuerpo monoclonal unido con isotiocianato de fluoresceína (FITC) previamente diluido (1:5), los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Se utilizaron 2 µL de azul de Evans como colorante de contraste en la dilución del anticuerpo;

transcurrido el tiempo, se hizo un lavado con PBS 1X en agitación constante durante cinco minutos, los frotis se montaron con la solución de montaje contenida en el estuche comercial y se dejaron secar a temperatura ambiente; finalmente se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DM 6000B, Alemania), utilizando el objetivo de 40X.

Para el caso particular del semen, se hicieron extensiones en portaobjetos para poder realizar la prueba de IFD a la par de la puesta en cultivo de las muestras.

- **Extracción de ADN**

Se obtuvo ADN a partir de las muestras de hisopos vaginales, leches, calostros, semen y líquido abomasal (la mayoría de ellas positivas a la detección de antígeno clamidial por la técnica de IFD), en algunos casos por duplicado y otros por triplicado; se evaluaron dos estuches comerciales (QIAamp® DNA Mini, and Blood Mini kit Alemania y DNAzol® México) siguiendo las instrucciones del fabricante; además, se utilizó también la técnica de fenol-agua descrita por Sambrock *et. al* (1989) para determinar con cuál de ellas se obtenía mejor calidad y concentración de ADN por muestra (Sambrock *et al.*, 1989).

Para la técnica de fenol-agua, las muestras fueron descongeladas durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se hizo una dilución en medio SPG en proporción 1:1 (500 µL de SPG:500 µL de muestra); se tomaron 300 µL de este preparado y se le adicionaron 500 µL de solución 1 y 1.5 µL de lisozima; las muestras se incubaron a 37° C durante toda la noche; al día siguiente se agregaron 100 µL de solución STEP y 1.5 µL de proteinasa K; se agitaron con vórtex y se incubaron en baño María a 56 °C durante 1.5 horas; enseguida se adicionó un volumen de fenol amortiguado en PBS 1X y se mezclaron vigorosamente para ser centrifugadas de inmediato a 9374 g durante 15 minutos; se midió el volumen de la fase acuosa, esta fue colectada y puesta en un tubo nuevo donde se añadió un décimo de volumen de acetato de potasio; nuevamente se mezcló y posteriormente se añadieron dos volúmenes de etanol frío (-20° C). Se mezclaron cuidadosamente y se centrifugaron a 9374 g durante 30 minutos, se eliminó el etanol sobrenadante y el precipitado se dejó secando

durante toda la noche a temperatura ambiente (Sambrook *et al.*, 1989). Al día siguiente, los precipitados (ADN) fueron resuspendidos en 50-100 µL de solución TE 1:10 y cuantificadas con un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop®, USA). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

A partir del estuche comercial QIAamp® DNA Mini and Blood Mini kit, se realizaron las extracciones siguiendo las instrucciones del fabricante: a 200 µL de muestra se adicionaron 20 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL; las preparaciones se mezclaron durante 15 segundos por pulsaciones seguidas y se incubaron en baño María a 56 °C por 10 minutos. En seguida se agregaron 200 µL de etanol frío al 70 %, se mezclaron por 15 segundos en un vibromezclador Vortex Genie 2® (Scientific Industires, USA) por pulsaciones seguidas. La solución se tomó cuidadosamente y se colocó en una columna (QIAamp Mini spin column) y ésta a su vez en un tubo colector, para posteriormente ser centrifugada a 6000 g por un minuto. Se eliminó el contenido del tubo colector, se adicionaron 500 µl del buffer AW1 en la misma columna. La muestra se centrifugó de nuevo a 6000 g por un minuto. Con precaución, se cambió la columna del tubo colector y se colocó en uno nuevo, enseguida se añadieron 500 µL de buffer AW2, se centrifugó a 20,000 g por tres minutos. La columna fue cambiada a un tubo Eppendorf® de 1.5 ml, se le adicionaron 50-100 µL de buffer AE (de elusión); se incubó durante un minuto a temperatura ambiente y enseguida se centrifugó a 6000 g por un minuto. Las extracciones de ADN fueron cuantificadas en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop®, USA). Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.

- **PCR múltiple para otros patógenos involucrados en la epididimitis infecciosa del carnero**

Para realizar la PCR múltiple, se utilizó la prueba de Multiplex PCR Kit (QIAGEN®, Alemania), los iniciadores para la amplificación de los fragmentos de ADN de cada bacteria fueron los descritos por Saunders *et al.*, (2007) y Gutiérrez *et al.*, (2015). Siendo ISP1 (GGTTGTAAAGGAGAACAGC) e ISP2 (GACGATAGCGTTTCAACTTG) para *B. ovis*, con un fragmento de amplificación de 690 pares de bases (pb), SRJAS1 (CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC) y

SRJAS2 (AAGAAAAAGACGAAGAGACATT) para *A. seminis*, con un fragmento de amplificación de 436 pb y HS453-F (GAAGGCGATTAGTTTAAGAG) y HS765-R (ACTCGAGCGTCAGTATCTTC) para *H. somni* con un fragmento de amplificación de 113 pb. Con un volumen final de 50 µL de reacción, las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 96 °C durante 10 min, 35 ciclos con etapas de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 57°C durante 60 s y extensión 72 °C durante 60 s; la extensión final fue de 72 °C durante 6 min (Saunders et al. 2007; Gutiérrez et al. 2015).

- **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para *C. abortus***

Debido a que las muestras procedían de rebaños ovinos y la presencia de *C. abortus* es mayormente asociada a problemas reproductivos, se realizó primordialmente la prueba de qPCR para detectar ADN de esta especie. Los iniciadores CpaOMP1-F: GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA, CpaOMP1-R: ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA y sonda CpaOMP1-S: FAM-TAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTAGCG-TAMRA fueron reportados por Pantchev *et al.*, (2009) y amplifican una región de 82 pb del gen ompA de *C. abortus* (Pantchev et al. 2009). Se utilizó 2x QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix® (QIAGEN, Alemania), el volumen final de la reacción fue de 20 µL que incluían 2 µL de ADN, iniciadores a una concentración de 0.4 µM y la sonda TaqMan de hidrólisis a 0.2 µM. Las amplificaciones se hicieron en un termociclador Light Cycler480® (Roche, Francia), las siguientes condiciones de amplificación fueron utilizadas, una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 40 ciclos con etapas de desnaturalización de 95 °C durante 3 s, alineamiento con extensión de 60 °C durante 5 s y un ciclo final de enfriamiento a 40 °C por 40 s. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa AB7 de *C. abortus*, la concentración empleada fue de 0.6 pg.

- **Histopatología**

Las muestras obtenidas de aparato reproductor de macho fueron cortadas en fragmentos de no más de un centímetro cúbico y fijadas en paraformaldehído al 4 %.

Una vez fijados, los tejidos se colocaron en casetes para lavarlos y eliminar el exceso de paraformaldehído. Con el objetivo de deshidratar los tejidos para poder ser incluidos en parafina, fueron colocados de forma ascendente en diferentes concentraciones de etanol, se calentaron en microondas durante dos minutos a potencia media y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. La concentración de los alcoholes utilizados para la deshidratación de los tejidos fue del 70 al 100 %, pasando posteriormente por xilol por 10 minutos en todos los casos.

Una vez deshidratados los tejidos se infiltraron en parafina a una temperatura entre 60 y 65 °C durante cuatro horas; posteriormente los órganos fueron colocados en cubos metálicos, se identificaron y se sirvió parafina previamente fundida a 60-65 °C; se dejó que ésta se solidificara y posteriormente fueron retirados de los cubos metálicos para poder ser cortados con un microtomo.

Se realizaron cortes de 5 micras de espesor con un microtomo (Leika®, Alemania); se colocaron en portaobjetos previamente tratados con albúmina de Mayer (Biopur diagnostics@. México) .

Una vez montados los cortes en los portaobjetos se deshidrataron para posteriormente, poder ser teñidos con Hematoxilina – Eosina (H-E), Stamp y, además, poder realizar la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

- **Tinciones de Hematoxilina – Eosina (H-E) y de Stamp**

Los tejidos procesados fueron teñidos con H-E para la identificación de posibles lesiones.

Hay métodos de tinción que nos facilitan la visualización de algunas bacterias, entre ellas la tinción de Ziehl Neelsen modificado (Stamp) que nos permite la observación de *Chlamydia* spp. en frotis o improntas; además, en el presente trabajo se realizó la tinción en cortes histológicos para facilitar la detección de clamidias en los diferentes tejidos de aparato reproductor de los sementales que resultaron positivos a la presencia de antígeno clamidial en semen, por la técnica de IFD de muestras inoculadas en cultivo y a la prueba de qPCR para *C. abortus*.

Para la realización de la tinción de Stamp (Stamp *et al.*, 1950) se hizo una modificación de la tinción descrita para utilizarla en frotis. Los tejidos fueron desparafinados bajo el mismo protocolo que en la tinción de H-E; posteriormente fueron puestos en una solución de fucsina “hija” diluida 1:5 durante 25 minutos a temperatura ambiente; enseguida se lavaron con ácido acético al 1 % durante 10 segundos y con agua destilada para retirar el exceso de ácido en el tejido. Finalmente, se contratiñeron con verde de malaquita durante 10 minutos a temperatura ambiente; los cortes se lavaron con agua destilada y nuevamente se rehidrataron.

○ **Inmunohistoquímica**

Para la selección de cortes a los que se les realizó la prueba de inmunohistoquímica (IHQ), se consideraron principalmente, aquellos que resultaron positivos a la prueba de qPCR, así mismo, aquellos que resultaron sugestivos a la presencia de bacterias Stamp positivas bajo el siguiente protocolo:

Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados bajo el mismo protocolo empleado en la tinción de H-E; después de ser lavados en agua, se les realizaron tres lavados más durante tres minutos cada uno con una solución amortiguada de fosfatos 1 X (PBS 1X); en seguida se hizo la recuperación antigénica mediante una solución “Recuperadora” (Sol. Dako[®], Agilent, USA) durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente; después, para evitar reacciones falsas positivas al momento del revelado, se inhibió la peroxidasa endógena de los tejidos; para ello se utilizó una solución de metanol con peróxido

de hidrógeno a una proporción de 7:3 vol./vol., se dejaron en cámara húmeda durante 20 minutos a 37 °C, al finalizar el periodo de incubación las laminillas se lavaron con solución TBS durante 5 minutos y posteriormente se realizó el bloqueo con albúmina al 3 % durante 30 minutos a 37 °C. Nuevamente se lavaron con TBS durante 5 minutos y se puso el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se evaluó con tres diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) en TBS; las laminillas se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con TBS durante cinco minutos cada uno y se añadió el anticuerpo secundario, mismo que se diluyó según indicaciones del fabricante a 1:1000 y se evaluó una dilución de 1:500. Las muestras se incubaron a 37 °C durante una hora y nuevamente se lavaron con TBS.

Para el revelado se empleó una solución de diaminobencidina previamente diluida en TBS (50 mg/100 mL) con 10 µL de peróxido de hidrógeno al 30 %; es decir, se utilizó concentrado de acuerdo con su presentación comercial. Las preparaciones se incubaron en cámara húmeda durante 30 minutos o bien, hasta que hubo cambio en la coloración (marrón) de los tejidos; para detener la reacción las laminillas se lavaron con agua destilada y de inmediato se contrateñieron con hematoxilina a una proporción de 1:4 con agua destilada durante un minuto; para clarear los tejidos contrateñidos se sumergieron en carbonato de litio hasta que tomaron una coloración azul, de inmediato se lavaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada; los tejidos no se retiraron del agua hasta que se inició la deshidratación.

Para el caso de los cotiledones, se siguió el mismo protocolo utilizado en los cortes de aparato reproductor de macho. Se hicieron al menos siete cortes de cada muestra mismas que fueron teñidas con H-E y se realizaron también las tinciones de Ziehl Neelsen (ZN) y Stamp en tejidos.

- **Serología**
 - **ELISA-I**

Con el objetivo de determinar el estatus de los rebaños del estudio, inicialmente se realizó una prueba de ELISA-I tipo casera. Cabe señalar que el antígeno

empleado en esta prueba es un extracto crudo a base de cuerpos elementales (CE) de la cepa A22 de *C. abortus*, situación que le da baja sensibilidad y especificidad a la prueba, y esto se debe a que puede detectar antígenos de superficie, principalmente el lipopolisacárido (LPS) mismo que es compartido entre especies clamidiales, por lo que solo se utilizó para diagnóstico de situación en los rebaños (Rodolakis *et al.*, 2015).

Para la prueba de ELISA-I, se sensibilizaron las placas de 96 pozos con el antígeno (extracto crudo purificado e inactivado) diluido en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6 a 1:20; las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche; posteriormente se realizaron lavados con PBS-Tween-20 y se bloquearon con leche desnatada al 2 %.

El anticuerpo primario fue diluido 1:50 y junto con los controles positivo y negativo, se incubaron durante una hora a 37 °C; transcurrido el tiempo se hicieron tres lavados y se colocó el conjugado a una dilución de 1:1000 (Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit AntiSheep IgG (H+L) (USBiological, USA). La reacción enzimática se hizo visible mediante la adición del sustrato Diammonium 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS[®], SIGMA Aldrich, USA), finalmente, la lectura se realizó entre 5 y 10 minutos después de incubar en oscuridad total con un filtro de 405 nm en un lector de ELISA.

Para finalizar el trabajo se realizó un segundo muestreo para obtener suero sanguíneo y nuevamente se procesaron por la prueba de ELISA-I los vientres, los que se utilizaran como reemplazos y a los sementales en el rebaño donde se trabajó todo el proyecto; para ello se utilizó un estuche comercial (IDVet[®] IMAGEN Chlamydia, OXOID, USA) que identifica una proteína de membrana que es expresada únicamente por *C. abortus*, lo que ayuda a diferenciar de otras clamidias que afectan a los ovinos. La prueba se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- **Inmunodifusión en gel de agarosa**

Los sueros de los sementales fueron evaluados para detectar la presencia de anticuerpos de otros agentes etiológicos asociados a problemas reproductivos;

para esto, se realizó la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) para el diagnóstico serológico de *B. ovis* e *H. somni*.

Para determinar si existía o no diferencia significativa en la eliminación de *C. abortus* entre las muestras de leche colectadas a los 15 y 30 días se aplicó la prueba exacta de Fisher, con un intervalo de confianza del 5 -%. Además, se calcularon los índices de Kappa para determinar la concordancia entre las diferentes técnicas utilizadas para el aislamiento y confirmación por IFD y la qPCR para los diferentes tipos de muestra analizados: calostro, leche e hisopos vaginales.

Resultados

- **Cultivo de muestras y prueba de inmunofluorescencia directa**
 - **Muestras colectadas en el periodo de septiembre a diciembre de 2016**

De las 534 muestras colectadas, 67 fueron hisopos vaginales provenientes de hembras recién abortadas con serología positiva; a partir de estas muestras se obtuvo un total de 16 positivas al aislamiento en cultivo celular.

En los cuadros 5 y 6 se registran los resultados obtenidos durante esta primera etapa de muestreos.

Cuadro 5. Resultados obtenidos por serología para la detección de *C. abortus* a partir de las 534 muestras de suero sanguíneo por serología en el primer muestreo.

SEROLOGÍA		Porcentaje (%)
POSITIVAS	254	47.6
NEGATIVAS	261	48.9
SOSPECHOSAS	19	3.5
TOTAL	534	100

Cuadro 6. Resultados obtenidos de las muestras que se procesaron para aislamiento de *Chlamydia* spp en cultivo celular y por la prueba de IFD en el primer muestreo.

 AISLAMIENTOS	
POSITIVAS	16
NEGATIVAS	51
TOTAL	67

- **Muestras colectadas de hembras en el periodo de marzo-abril de 2017**

Se procesaron un total de 263 muestras: 66 calostros, 65 leches, 66 hisopos vaginales y 66 cotiledones. Se obtuvieron 50/197 (25.3 %) positivas a la presencia de antígeno clamidial, de las cuales, 19/66 (28.7 %) fueron calostros, 14/65 (21.5 %) leches y 17/66 (25.7 %) hisopos vaginales.

De los 66 cotiledones, no se pudo obtener aislamiento debido a su alto grado de contaminación, por lo que solamente se consideraron para análisis histopatológico (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados del aislamiento en cultivo celular de *Chlamydia* spp del total de las muestras colectadas de ovinos durante el año 2017 en el CEIEPO-UNAM.

	Calostro	Hisopos vaginales (H.V.)	Leche	Cotiledones	Total de muestras procesadas
Total de muestras (N = 263)	66	66	65	66	
Inoculadas en cultivo celular	66	66	65	22	219
Positivas	19	17	14	-	50
Negativas	46	49	50	-	147
Contaminadas	1	-	1	22	24
% de positivas	28.7	25.7	21.5	-	
TOTAL	66	66	65	22	

De las 50 muestras positivas, 18 ovejas tuvieron al menos dos muestras positivas al aislamiento e IFD; 12 hembras fueron positivas en calostro e hisopos vaginales, mientras que nueve ovejas fueron positivas en leche e hisopo vaginal. Respecto al calostro y leche, solamente ocho ovejas fueron positivas en ambas

muestras. En general, cinco ovejas tuvieron tres muestras negativas y cuatro hembras tuvieron tres muestras positivas (calostro, leche e hisopo vaginal) para el aislamiento por cultivo e IFD (cuadro 8).

Cuadro 8. Muestras (n=66 calostros e hisopos vaginales y n=65 leches) positivas (25.3 %) al aislamiento de *Chlamydia* spp en cultivo celular e IFD.

	Positivos	Negativos	Total
Calostro	19 (28.7 %)	47 (71.2 %)	66
Leche	14 (21.5 %)	51 (78.4 %)	65
Hisopos vaginales	17 (25.7 %)	49 (74.2 %)	66
Total	50 (25.3 %)	147 (74.6 %)	197

Respecto al segundo muestreo, se colectó un total de 56 muestras mismas que fueron inoculadas en cultivo celular para intentar el aislamiento de *Chlamydia* spp. (cuadro 9).

Cuadro 9. Se muestran los resultados positivos y negativos del aislamiento en cultivo celular de *Chlamydia* spp. de las muestras colectadas de ovinos durante el periodo de pariciones en el CEIEPO-UNAM.

	Calostro	Hisopos vaginales (HV)	Leches (15 días pos parto)	Leches (30 días pos parto)	TOTAL
Total de muestras (N = 56)	14	14	14	14	56
Positivas	6	9	4	1	20
Negativas	8	5	10	13	36
TOTAL	14	14	14	14	56

De las nueve hembras que resultaron positivas al aislamiento en cultivo celular para hisopo vaginal, tres (3/9) fueron también positivas al aislamiento en calostro y tres leches colectadas a los 15 días posparto (3/9) fueron también positivas a la presencia de antígeno clamidial. El resto de las positivas, pertenecen a diferentes animales y no se encontró similitud en las cuatro muestras colectadas de cada uno de ellos (calostro, leche 15 y 30 días e hisopos vaginales).

El número de leches positivas por aislamiento y confirmada por IFD a los 30 días, fue menor en relación con las colectadas a los 15 días posparto, lo que implicaría que la bacteria disminuye su eliminación conforme aumentan los días después del parto, sin embargo, no existe diferencia significativa entre muestreos ($p=0.183$). En el caso de los aislamientos confirmados por qPCR, el resultado fue similar ($P=0.538$). A pesar de esto, sí es importante resaltar que la bacteria, al encontrarse en la leche aún después de 30 días posparto, puede favorecer la diseminación y permanencia de la infección en un rebaño.

- **Semen**

Originalmente se inocularon 15 muestras de semen por duplicado en cultivo celular y se realizaron frotis del semen conservado en medio SPG, con la finalidad de detectar la presencia de antígeno clamidial mediante la prueba de IFD, obteniendo cuatro muestras positivas, tres en ambos procedimientos (frotis y cultivo celular) y una, solamente por cultivo celular.

En un segundo muestreo, se colectaron 19 muestras que incluyeron las cuatro que inicialmente resultaron positivas a la presencia de antígeno clamidial por IFD; a estas muestras únicamente se les hizo extracción de ADN para posteriormente ser procesadas por qPCR, obteniendo un total de cinco muestras positivas a la presencia de ADN de *C. abortus*. De estas cinco muestras, solamente tres resultaron nuevamente positivas a la presencia de ADN clamidial en semen y dos correspondían a otros sementales.

Los cuatro sementales que originalmente resultaron positivos a la presencia de antígeno clamidial en semen durante el primer muestreo, fueron adquiridos para posteriormente ser sacrificados y obtener el tracto reproductor de cada uno de ellos.

- **Estudio bacteriológico para otras especies bacterianas implicadas en falla reproductiva de carneros**

Se inocularon diferentes medios de cultivo bacteriológico con las 15 muestras de semen, encontrando tres muestras de diferentes animales con crecimiento de colonias sugestivas de *H. somni*, *B. ovis* o *A. seminis*; sin embargo, todos los casos resultaron negativos a la prueba de PCR (cuadro 10).

- **Extracción de ADN**

Para obtener ADN de las muestras colectadas, se utilizaron diferentes protocolos: DNAzol®, estuche comercial (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini kit) y la técnica de fenol-agua descrita por Sambrock *et. al.* (1989).

De las diferentes metodologías empleadas para obtener ADN, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a concentración y calidad del ADN en las muestras de calostro y leche, utilizando el método de fenol-agua descrito por Sambrock *et. al.* (1989), mientras que para la extracción en semen, líquido abomasal e hisopos vaginales, fue mejor mediante el empleo del estuche comercial QIAamp® DNA Mini and Blood Mini kit.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple**

Para descartar la presencia de otros agentes etiológicos involucrados en problemas reproductivos en carneros, se realizó también una prueba de PCR múltiple a las 15 muestras de ADN obtenido a partir del semen, resultando todas negativas a la presencia de ADN de otros agentes involucrados en la epididimitis del carnero, descartando de este modo, posibles infecciones o lesiones ocasionadas por otros microorganismos diferentes a *C. abortus* como *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*. (cuadro 10)

Cuadro 10. Resultados al aislamiento bacteriológico y a la prueba de PCR múltiple a colonias sugestivas de *B. ovis*, *H. somni* y *A. seminis*.

Muestra	Núm. de muestras	Núm. De muestras sospechosas en cultivo	Resultado a PCR de otros géneros bacterianos	Resultados en bacteriología
Semen	15	3	Negativos	Negativos

- **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para *Chlamydia abortus***

Para la prueba de qPCR se consideraron las muestras de ovejas con resultado positivo a hisopo vaginal, calostro o leche en la prueba de IFD.

Para el caso del primer muestreo se evaluaron un total de 92 muestras, de las cuales 50 fueron positivas al aislamiento y las 42 restantes negativas, pero que

pertenecían a ovejas que resultaron positivas en alguna de las tres muestras (calostro, leche o hisopo vaginal) positivas a IFD.

Se obtuvo un total de 38/92 muestras positivas (41.3 %) a la presencia de ADN para *C. abortus* de las cuales 16 fueron calostros, cuatro leches y 18 secreciones vaginales. Derivado de los resultados obtenidos, fue posible establecer el índice de kappa (*k*) entre los aislamientos/IFD y la qPCR para los diferentes tipos de muestra y se indica en los cuadros 11, 12 y 13.

Cuadro 11. Concordancia entre aislamiento y qPCR en las muestras de calostro en la detección de *Chlamydia* spp.

		Aislamiento/IFD		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR	Positivos	15 (48.3 %)	1 (3.2 %)	16 (51.6 %)
	Negativos	4 (12.9 %)	11 (35.4 %)	15 (48.3 %)
	Total	19 (61.2 %)	12 (38.7 %)	31 (100 %)

Indice *kappa* para calostro=0.81
 Interpretación: < 0,00 = sin acuerdo; >0,00 - 0,20= insignificante
 0,21 - 0,40= discreto; >0,41 - 0,60= moderado; 0,61 - 0,80=
 sustancial; 0,81 – 1,00= casi perfecto.

Calostro (n=31)

Cuadro 12. Concordancia entre aislamiento y qPCR en las muestras de leche en la detección de *Chlamydia* spp.

		Aislamiento/IFD		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR	Positivos	4 (13.3 %)	0 (0.0 %)	4 (13.3 %)
	Negativos	10 (33.3 %)	16 (53.3 %)	26 (86.6 %)
	Total	14 (46.6 %)	16 (53.3 %)	30 (100%)

Indice *kappa* para leche= 0.14
 Interpretación: < 0,00 = sin acuerdo; >0,00 - 0,20= insignificante
 0,21 - 0,40= discreto; >0,41 - 0,60= moderado; 0,61 - 0,80=
 sustancial; 0,81 – 1,00= casi perfecto.

Leche (n=30)

Cuadro 13. Concordancia entre aislamiento y qPCR en las muestras de secreciones vaginales en la detección de *Chlamydia* spp.

	Aislamiento/IFD			
	Positivos	Negativos	Total	
qPCR	Positivos	12 (38.7 %)	6 (51.6%)	18 (58.0 %)
	Negativos	5 (16.1 %)	8 (25.8 %)	13 (41.9 %)
	Total	17 (54.8 %)	14 (77.4 %)	31 (100%)

Indice *kappa* para secreciones vaginales= 0.50
 Interpretación: < 0,00 = sin acuerdo; >0,00 - 0,20= insignificante
 0,21 - 0,40= discreto; >0,41 - 0,60= moderado; 0,61 - 0,80=
 sustancial; 0,81 – 1,00= casi perfecto.

Hisopos vaginales (n=13)

Las concordancias observadas fueron de 0.81 (casi perfecto), 0.14 (insignificante) y 0.50 (moderado) para calostro, leche y secreciones vaginales respectivamente.

De las 42 muestras negativas a la presencia de antígeno clamidial por la prueba de IFD, solamente un calostro y seis hisopos vaginales dieron positivos para qPCR.

De las 18 hembras que resultaron positivas para qPCR en la muestra de hisopo vaginal, 10 (55 %) también fueron positivas en calostro, mientras que solo tres muestras positivas de leche (16.6 %) pertenecían a tres de las 18 ovejas que resultaron positivas en hisopo vaginal por la misma prueba. Respecto a la relación calostro-leche, solo dos leches de los 16 calostros positivos (12.5 %) por qPCR, pertenecían a la misma oveja.

En general, solo una oveja tuvo tres muestras positivas y dos tuvieron tres muestras negativas (calostro, leche e hisopo vaginal) tanto para qPCR como para el aislamiento por cultivo e IFD.

Respecto al segundo muestreo, se obtuvieron cuatro calostros positivos (4/14) (28.57 %), tres leches colectadas a los 15 días positivas (3/14) (21.4 %), 2 leches colectadas a los 30 días positivas (2/14) (14.28 %) y siete hisopos vaginales (7/14) (50 %) positivos a la presencia de ADN de *C. abortus*.

Cabe señalar que la oveja que abortó durante el segundo muestreo resultó positiva a la prueba de qPCR para *C. abortus* en la muestra de leche colectada a los 15 días posparto.

De las cuatro muestras de semen que habían resultado positivas a qPCR en el primer muestreo, tres (3/4) de ellas repitieron el resultado de positividad en qPCR para *C. abortus*; además, se detectaron otros dos sementales positivos a la presencia de ADN de *C. abortus*.

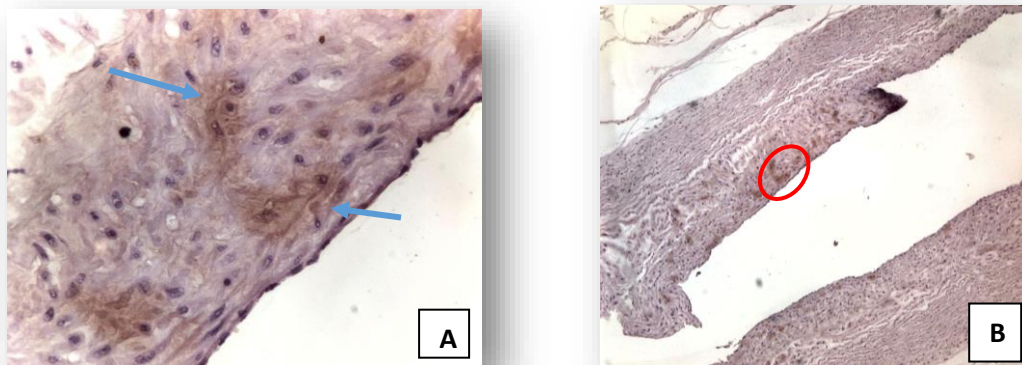
- **Órganos de aparato reproductor de sementales**

Respecto a los diferentes órganos procesados de los sementales positivos a IFD y qPCR en el primer muestreo de semen, se encontraron diferentes muestras positivas a la presencia de ADN de *C. abortus*; siendo linfonodo retrofaríngeo en un semental; conducto deferente, prepucio, linfonodos mesentérico y poplíteo en otro y vesículas seminales, hígado y testículo de otro carnero.

- **Estudio patológico.**
 - **Cotiledones**

Se colectaron 66 cotiledones, de los cuales, solamente 40 fueron fijados en formalina al 10 %. A estas muestras se les realizaron las tinciones de Ziehl Neelsen, H-E y Stamp, además de la prueba de IHQ, obteniendo un total de dos muestras positivas a la detección de antígeno clamidial. Una de las muestras se encontraba lisada, por lo que no fue posible procesarla para ninguna de las técnicas antes mencionadas. En los cortes teñidos con H-E no se detectó la presencia de lesiones, esto se debe posiblemente a que todos fueron partos a término y sin problemas, por lo que únicamente se detectó en algunos de ellos, pocas zonas de desprendimiento de epitelio debido a los posibles desgarres que pueden darse al momento del parto.

De estas muestras, solamente dos resultaron como sugestivas a la presencia de antígeno clamidial por la prueba de IHQ (figuras 1A y 1B).



Figuras 1 A y 1B. Cotiledón de oveja con inmunomarcaje positivo a la presencia de antígeno clamidial con la prueba de IHQ (**A.** aumento de 400X; **B.** Aumento de 100 X).

Se muestran dos aumentos de la misma toma de uno de los cotiledones de oveja positivos a IHQ, cabe señalar que tanto esta muestra como la otra que resultó positiva a IHQ, corresponden a dos de los animales que se detectaron como positivos a las pruebas de IFD y qPCR, en ambos casos en hisopo vaginal.

- **Órganos de aparato reproductor de macho**
 - Descripción de lesiones macroscópicas en diferentes tejidos de aparato reproductor de macho.

A la necropsia se encontraron diferentes hallazgos en algunos de los órganos reproductivos de los carneros sacrificados; a continuación, se hace una breve descripción de las lesiones.

El prepucio de tres de los cuatro sementales presentaba zonas de nodulaciones blanquecinas de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, se localizaban en la superficie de la mucosa y sobresalían de esta en 0.2 cm. Estas lesiones se encontraban invadiendo la mayor parte de la mucosa prepucial de uno de los animales, mientras que, en los otros dos, solamente en algunas zonas y en menor proporción fueron observadas (figuras 2A y 2B).

En uno de los machos se observó líquido abundante en cavidad torácica, mientras que el pericardio se hallaba engrosado y de aspecto blanquecino hacia la pared (figura 2C).

Tres de los sementales presentaron la formación de una masa amorfa con apariencia de un coágulo de sangre en la porción distal de al menos uno de sus testículos, ocupando en uno de ellos más del 70 % del parénquima testicular (figuras 2D y 2E).

En el tejido adyacente al coágulo, en uno de los testículos, se observaron estructuras blanquecinas de superficie nodular, aparentemente de tejido caseificado; además, los vasos del plexo pampiniforme mostraban una marcada dilatación; cabe señalar que este hallazgo se presentó de forma bilateral (figura 2F).

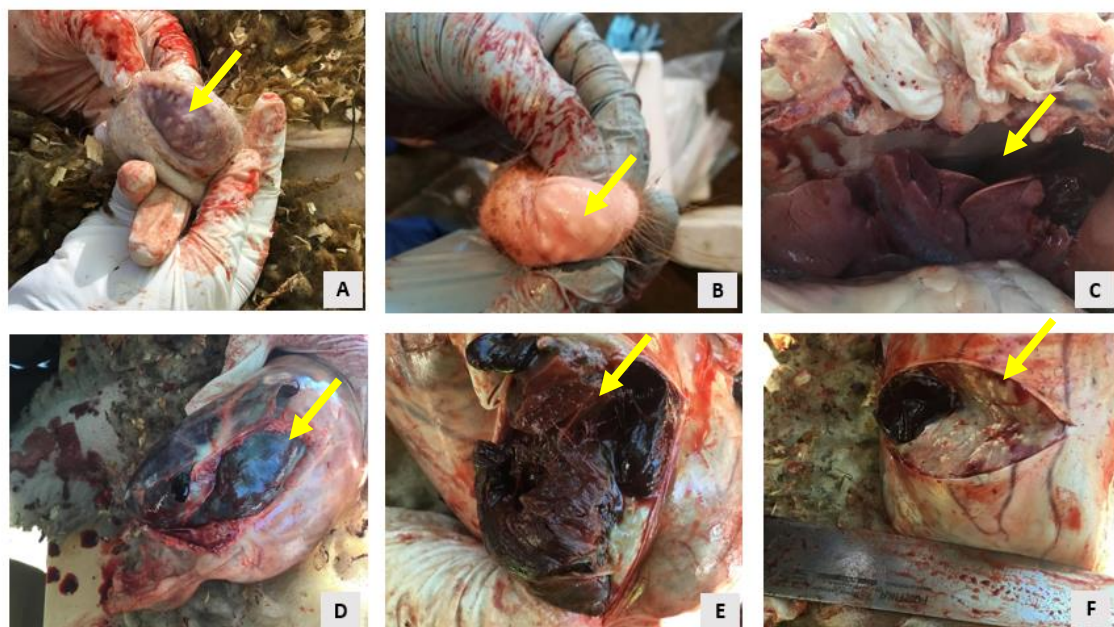


Figura 2. A y B. Se muestran prepucios de carneros que resultaron positivos a la presencia de antígeno y ADN clamidial por las pruebas de IFD y qPCR en semen respectivamente. **C.** Presencia de líquido en cavidad torácica de uno de los sementales. **D y E.** Coágulo localizado en parénquima testicular del mismo animal. **E.** Corte transversal de testículo de uno de los sementales positivos a IFD y qPCR en muestra de semen, mostrando parte del coágulo en el parénquima testicular. **F.** Se muestran nodulaciones blanquecinas en parénquima testicular del semental positivo a IFD y qPCR en muestra de semen.

- **Descripción de lesiones microscópicas en diferentes tejidos de aparato reproductor de macho.**

A partir de los cortes histológicos se realizaron las tinciones de H-E para la identificación de posibles lesiones, así como también de Stamp para la detección de bacterias sugerentes a *Chlamydia* spp. en los diferentes tejidos del tracto reproductor de los sementales. Adicionalmente, se hizo la técnica de IHQ para detectar la presencia del antígeno clamidial en los órganos.

Para el caso de las diluciones de los anticuerpos utilizados en la IHQ, se obtuvieron mejores resultados con las diluciones 1:100 y 1:500 para anticuerpo primario y secundario respectivamente.

Con la tinción H-E en los cuatro casos se observó la presencia de quistes intraepiteliales en epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), en mayor proporción para el caso del cuerpo del epidídimo (figuras 3A y 3B).

En la luz de las vesículas seminales, conductos epididimarios y túbulos seminíferos, se observó extravasación de células sanguíneas, así como, en algunas regiones del tejido conectivo que rodea a los conductos epididimarios y seminíferos, particularmente en uno de los sementales.

En los cuatro machos el testículo presentaba algunos túbulos seminíferos colapsados en aproximadamente el 10 %, además, en algunos de ellos se pudo observar la pérdida de arquitectura en el epitelio testicular y sin contenido espermático.

Por otra parte, en al menos dos de los sementales en la luz de los túbulos seminíferos se observó la presencia de materia sugerente a calcio (figura 3C).

En los testículos de uno de los sementales se observó la presencia de espermatozoides invadiendo el espacio del tejido conectivo, lo que podría sugerir posible rompimiento de algunos de los túbulos seminíferos, ya sea por manipulación del tejido o bien por lesiones asociadas a algún daño al epitelio que podrían incluso, estar relacionadas con la edad del animal. Así mismo, se observó en algunas zonas del mismo corte la presencia de células plasmocíticas, lo que sugiere un proceso inflamatorio no supurativo crónico e inespecífico (figura 3D).

Es importante señalar que este tipo de lesiones pueden estar asociadas a la edad de los animales, seis a siete años aproximadamente; por lo que no es posible relacionarlas de manera directa a la presencia de clamidias.

Respecto a las glándulas, en general, mostraban su arquitectura epitelial íntegra; sin embargo, en las figuras 3E y 3F, se muestran vesículas seminales con inmunomarcaje positivo por la prueba de IHQ; cabe señalar que este semental, también resultó positivo por qPCR e IFD en semen y qPCR positivo en vesículas seminales. A la tinción de Stamp, también resultaron positivas las vesículas seminales (figura 3F).

Tanto en hígado como en pulmón no se identificaron daños o lesiones significativas.

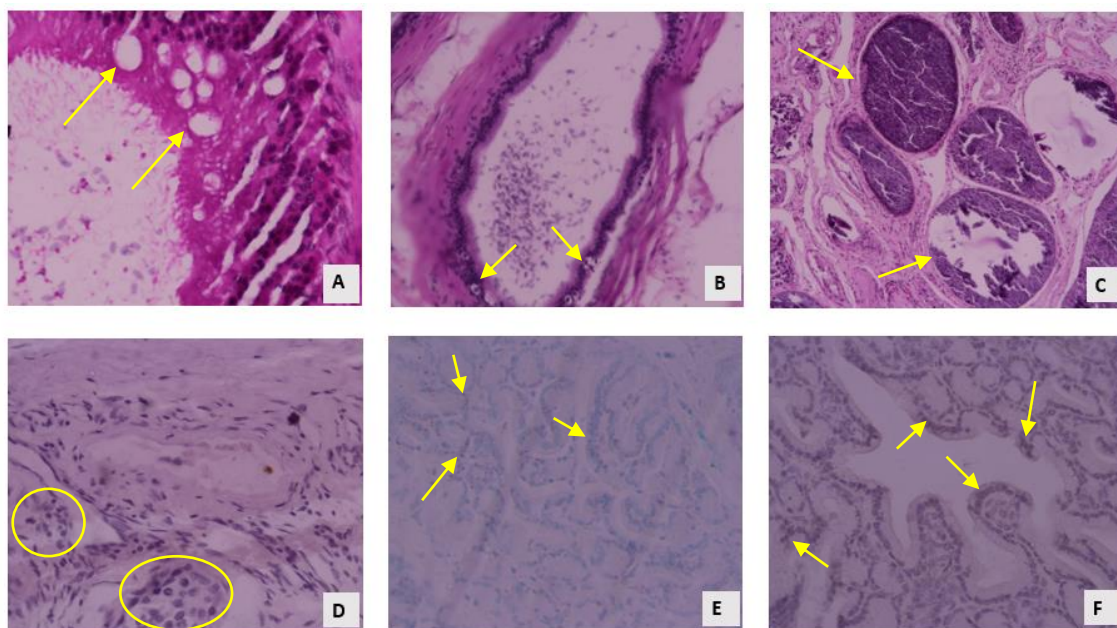


Figura 3. **A.** Cuerpo de epidídimo (100X) y **B.** Testículo (100X). En ambos casos se observa la presencia de quistes intraepiteliales. **3C.** Degeneración testicular avanzada con presencia de calcio en los túbulos seminíferos. Testículo con aumento 100X. **3D.** Túbulo seminífero atrésico con ligero infiltrado linfocítico. **3E y 3F.** Vesículas seminales teñidas con tinción de Stamp (**E**) y con inmunomarcaje positivo por IHQ (**F**). Aumento 100X.

- **Serología**

- **Primer muestreo (septiembre a diciembre de 2016)**

De los 534 sueros sanguíneos colectados, se obtuvieron 254 muestras seropositivas, 19 sospechosas y 261 negativas por la prueba de ELISA-I.

- **Muestras colectadas en el periodo marzo-abril de 2017**

Se colectaron un total de 444 sueros sanguíneos en la unidad de producción del CEIEPO, de la FMVZ, UNAM, distribuidos de la siguiente forma: hembras: 274; machos: 54 y corderos 116. De estas muestras, se obtuvo un total de 39 seropositivas, 35 hembras y 4 machos. En el Cuadro 14, se muestran los

resultados obtenidos con la prueba de ELISA-I tipo casera usando un extracto crudo de *C. abortus* cepa A22 como antígeno.

Cuadro 14. Resultados serológicos de madres, corderos y sementales del CEIEPO-UNAM, por la técnica de ELISA-I para detectar anticuerpos contra *C. abortus*.

SEROLOGÍA				
	Hembras	Machos	Corderos	Total
Positivas	35	4	0	39
Negativas	212	47	116	375
Sospechosas	27	3	0	30
Total	274	54	116	444

Finalmente, se hizo un segundo muestreo para obtener suero sanguíneo de un total de 250 hembras de reemplazo y 19 sementales, entre los que se encontraban los seis sementales con resultado positivo a aislamiento o qPCR.

Estas muestras fueron evaluadas con el estuche comercial (IDVet®); obteniendo solamente cuatro muestras positivas a la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia abortus* y dos como sospechosas; cabe señalar que ninguna de estas correspondía a los animales con resultado positivo a las otras pruebas.

- **Sementales**

Para el caso de la prueba de IDGA para detectar anticuerpos anti *B. ovis* y anti-*H. somni* a partir de sueros de carneros, resultaron todas negativas. Los sementales fueron monitoreados durante tres años continuos con el diagnóstico serológico de brucelosis ovina y de histofilosis, obteniendo una muestra por año y resultando en todos los casos negativos.

Discusión

El presente estudio evaluó la excreción de *C. abortus* en calostro y leche de ovejas infectadas, así como, la presencia de esta bacteria en tracto reproductor de carneros con muestras de semen positivo a IFD y qPCR. Este es el primer estudio de campo en la literatura científica que evidencia la excreción de clamidia por vía lactogénica en las primeras horas después del nacimiento, particularmente en el calostro.

Rodolakis *et al.*, (2015) indicaron que el porcentaje de abortos provocados por *C. abortus* en rebaños de ovinos en Europa puede llegar hasta el 30% cuando la enfermedad se presenta por primera vez en el rebaño, generando grandes pérdidas económicas, a las cuales se pueden agregar las pérdidas resultantes de los corderos nacidos débiles o muertos. Además, la producción de leche tiende a disminuir en las ovejas afectadas durante un brote de *Chlamydia*. En estos rebaños, el objetivo principal debería ser limitar la propagación de la infección a otros animales. Las principales fuentes de infección descritas para ovinos susceptibles son las secreciones vaginales, las membranas placentarias y los fetos muertos, los cuales están infectados con una gran cantidad de clamidias que contaminan los alimentos, el agua, la cama de los animales en el momento del parto o aborto o durante el celo, favoreciendo la transmisión y permanencia de la bacteria en rebaños afectados (Lonhbottom *et al.*, 2003; Rodolakis *et al.*, 2015; Stuen *et al.*, 2011). Si los corderos ingieren calostro o leche contaminados, dadas las características de supervivencia de *C. abortus* (Elwell *et al.*, 2016), la bacteria podría permanecer inactiva en el animal hasta que las condiciones sean favorables para que la enfermedad se manifieste. Las ovejas infectadas que pueden eliminar la clamidia en el calostro podrían ser una fuente de infección para los corderos, ya que es el único alimento para los recién nacidos, que además nacen agammaglobulinémicos con un sistema inmunológico inmaduro, que es lento para producir inmunoglobulinas durante las primeras horas de vida (Castro *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2012). En estas condiciones, una forma segura de prevenir la transmisión de la infección sería el aislamiento de los corderos recién nacidos, no permitiéndoles consumir calostro o leche de sus madres y alimentarlos con leche artificial. Sin embargo, la leche,

al igual que el calostro es el alimento fundamental para la supervivencia de las crías por lo que, podría sustituirse por leche de una oveja sana, o se puede pasteurizar, pero con riesgo de perder parte de sus propiedades biológicas referencia.

Thomas *et al.* (1990) detectaron mediante IDEIA-ELISA, la presencia de antígeno de clamidia en muestras de placenta y leche de oveja; sin embargo, en el caso de la leche solo una de 26 resultó positiva. En un intento por aislar en células McCoy, estos autores separaron la fracción grasa de la leche por centrifugación y las muestras se mantuvieron en el medio de transporte utilizado para el kit. Todas las muestras resultaron negativas al aislamiento. En nuestro estudio, se utilizaron cultivos de la línea celular de fibroblastos de ratón L929 que fueron infectados con muestras de hisopos vaginales, leche y calostro. Además, el calostro y la leche al momento de la recolección se colocaron en medio SPG, mientras se trasladaban al laboratorio a 4 ° C y luego se congelaban a -80 ° C, situación que podría favorecer la viabilidad de la bacteria. Antes de inocular la leche en los cultivos celulares, se calentaron a 37 °C durante 30 min para favorecer la disolución de las grasas, pero las muestras de calostro no se centrifugaron para separar la fracción grasa; bajo este procedimiento, los aislados de *Chlamydia* spp. se obtuvieron en 19 muestras de calostro y 14 de leche infectando cultivos celulares que fueron positivos para IFD.

Se han hecho diversos estudios en los que se ha tratado de identificar mediante el uso de diferentes técnicas moleculares e inmunológicas como la PCR e IHQ la presencia de Chlamydiae en muestras de semen y órganos del aparato reproductor de carneros, resultando negativas todas las muestras bajo estudio para ambas técnicas. Teankum *et al.*, (2007) realizaron un análisis con técnicas moleculares e inmunológicas con semen y órganos de aparato reproductor de ovinos y bovinos en los que obtuvieron resultados negativos para el caso de los órganos reproductivos en ambas técnicas; en este estudio, se obtuvieron muestras positivas tanto a semen como a diferentes órganos del tracto reproductor de sementales con pruebas de IHQ y qPCR; la diferencia en ambos estudios puede radicar en el tipo de PCR utilizadas, ya que la qPCR utilizada en este estudio fue más sensible, pues es capaz de identificar hasta dos Unidades

Formadoras de Inclusión (UFI) por cada reacción (Pantchev *et al.*, 2009). Otros factores que pueden verse involucrados en los resultados para ambos casos son la presencia de inhibidores en las muestras tanto de semen como de órganos del aparato reproductor masculino. Los inhibidores de la PCR son obstáculos químicos o físicos que bloquean la amplificación y fallan en la reacción de PCR. Los contaminantes en la muestra, el ADN o en las soluciones amortiguadoras utilizadas en la reacción de PCR son algunos de los inhibidores comunes de la PCR (Sidstedt *et al.*, 2020).

El otro factor que pudo influir en la obtención de resultados positivos es la conservación de muestras. Teankum *et al.*, 2007 determinaron que la sensibilidad de su PCR fue más alta cuando trabajaron con muestras crioconservadas que cuando lo hicieron con semen fresco. En este estudio, las muestras en general fueron trabajadas después de haber sido congeladas y conservadas con medio SPG a -80 °C (Pantchev *et al.* 2009).

Las lesiones encontradas a la necropsia en los testículos y epidídimo de aparato reproductor de sementales pueden estar asociadas a diferentes factores como la edad de los animales o bien a otros agentes etiológicos como *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, mismos que fueron descartados en el presente estudio mediante el uso de técnicas serológicas y moleculares (Gutiérrez *et al.*, 2015; Moustacas *et al.*, 2014; Elderbrook *et al.*, 2019); sin embargo, tampoco pueden ser atribuibles a la presencia de *C. abortus* debido a la edad en la que fueron sacrificados los animales.

En el presente estudio se detectó ADN clamidial en diferentes órganos del tracto reproductor de carneros tal es el caso de conducto deferente, prepucio, testículos, vesículas seminales, hígado y linfonodos.

En dos de los cuatro sementales, se localizó a *C. abortus* en al menos un linfonodo; Papp *et al.*, 1993 y Kerr *et al.*, 2005, sugieren que después de la infección inicial, la bacteria reside primero en la amígdala, desde donde se disemina por sangre y linfa a otros órganos, pudiendo residir en tejido linfoide

durante la fase latente de la infección, situación que favorece la permanencia de la bacteria en el organismo del animal.

El testículo de los mamíferos está compuesto por dos compartimentos principales, el intersticio y los túbulos seminíferos, se han detectado virus en ambos compartimentos, tanto en humanos como en otros mamíferos (Dejuqc *et al.*, 2001). En este estudio, se detectó ADN de *C. abortus* en al menos uno de los animales, sin embargo, no fue posible determinar mediante la técnica de IHQ el sitio preciso en el cual se encontraba dicho antígeno.

Las glándulas anexas del aparato reproductor del carnero producen la mayor parte del plasma seminal y dan fluidez, volumen y movilidad al eyaculado; las vesículas seminales producen aproximadamente el 60 % del volumen del líquido seminal que proporciona nutrición y protección espermática, ayudando también al desplazamiento de los espermatozoides. El plasma seminal de los mamíferos es un modulador clave en la funcionalidad de los espermatozoides; ciertas modificaciones de los espermatozoides por criolesiones que se pueden prevenir mediante la adición de plasma seminal, protegiendo y reparando el daño de la membrana del espermatozoide de carnero inducido por el choque frío o el tratamiento por detergente (Elderbrook *et al.*, 2019). En general, la secreción de las vesículas seminales es un material viscoso blanco amarillento con abundante fructosa que sirve de sustrato metabólico proporcionando hidratos de carbono, principal fuente de energía de los espermatozoides junto con otros sacáridos, aminoácidos, prostaglandinas, etc. En este estudio se detectó la presencia de ADN de *C. abortus* en vesículas seminales, además, de ser detectado el antígeno clamidial mediante la técnica de IHQ en dichas glándulas secretoras, situación que se explica debido a las características del plasma seminal, mismas que además de ser un importante aporte de nutrientes para los espermatozoides, podría resultar en una potencial fuente energética para la permanencia y mantenimiento del microorganismo en dichas glándulas (Duvos *et al.*, 2017; Díaz *et al.*, 2015; Rangel *et al.*, 2018).

Con relación al menor número de resultados positivos obtenidos por qPCR, la diferencia podría deberse a los cebadores utilizados, que no se hibridan para

otras especies de clamidia reconocidas por IFD. Pantchev y col. (2009), determinaron la sensibilidad mediante diluciones decimales de ADN purificado de cultivo celular, que contenía números definidos de UFI de *C. psittaci* y *C. abortus*, pudiendo detectar hasta dos UFI de cada patógeno por mezcla de reacción en qPCR, situación que lo hace muy sensible y específico (Pantchev *et al.*, 2009).

Conclusiones

Se demostró la eliminación de *C. abortus* en muestras de calostro y leche, así como la presencia de *C. abortus* en diferentes tejidos del tracto reproductor de carneros.

La bacteria en leche y calostro podría ser un importante factor de riesgo si la cantidad excretada es suficiente para infectar corderos que se han alimentado con estas secreciones al nacimiento.

Se evidenció la presencia de *C. abortus* en leche durante los primeros días posparto y hasta los 30 días, lo que puede favorecer la diseminación y permanencia de la infección en el rebaño

Se señaló la presencia de *C. abortus* en diferentes tejidos del tracto reproductor de carneros y semen, lo que podría favorecer la permanencia de la infección en los rebaños, no obstante, es necesario realizar estudios que determinen si la cantidad excretada en semen es suficiente como para producir infección en animales susceptibles, así como los mecanismos que regulan la excreción de la bacteria en semen.

Referencias

Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos de enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. 29-Nov-2018.

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018

Amin SA. Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for the detection of *Chlamydophila* species in the semen of bulls, buffalo-bulls and rams. *The Veterinary Journal* 2002; 166:86-92.

Brade L, Schramek S, Schade U, Brade H. Chemical, Biological and Immunochemical Properties of the *Chlamydia psittaci* Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 1986; 54:2. 568-574.

Brown J, Entrican. Interferon- γ Mediates Long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection *In vitro*. *J. Comp. Path* 1996; 115:373-383.

Buendía AJ, Cuello F, Del Río L, Gallego MC, Caro MR, Salinas J. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Veterinary Microbiology* 2002; 78: 229-239.

Buxton D, Rae AG, Maley SW, Thomsom KM, Livingstone M, Jones GE, Herring AJ. Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. *Comp. Path* 1996; 114:221-230.

Buxton D. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec* 1986; 118: 510-511.

Caro MR, Buendía AJ, Del Río L, Ortega N, Gallego MC, Cuello F, Navarro JA, Sanchez J, Salinas J. *Chlamydophila abortus* infection in the mouse: A useful model of the ovine disease. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 103-111.

Castro N, Capote J, Bruckmaier RM, Argüello A. Management effects on colostrogenesis in small ruminants: a review. *Journal of Applied Animal Research*. 2011; 2:39. 85–93.

Center for Food Security and Public Health. College for Food Security. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. OIE. Zoonotic Chlamydiae from mammals. Chlamydiosis. 2005.

Del Río L, Cremades BM, Navarro JA, Buendía AJ, Cuello F, Ortega N, Gallegos MC, Salinas J, Caro MR. IFN- γ expression in placenta is associated to resistance to *Chlamydia abortus* after intragastric infection. *Microbial Pathogenesis* 2013; 56: 1-7.

Dejucq N., Jégou B., Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001; 65:2. 208-231.

Díaz VH., Espinoza BJ., Huanca LW., Lopez TB., Rodríguez GJ. Características Bioquímicas de Plasma seminal fresco y congelado/descongelado del Alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(1):43-48.

Duvos SJI., Fernández AF., Lluberas PJC. Selección de carneros Merino australiano, para su utilización en programas de reproducción, suplementando con Selenio e incorporando nuevas metodologías en el análisis de semen. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay, 2017.

Eckert T., Goericke-Pesch S., Heydel C., Bergmann M., Kauffold J., Failing K., Wehrend A. Interaction of different *Chlamydiae* species with bovine spermatozoa. *BMC Microbiology* 2019; 19:23.

Elderbrook M., Schumaker B., Cornish T., Peck D., Sondgeroth K., Seroprevalence and risk factors of *Brucella ovis* in domestic sheep in Wyoming, USA. *BMC Veterinary Research*. 2019; 15:246.

Elwell C., Mirrashidi K. and Engel J. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. Nat. Rev. Microbiol. 2016; 14(6):385–400.

Escalante OC, Díaz AE, Segundo ZC, Suárez GF. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in México: First Report. Rev Lat-Amer Microbiol 1997; 39: 117-121.

Escalante OC, Ducatelle, R, Haesebrouck F. The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? FEMS Microbiology Reviews 1998; 22: 65-78.

Entrican G, Wattegedera S, Chui M, Oemar L, Rocchi M, McInnes C. Gamma Interferon Fails To induce Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Does Not Control the Growth of *Chlamydomphila abortus* in Bewo Trophoblast Cells. Infection and Immunity. 2002; 70:5. 2690-2693.

Entrican G, Wattegedera S, Rocchi MS, Wheelhouse N. Pregnancy, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and chlamydial abortion: An unresolved paradox. Veterinary Microbiology 2009;135: 98-102.

Entrican G, Wheelhouse N, Wattegedera SR, Longbottom. New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2012; 35: 271-276.

García FJN. Vacunas inactivadas frente al aborto enzoótico de los pequeños rumiantes: Análisis de la protección inducida por vacunas comerciales y de nuevo diseño en un modelo ovino. Tesis Doctoral. 2003. Universidad de León, España: Facultad de Veterinaria.

Gutiérrez HJL., Garrido FGI., Acosta DJP., Díaz AE., Twnorio GVR., Tórtora P JL. Diagnóstico Serológico, histopatológico y molecular de epididimitis ovina en carneros de Zacatecas, México. Quehacer Científico en Chiapas 2015; 10 (2).

Hatch TP, Miceli M, Sublet JE. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the development cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. J. Bacteriol 1986; 165: 379-385.

Henderson RI, Navarro GF, Desvaux M, Fernández CR, Ala'Alden D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004; 692-744.

Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial Persistence: beyond the Biphasic Paradigm. *Infection and Immunity* 2004; 1843-1855.

Kadra B, Balla E. Development and production of vaccines against abortion caused by *Chlamydomphila abortus* and *Coxiella burnetii* in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2006; 62: 75-78.

Karin DE y Everett KD. Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Veterinary Microbiology* 2000; 75:109-126.

Kerr K., Entrican G., McKeever D. y Longbottom D. Immunopathology of *Chlamydomphila abortus* infection in sheep and mice. *Research Veterinary Science* 2005; 78: 1-7.

Kosma P. Chlamydial Lipopolysaccharide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 387-402.

Lazcano AC. Detección de *Chlamydomphila* spp en rebaños caprinos del Estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y asilamiento bacteriológico. Tesis de Licenciatura. 2006. México D.F. UNAM.

Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol* 2003; 128: 217–244.

Martínez C. Papel de las células NK y de los Linfocitos T en la respuesta inmune frente a *Chlamydomphila abortus* en modelo murino. Tesis Doctoral, 2006. Universidad de Murcia, España: Facultad de Veterinaria.

Marques PX, Souda P, O'Donovan J, Gutierrez J, Gutierrez EJ, Worrall S, McElroy M, Proctor A, Brady C, Sammin D, Basset HF, Whitelegge PJ, Markey EB, Ily EJ. Identification of Immunologically Relevant Proteins of *Chlamydomphila*

abortus Using Sera from Experimentally Infected Pregnant Ewes. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17:8.1274-1281.

Mora DJC, Escalante OC, Díaz AE, Jaimes VMS, Martínez SMG, Trujillo GB. Determinación serológica de *Chlamydophila abortus* en ganado caprino lechero en México. En: XXI Congreso Panamericanos de Ciencias Veterinarias Guadalajara (Jalisco) México; 2008.

Mora DJC. Determinación de *Chlamydophila abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis. Tesis de Licenciatura. 2010. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*. *Microbiol Rev* 1991; 55:143-190.

Moustacas VS., Silva TMA., Costa LF., Carvalho Junior CA., Santos RI., Paixão TA., Clinical and Pathological changes in rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. *The Scientific World Journal* 2014. 2014:10

Nietfeld JC. Chlamydial infections in small ruminants. *Small Ruminant Medicine* 2001; 2: 301-314.

OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal). Clamidiosis ovina. En: Manual de pruebas de diagnóstico estandarizadas y vacunas. 4ed. París: OIE, 2000. Aprobado en 2004. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.4.07_Aborto_enzoótico_de_las_ovejas.pdf

Ortega N, Buendía AJ, Salinas J. Ensayo de vacunas inactivadas experimentales contra el aborto enzoótico ovino utilizando ratones resistentes a la infección por *Chlamydophila abortus*. *An. Vet. Murcia* 2003; 19:109-120.

Ortega N. Diseño de vacunas inactivadas contra el aborto enzoótico ovino: Análisis de la protección inducida en un modelo murino. Tesis Doctoral. 2005. Universidad de Murcia, España: Facultad de Veterinaria.

Pantchev A., Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. The Veterinary Journal 2009; 181:145–150.

Papp, JR. Shewen PE. Gartley CJ. 1993. Chlamydia psittaci infection and associated infertility in sheep. Canadian Journal of Veterinary Research 1993; 57, 185-189.

Papp RJ, Shewen PE, Gartley CJ. Abortion and Subsequent Excretion of Chlamidiae from the Reproductive Trac of Sheep during Estrus. Infect and Immunity 1994; 62:9. 3786-3792.

Pérez M, San Miguel L, Serrahima L, Lozano P, Reyes M, Doménech J, Ballesta F, Redondo M. Animal Breeding Manual. Lexus Editores, Edition. Barcelona, Spain. 2012. Pp. 591.

Pospischil A. Enzootic abortion in ewes: A review of recent developments in diagnostics. Small Ruminant Research 2006; 62:113-115.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maghire D. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 2nd Ed. Great Britain: Blackwell, Science 2002; 196-202.

Rake G, Jones HP. Studies on lymphogranuloma venereum. I. Development of the agent in the yolk sac of the chicken embryo. J. Exp. Med 1942; 75 :323-338.

Rangel PL., Hernández MJH., Fisiología reproductiva de los animales domésticos, 1^a Edición. 2018. FMVZ, UNAM. IS13N:978-607-30-0652. 30-31.

Rocchi MS, Wattegedera S, Meridiani I, Entrican G. Protective adaptative immunity to *Chlamydophila abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). Veterinary Microbiology 2009; 135: 112-121.

Rodolakis A, Salinas J, Papp J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res* 1998; 29: 275-288.

Rodolakis A. y Mohamad YK. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology* 2010; 140: 382–391.

Rodolakis, A.Laroucau, K. *hlamydiacea* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology* 2015; 181:107–118.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (2nd Edition), Volumes 1, 2 and 3. 1625 S., Zahlreiche Abb. Und Tab. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; ISBN: 0-87969-309-6.

Saunders VF, Reddacliff LA, Berg T, Hornitzky M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Austr Vet J* 2007; 85:72–77.

Schoborg RV. Chlamydia persistence- a tool to dissect Chlamydia- host interactions. *Review. Microbes and Infection* 2011; 13: 649-662.

Siarkou VI, Vorimore F., Vicari N., Magnino S., Rodolakis A., Pannekoek Y., Sachse K., Longbottom D., Laroucau K. Diversification y Distribution of Ruminant *Chlamydia abortus* Clones Assessed by MLST and MLVA. *PLoS ONE*, 2015; 10 (5): e0126433.

Sidstedt M., Rådström P., Hedman J., PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020, 412:2009-2023.

Soriano VE, Jiménez EJM, Salgado MC, López HM, Escobedo GMR, Guerra IFM. Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *REDVET* 2011; 10:11.

Stamp JT, McEwen AD, Watt JAA, Nisbet UD. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec* 1950; 62: 251-254.

Stuen S, Longbottom D. Treatment and control of Chlamydial and Rickettsial infections in sheep and goats. *Vet. Clin. Food Animal* 2011; 27: 213–223.

Teankum K., Pospischil A., Janett F. Brugnera E., Hoelzle L.E., Hoelzle k., Weilenmann R., Zimmermann D.R., Gerber A., Polkinghorne A., Borel N. Prevalence of *Chlamydiae* in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology* 2007; 67:303-310.

Thomas RH, Davison C, Wilsmore AJ. Use of the IDEIA ELISA to detect *Chlamydia psittaci (ovis)* in material from aborted fetal membranes and milk from ewes affected by ovine enzootic abortion. *Br. Vrt. J* 1990; 146:364–367.

Villegas E, Solórzano A, Camacho A, Gutiérrez José. *Chlamydophila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 (10): 629-37.

Vorimore F., Hsia R-H., Creasy HH., Bastian S., Deruyter L., Passet A., Sachse K., Bavoil P., Myers G. y Laroucau K. Isolation of a new *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLOS ONE* 2013; 8: (9). e74823.

Wattegedera S, Rocchi M, Hope J, Entrican G. The effect of pregnancy on maternal immunity in sheep. *Abstracts/ Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; 128:1-3.

Wheelhouse N, Sait M, Wilson K, Aitchison K, McLean K, Smith GED, Longbottom D. Expression patterns of five polymorphic membrane proteins during *Chlamydia abortus* developmental cycle. *Veterinary Microbiology*. 2012; 7(11): e49190

Zhang LI, Douglas AL, Hatch PT. Characterization of a *Chlamydia psittaci* DNA Binding Protein (EUO) Synthesized during the Early and Middle Phases of the Developmental Cycle. *Infection and Immunity* 1998; 66:3. 1167-1173.