

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DETERMINACIÓN DE *Chlamydophila abortus* EN REBAÑOS CAPRINOS
LECHEROS DE GUANAJUATO, MÉXICO, CON CASOS DE ABORTO
SUGERENTES DE CLAMIDIOSIS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JUAN CARLOS MORA DÍAZ

ASESORES:

DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO
DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis papas y a mis hermanas. Sin su apoyo no podría haber realizado este trabajo. Estoy eternamente agradecido con mis padres por haberme brindado una muy buena educación y por siempre estar apoyándome.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efrén Díaz por la oportunidad que me dio de realizar este trabajo y por todo el apoyo que recibí durante la tesis.

A la Dra. Beatriz Arellano por toda la ayuda que me brindó y por todo lo que aprendí de ella.

A Susana Jaimes por siempre tener un poco de tiempo para ayudarme con todas las dudas que me surgieron en el camino. Gracias por ser mi maestra desde que entré al laboratorio.

A la Dra. Cristina Escalante por invitarme a trabajar en su laboratorio y enseñarme todo sobre la bacteria. También por tenerme la confianza y darme la libertad de trabajar.

A Enrique Herrera por brindarme el contacto con los productores caprinos y por todo lo que aprendí durante los viajes a Guanajuato.

Estoy muy agradecido con los propietarios de las granjas en donde se realizó este estudio, por permitirme hacer el muestreo en sus granjas y por el tiempo que me proporcionaron para las entrevistas y para cualquier duda que me surgía.

También me gustaría agradecerle a todos los integrantes del Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis por el apoyo y los consejos que me dieron durante mi estancia en el laboratorio. Especialmente me gustaría agradecer a Yuliett y Jorge Alva por todo lo que me enseñaron. Y por supuesto a Pablo Vera por toda su ayuda.

Al Dr. Suarez Güemes por estar al tanto de mi investigación y por todo el apoyo recibido durante la RNIP.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por todos los consejos que me proporcionó cuando mis células no crecían como quería y por permitirme trabajar en el microscopio de inmunofluorescencia de su laboratorio.

A María Cristina Rodríguez Sánchez y a Verónica Rojas por proporcionarme bacterias que afectan a cabras y así poder realizar la especificidad del PCR en este estudio.

A la Dra. Carolina Segundo Zaragoza y a los muchachos del Laboratorio de Micología por permitirme utilizar su lector de ELISA y por ayudarme cuando tenía dudas.

Al Laboratorio de Microbiología Molecular por permitirme usar su fotodocumentador.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme ser parte de esta gran institución, por la oportunidad que me dio de desarrollarme profesionalmente. Siempre estaré agradecido y pondré en alto el nombre de la FMVZ y de la UNAM.

Y a la Escuela Nacional Preparatoria plantel 6 “Antonio Caso” por sembrarme la inquietud de dedicarme a la investigación, me dio las herramientas necesarias para rápidamente entrar a un laboratorio de investigación y poder llegar a este trabajo.

También me gustaría agradecer a todos los maestros que he tenido durante toda mi vida escolar, que con todo lo que me enseñaron me dieron **la libertad** de pensar por mi mismo y de ser una mejor persona, con la capacidad de proporcionar estos conocimientos en beneficio de México.

A todos mis familiares y a todas aquellas personas que han tenido que ver en algo con mi educación, ya sea una maqueta, un consejo, regalarme un libro, ayudarme con las matemáticas, etc.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme una beca durante los primeros 6 meses de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por SAGARPA-CONACYT.

PROYECTO: Estudio epidemiológico de enfermedades que afectan la producción caprina en México.

- No. de Proyecto: 48599.
- Responsable: Dr. Efrén Díaz Aparicio.

"La principal y más poderosa rémora que detiene a nuestro país en el camino del engrandecimiento es la ignorancia; la falta de ilustración de nuestro pueblo es la que lo convierte en pasivo e inconsciente instrumento de los intransigentes y parlanchines que lo explotan sin cesar, haciéndolo a la vez, víctima y verdugo de sí mismo"

Gabino Barreda

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Transmisión.....	4
1.3 Patogenia.....	5
1.4 Signos clínicos y lesiones.....	6
1.5 <i>Chlamydomphila abortus</i>	8
1.6 Diagnóstico.....	11
1.7 Situación de la caprinocultura	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
5.1 Población.....	17
5.2 Obtención de datos.....	17
5.3 Muestras clínicas para la detección de anticuerpos contra <i>Chlamydomphila abortus</i> y <i>Brucella</i> sp.....	18
5.3.1 Suero.....	18
5.3.2 Procesamiento.....	18

5.4 Muestras clínicas para el aislamiento e identificación de <i>Chlamydomphila abortus</i>	18
5.4.1 Exudado vaginal.....	18
5.4.2 Procesamiento.....	19
5.5 Pruebas serológicas.....	19
5.5.1 Detección de anticuerpos contra <i>Chlamydomphila abortus</i> por ELISA.....	19
5.5.2 Prueba de tarjeta al 3%, para el diagnóstico de brucelosis.....	20
5.6 Aislamiento e identificación de <i>Chlamydomphila abortus</i>	20
5.6.1 Preparación de células para la detección por Inmunofluorescencia.....	21
5.6.2 Proceso de infección.....	21
5.6.3 Técnica de inmunofluorescencia directa.....	22
5.7 Identificación de <i>Chlamydomphila abortus</i> mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
5.7.1 Estandarización de PCR a partir de cultivo celular infectado con <i>Chlamydomphila abortus</i>	24
5.7.1.1 Extracción de ADN.....	24
5.7.1.2 Iniciadores.....	25
5.7.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
5.7.1.4 Sensibilidad y especificidad.....	27
5.7.2 Estandarización de PCR para la identificación de <i>Chlamydomphila abortus</i>	28
5.7.2.1 Extracción de ADN.....	28
5.8 Análisis estadístico.....	30
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Resultado de la prueba de tarjeta al 3%	32
6.2 Resultados de la detección de anticuerpos contra <i>Chlamydomphila abortus</i> por ELISA	32

6.3 Resultados del aislamiento de <i>Chlamydophila abortus</i> mediante la técnica de inmunofluorescencia.....	33
6.4 Estandarización de PCR a partir de cultivo celular infectado con <i>Chlamydophila abortus</i>	34
6.4.1 Sensibilidad de PCR a partir de cultivo celular infectado.....	35
6.4.2 Especificidad de PCR a partir de cultivo celular infectado.....	36
6.5 Estandarización de PCR en muestras de hisopo vaginal.....	38
6.5.1 Extracción de ADN de muestras de exudado vaginal.....	38
6.6 Resultados de la identificación de <i>Chlamydophila abortus</i> mediante PCR.....	39
6.6.1 PCR con iniciadores del Gen 16S RNAr.....	39
6.6.2 PCR con iniciadores del Gen <i>pomp</i> 90-91B.....	40
6.7 Comparación de resultados entre PCR, aislamiento y ELISA.....	42
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES.....	49
9. REFERENCIAS.....	51
10. ANEXOS.....	55
10.1 Anexo I.....	55
10.2 Anexo II.....	61

RESUMEN

MORA DÍAZ JUAN CARLOS. Determinación de *Chlamydophila abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis (bajo la dirección de: Dra. Beatriz Arellano Reynoso y Dr. Efrén Díaz Aparicio).

Chlamydophila abortus es la bacteria causante del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), la cual todavía es considerada exótica en México. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *C. abortus* en el estado de Guanajuato. Se tomaron muestras serológicas y de exudado vaginal de seis rebaños caprinos lecheros con historial de abortos. Se utilizó ELISA, aislamiento de la bacteria y PCR para diagnosticar el AEPR. Con la ELISA se encontró una seropositividad del 9.60% a *C. abortus*. Se obtuvo el aislamiento de la bacteria del 26.98% de las cabras muestreadas. Se logró la estandarización de la PCR en cultivo celular infectado, con los iniciadores del gen 16S RNAr y *pomp* 90-91B. Con ambos se obtuvo una sensibilidad de hasta 2.5 ng de ADN de *C. abortus* y no amplificó ADN de otras bacterias que producen abortos en cabras. Adicionalmente, se logró la estandarización de la prueba de PCR a partir de muestras de exudado vaginal. Cuando se usaron los iniciadores del gen 16S RNAr, el PCR tuvo una sensibilidad del 70.58% y una especificidad del 93.47%. El PCR del gen *pomp* 90-91B tuvo una sensibilidad del 17.64% y una especificidad del 96.73%. El iniciador 16S RNAr es una mejor opción para el diagnóstico del AEPR. Se llegó a la conclusión que la bacteria se encuentra presente en rebaños caprinos lecheros del estado de Guanajuato y que la PCR es una buena opción de diagnóstico, por el tiempo reducido para obtener un resultado y por su precisión.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) es una enfermedad infecciosa, que produce abortos en el último tercio de la gestación o el nacimiento de crías débiles que generalmente mueren durante los primeros días de vida, es causada por *Chlamydia abortus* y afecta a ovinos, caprinos y bovinos ^(1,2).

El primer reporte del AEPR se dio en 1936 en un rebaño de ovinos en Escocia por Greig, el cual sugería que los abortos eran el resultado de factores ambientales, como deficiencias nutricionales. A esta enfermedad se le llamó aborto enzoótico de los ovinos (AEO), pero fue hasta 1950 que Stamp *et al.* demostraron que era una enfermedad infecciosa causada por un microorganismo del grupo linfogranuloma venéreo psitacoso ^(3,4).

Para 1966 se demostró que *Chlamydiae* no era un virus sino una bacteria, ya que posee RNA y DNA, tiene un ciclo de desarrollo muy diferente al de los virus, su pared celular es similar a bacterias Gram negativas y posee ribosomas con susceptibilidad a antibióticos, un rasgo característico de las procariontes ⁽³⁾.

En estos años *Chlamydiae* fue diferenciada en dos especies: *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci*, quedando el AEO en este último grupo ⁽⁴⁾.

En 1999 la familia Chlamydiaceae fue reclasificada en dos nuevos géneros y nueve especies en base a un análisis secuencial de sus genes rRNA 16S y 23S

(Everett *et al.*). Los dos nuevos géneros fueron *Chlamydia* y *Chlamydophila* ^(1,3,4)

(Cuadro 1).

<i>Chlamydia</i>		<i>Chlamydophila</i>	
<i>C. trachomatis</i>	Humanos	<i>C. psittaci</i>	Aves
<i>C. suis</i>	Porcinos	<i>C. felis</i>	Gatos
<i>C. muridarum</i>	Ratones	<i>C. abortus</i>	Ovinos, Caprinos, Bovinos
		<i>C. caviae</i>	Cuyes
		<i>C. pecorum</i>	Ovinos, Bovinos
		<i>C. pneumoniae</i>	Humano

Cuadro 1. Clasificación de la familia Chlamydiaceae

En México la enfermedad es considerada exótica, por lo que se encuentra en el grupo 1 del Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Este grupo está compuesto por las enfermedades exóticas que no se encuentran en el territorio nacional y que por su riesgo a la salud pública son de notificación obligatoria ante las autoridades competentes de sanidad animal ⁽⁵⁾.

En México se han realizado diversos reportes de la enfermedad en pequeños rumiantes, en 1996 se realizó el aislamiento de la bacteria en rebaños ovinos de cinco estados del país ⁽⁶⁾ y en 1997 se realizó el primer reporte de la bacteria en caprinos ⁽⁷⁾. Posteriormente se realizaron estudios de esta enfermedad en caprinos, en 2005 se demostró la presencia de la bacteria en el estado de Michoacán en donde se logró el aislamiento de la bacteria en heces ⁽⁸⁾. En 2008 se llevó a cabo un estudio serológico en rebaños caprinos lecheros de seis estados del país, encontrando anticuerpos contra la bacteria ⁽⁹⁾.

En 2001 se demostró la participación *Chlamydophila* spp en un proceso zoonótico en México a partir de ganado caprino infectado con este agente ⁽¹⁰⁾.

1.2 Transmisión

Una vez que se da el parto o el aborto, un gran número de bacterias son expulsadas en descargas vaginales, en la placenta y en la piel de los cabritos abortados ^(1,2). Estos son los principales factores que contribuyen a la contaminación del ambiente (alimento, agua y suelo), provocando la transmisión oral o por aerosoles a otros animales, así como a los humanos ⁽¹⁾. Cantidades menores de la bacteria pueden ser eliminadas por orina, leche y heces durante varios días después del aborto ⁽²⁾.

Las descargas vaginales se secan después de 7 – 14 días y el futuro potencial reproductivo del animal no se ve afectado, una vez que la cabra aborta como consecuencia de esta enfermedad no vuelve a abortar ⁽¹⁾. Aunque esta inmunidad no es completa ya que algunos animales, pueden excretar el microorganismo en su siguiente estro y parto ⁽¹⁾.

Las cabras con menos de 100 días de gestación son más susceptibles que aquellas que están al final de la gestación o de las que no están gestantes ⁽²⁾.

Las cabras pueden empezar a infectarse a cualquier edad y durante cualquier temporada, pero el periodo de riesgo más importante es durante la época de partos. Hay poca evidencia que sugiera que AEPR pueda ser transmitida por vía venérea ⁽¹⁾.

Cabras jóvenes nacidas de madres infectadas pueden mantener la infección en el rebaño o transmitirlo a otros ⁽²⁾.

En un rebaño donde no se ha presentado la enfermedad, la tasa de abortos en el primer año posterior a la introducción de reemplazos infectados suele ser baja. Sin embargo, en los siguientes 2 ó 3 años la tasa de abortos es alta; frecuentemente 30% hasta un 90% de las cabras gestantes abortan y la producción de leche disminuye. En los años posteriores la enfermedad tiene una incidencia anual de aborto de 5 a 10%, esto sucede por 2 ó 3 años hasta que ocurre de nuevo un brote, siendo afectadas la hembras primíparas ^(1,2,11).

1.3 Patogenia

Estudios realizados en la especie ovina indican a las tonsilas como el sitio primario de infección y multiplicación de la bacteria, de donde es diseminada por sangre o linfa a órganos de colonización secundaria como el hígado, bazo y pulmón, en los que permanece en estado latente ^(12,13).

En hembras no gestantes se establece una infección latente, posiblemente en tejido linfoide, en un proceso que es mediado por citocinas, particularmente INF γ ⁽¹⁾. Durante este tiempo el organismo es indetectable a cualquier prueba diagnóstica, incluyendo serología ⁽⁴⁾. En la siguiente gestación la modulación inmune libera a la bacteria de su estado de supresión permitiendo su multiplicación en los órganos de colonización secundaria, provocando una segunda bacteremia que inicia con la infección de la placenta ^(1,14).

Alrededor del día 60 de gestación se desarrollan hematomas maternos en la interfase materno-fetal en los hilos de cada placentoma. Se presume que estos hematomas podrían ser el microambiente donde las clamidias presentes en sangre materna entren en contacto directo con el epitelio coriónico, transmitiendo la infección de la madre al feto, aunque hasta el día 90 se observan los cambios patológicos debido al crecimiento excesivo de la bacteria, provocando el aborto en las últimas semanas de la gestación^(3,4,15).

1.4 Signos clínicos y lesiones

Esta enfermedad se caracteriza por provocar abortos en el último tercio de la gestación o el nacimiento de crías débiles, las cuales mueren dentro de las primeras horas de vida, aún cuando estas reciban cuidados médicos^(1,4).

El aborto ocurre generalmente sin una signología previa, aunque se pueden presentar cambios de comportamiento y descargas vaginales 48 horas previas al aborto^(1,4).

El aborto ocurre principalmente en los últimos dos meses de la gestación y especialmente en las últimas dos semanas⁽¹⁶⁾.

En rebaños donde la enfermedad es endémica las cabras primíparas son las más susceptibles. Sin embargo, si la enfermedad es nueva en el rebaño los abortos ocurren en cabras de todas las edades⁽¹⁶⁾.

Los animales abortados pueden tener una apariencia normal o mostrar un grado de edema subcutáneo, dándoles una apariencia de “cerdito”. No hay lesiones macroscópicas específicas y el cabrito puede estar cubierto de un material de color café. Además del edema difuso, también se observa fluidos sanguinolentos en la cavidad abdominal y pleural, así como petequias en la lengua, cavidad bucal y en las pezuñas ^(1,2).

Las membranas placentarias se presentan engrosadas y con un color rojizo amarillento, también se puede observar un exudado vaginal infeccioso de color rosa sucio durante 7 a 10 días después del aborto.

En las cabras y en los bovinos se observa una frecuencia mayor de retención placentaria, endometritis y vaginitis, aunque esto no es usual ^(1,2).

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes es una zoonosis, se ha descrito que afecta a las mujeres embarazadas principalmente después de la exposición con cabras y borregos infectados durante la temporada de partos. *Chlamydophila abortus* tiene la habilidad de colonizar la placenta humana. La transmisión de la enfermedad a humanos se ha reportado en el Reino Unido, Francia, Estados Unidos, Holanda y Suiza. Si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo se presentan abortos espontáneos y si la infección ocurre después causa mortinatos y labor prematura. La infección en mujeres también puede provocar falla renal, disfunción hepática, coagulación intravascular diseminada y podría provocar la muerte ^(1,4,17).

1.5 *Chlamydophila abortus*

Los miembros de la familia Chlamydiaceae son bacterias intracelulares obligadas, que se replican dentro de vacuolas en el citoplasma de células eucariotas (formando inclusiones intracitoplasmáticas) (**Figura 1**), como son células epiteliales de mucosas conjuntival, genital y de tracto intestinal y en células del sistema retículo endotelial^(16,18,19).

La bacteria es considerada Gram negativa pero estudios bioquímicos demuestran que la pared celular carece de peptidoglicano. Tiene una membrana externa trilaminar la cual consiste de proteínas y lipopolisacáridos. Las proteínas le confieren especificidad y pueden actuar como adhesinas y los lipopolisacáridos los cuales tienen propiedades endotóxicas son específicos de la familia Chlamydiaceae. El genoma es el más pequeño entre los procariontes^(18,20).

Esta familia adquirió un ciclo de desarrollo bifásico único, caracterizado por dos estructuras morfológicas distintas, el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR); también se pueden encontrar formas intermedias^(1,3).

El cuerpo elemental es la forma infectiva de la bacteria y está adaptado para sobrevivir fuera de la célula, tiene un diámetro de 200 – 300 nm. El cuerpo reticular es la forma multiplicativa y se va a encontrar en las inclusiones intracitoplasmáticas, tiene un diámetro que va de los 500 a 1000 nm y va ser la de mayor presencia durante todo el desarrollo^(1,3).

El ciclo de desarrollo consta de 5 fases:

- Unión y penetración del CE a una célula huésped susceptible.

La penetración a la célula eucariota ocurre por endocitosis mediada por receptores. El CE entra en endosomas (inclusión intracitoplasmática) y es ahí mismo donde permanece durante el ciclo completo.

- Conversión del CE en CR.

Después de un proceso de reorganización estructural que dura algunas horas dentro de la inclusión intracitoplasmática se da la conversión del CE en CR. Durante este proceso evita ser destruida por parte de la célula.

- Crecimiento y replicación de CR.

El CR se multiplica mediante una fisión binaria, esto lo realiza utilizando los componentes celulares. A medida que los cuerpos reticulares se van multiplicando la inclusión intracitoplasmática rápidamente se llena y aumenta su tamaño.

- Reorganización del CR a CE.

Después de 24 a 48 horas (dependiendo de cada especie) el CR se transforma de nuevo en el infeccioso y metabólicamente inactivo CE.

- Liberación de CE de la célula huésped.

La célula se lisa liberando la nueva progenie de CE, las cuales van a infectar células susceptibles vecinas. También se liberan CR y cuerpos intermedios^(1,3,20) **(Figura 2)**.

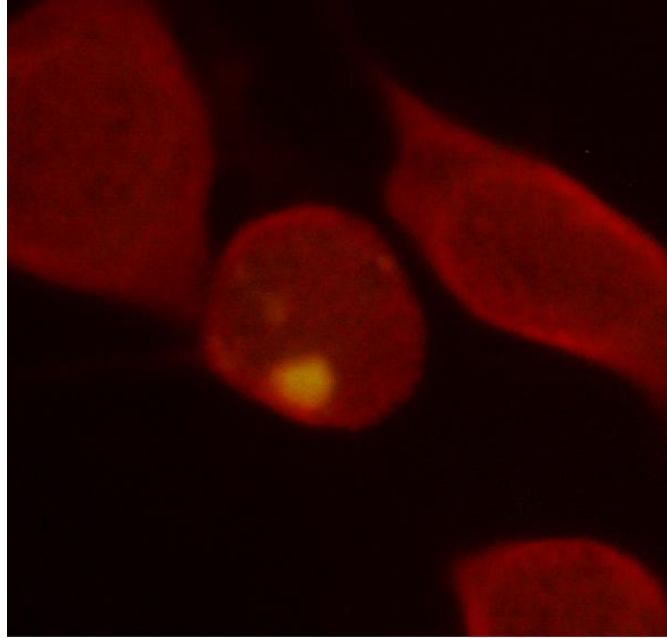


Figura 1. Inclusión intracitoplasmática causada por *Chlamydomphila abortus* en célula de fibroblasto de ratón L929.

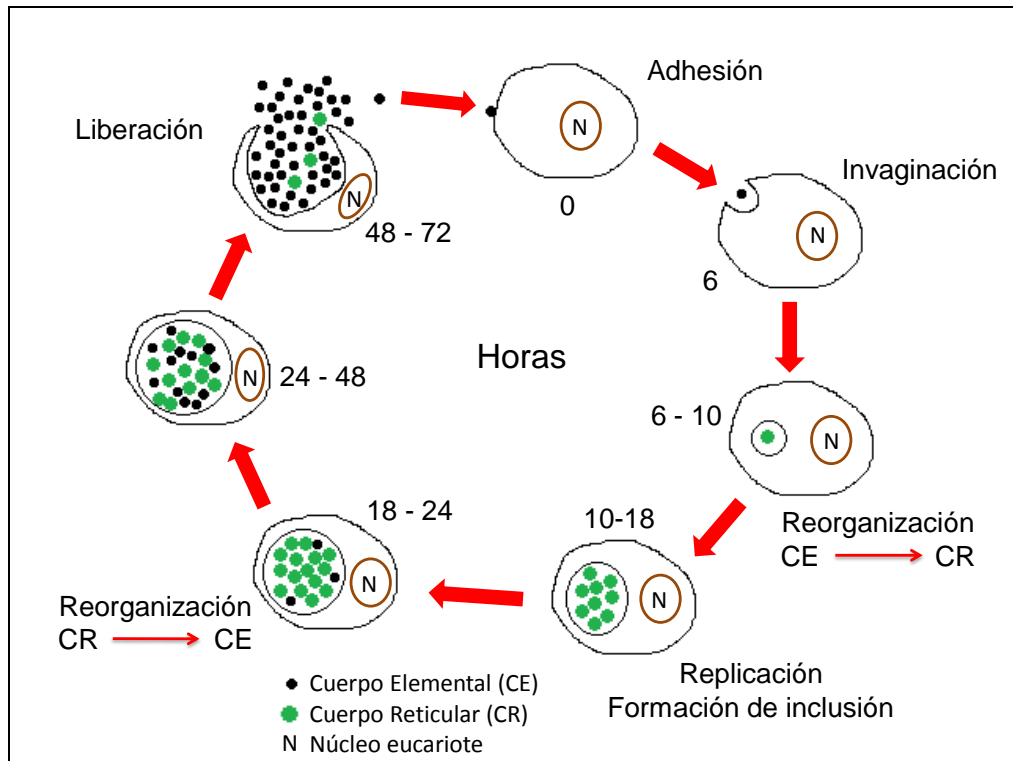


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *Chlamydomphila abortus*

1.6 Diagnóstico

Para diagnosticar el aborto enzoótico de los pequeños rumiantes hay esencialmente dos propuestas, la primera involucra la detección directa del agente en tejidos o muestras de exudado, mientras que la segunda es la determinación indirecta que tiene como objetivo conocer si hay presencia de anticuerpos anti-clamidiales en suero ⁽²¹⁾.

Un diagnóstico temprano y preciso de la causa del aborto es de importancia crítica para adoptar medidas de control adecuadas para limitar o prevenir la diseminación de la infección ⁽¹⁾.

La presencia de abortos dos a tres semanas antes del parto esperado, junto con membranas placentarias inflamadas y necróticas puede ayudar a realizar un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, tomando en cuenta también la historia clínica del rebaño ⁽¹⁾. Sin embargo, un diagnóstico preciso requiere confirmación a través de pruebas diagnósticas de laboratorio, debido a que otros microorganismos también pueden ser causantes de aborto en caprinos como *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus ssp fetus* y *Toxoplasma gondii*, estas últimas tres pueden provocar además de lo citado lesiones en las membranas placentarias ^(16,18,21,22).

Chlamydophila abortus puede ser aislada de muestras de tejidos infectados como cotiledones, membranas intercotiledonarias, pulmón e hígado fetal, así como de exudado vaginal y heces^(1,21).

Las muestras son enviadas al laboratorio de diagnóstico en un medio de sucrosa-fosfato-glutamina (SPG), suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos como estreptomina y gentamicina, pero no penicilina. Este es un medio de transporte especial para la familia Chlamydiaceae⁽²³⁾.

Al ser una bacteria intracelular obligada, *C. abortus* requiere ser aislada y propagada en embrión de pollo o en cultivo celular. Por lo que el aislamiento es considerado la prueba de oro y el método más sensible para el diagnóstico de la infección clamidial^(21,24).

Chlamydophila abortus puede ser aislada en una variedad de líneas celulares, pero McCoy, HeLa, L929 y células de riñón de hámster neonato (BHK) son las más comúnmente utilizadas. La bacteria se puede detectar después del cultivo celular por la prueba de anticuerpo fluorescente^(1,18).

La bacteria también puede ser detectada en órganos y exudados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la ventaja de proporcionar una detección rápida y específica en muestras biológicas sin recurrir al cultivo celular. La mayoría de los PCR convencionales están enfocados al operón ribosomal RNA o al gen *ompA*, pero se debe tener en cuenta la posibilidad de la presencia de

inhibidores en las muestras, lo que podría causar resultados falsos negativos (1,21,24).

Después del aborto, los títulos de anticuerpos maternos contra *Chlamydophila abortus* aumentan, mismos que pueden ser medidos mediante la técnica de Fijación del Complemento (FC). Sin embargo, la reacción de antigenicidad cruzada entre *C. abortus* y *C. pecorum*, así como de otras bacterias Gram negativas pueden complicar la interpretación de resultados (1,24).

Existen pruebas serológicas más sensibles y específicas como el Ensayo Inmunoabsorbente de Unión de Enzimas (ELISA) basados en anticuerpos monoclonales específicos de *C. abortus* que reconoce regiones específicas de la proteína mayor de la membrana externa (MOMP) y fragmentos de proteína recombinante de la familia POMP (Proteína polimórfica de membrana externa) (1).

1.7 Situación de la caprinocultura

En México existen alrededor de 494,000 unidades de producción caprina y aproximadamente 1.5 millones de mexicanos tienen como actividad primaria o complementaria a la caprinocultura (25). Datos del 2008 indican que en el país hay aproximadamente 9 millones de cabras (26).

La caprinocultura en el estado de Guanajuato ha tomado un auge en los últimos años gracias al esfuerzo de productores que han implementado controles de calidad a través de investigación genética y tecnología de cría (27).

La leche caprina en el país se industrializa en la producción de queso, cajeta, dulces, cremas, etc.

En todo el territorio del estado de Guanajuato se encuentran distribuidos caprinos, siendo 566,598 cabezas de ganado en el 2008.

De acuerdo a datos preliminares del 2010 de la Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS) del estado de Guanajuato la producción de leche caprina hasta el mes de septiembre es de 18.44 millones de litros, ocupando el tercer lugar a nivel nacional ⁽²⁸⁾.

En 2009 el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP reportó que la producción nacional de leche caprina fue de 164 millones 756 miles de litros de leche, dando un valor de la producción de 693 millones 762 miles de pesos. El primer lugar en producción de leche caprina fue el estado de Coahuila con 58.18 millones de litros, el segundo Durango con 36.76 millones de litros de leche y el tercer lugar Guanajuato con 24.83 millones de litros. El estado de Guanajuato tuvo el 15% de participación en la producción de leche de cabra a nivel nacional y un valor de la producción de 121 millones 199 miles de pesos ⁽²⁹⁾.

2. JUSTIFICACIÓN

El estado de Guanajuato ocupa el tercer lugar a nivel nacional en la producción de leche caprina, una posible infección clamidial podría provocar circunstancias adversas a esta industria. Nuestro grupo de investigación ha trabajado constantemente con los productores caprinos de la región sur de Guanajuato. Dichos productores actualmente tienen problemas de abortos y han descartado varias enfermedades que pudieran causarlos. Uno de los diagnósticos presuntivos son las infecciones clamidiales. Por lo que la investigación de la causa de dichos problemas en esta región puede beneficiar en la toma de decisiones que ayuden a que el problema sea controlado de manera oportuna.

3. HIPOTESIS

Chlamydophila abortus se encuentra presente en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato ocasionando abortos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia de *C. abortus* en rebaños caprinos lecheros en Guanajuato con problemas de abortos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el aislamiento de *C. abortus* en cultivo celular, a partir de muestras vaginales de caprinos.
2. Determinar la frecuencia serológica de *C. abortus* mediante ELISA.
3. Estandarizar y aplicar la PCR para la identificación de *C. abortus* a partir de muestras vaginales de caprinos.
4. Determinar los principales factores de riesgo para la presencia de clamidiasis los rebaños caprinos de estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Población

Se eligieron seis rebaños caprinos lecheros del estado de Guanajuato con historial de abortos. Los rebaños tienen un sistema de producción intensivo y la recría es del mismo rebaño.

De estas granjas se tomaron un total de 126 muestras de exudado vaginal y 125 muestras sanguíneas.

Las cabras seleccionadas para colección de muestras fueron las de primer parto en adelante y que estuvieran próximas al parto (2 semanas máximo) ó recién paridas (4 semanas máximo).

5.2 Obtención de información

La obtención de información de las granjas se realizó mediante la aplicación de dos cuestionarios a los propietarios. El primero se enfocó en los aspectos generales de la granja como manejo, genética, alimentación, sanidad, reproducción e instalaciones. **(Anexo I)**

El segundo cuestionario se enfocó a datos individuales de las cabras muestreadas como la edad, número de partos, historial clínico y la producción. **(Anexo I)**

5.3 Muestras clínicas para la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* y *Brucella sp.*

5.3.1 Suero

Se tomaron 10 ml de sangre de vena yugular de las cabras en condiciones asépticas, por medio de tubos de vidrio Monoject™ y agujas (0.70 x 36 mm) estériles. Se permitió que se separara el coágulo sanguíneo del suero y se transportaron en refrigeración a 4°C para su procesamiento en el laboratorio.

5.3.2 Procesamiento

Los tubos se centrifugaron 900 xg durante 10 min para la separación de los componentes sanguíneos y del suero, siendo este último transferido a microtubos estériles previamente identificados, para posteriormente ser mantenidos a -20°C hasta su utilización.

5.4 Muestras clínicas para el aislamiento e identificación de *Chlamydophila abortus*

5.4.1 Exudado vaginal.

Se tomaron muestras de exudado vaginal de cabras con un hisopo estéril, el cual se transportó al laboratorio en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml tipo falcon, adicionado con 2 ml de SPG (Sucrose-Phosphate/Glutamate diluent), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y antibióticos ⁽²¹⁾ **(Ver anexo**

II) y en refrigeración a 4°C. En el laboratorio se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

5.4.2 Procesamiento

Los hisopos fueron escurridos ejerciendo presión con la ayuda de una pinza estéril sobre las paredes del tubo y se desecharon. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 3000 xg durante 40 min a 4°C. Se tomaron 500 µl del sobrenadante y se transfirieron a un microtubo estéril, se identificaron y congelaron a -70°C hasta su utilización.

El resto de contenido del tubo fue transferido a otro microtubo estéril y congelado a -70°C hasta su utilización.

5.5 Pruebas serológicas

5.5.1 Detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* por ELISA

Se utilizó el kit comercial SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF *Chlamydophila abortus* BY ELISA METHOD del Instituto Pourquier de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Esta prueba se basa en la detección de un antígeno recombinante el cual es una proteína polimórfica de membrana externa de 80-90 kDa la cual es específica para *Chlamydophila abortus* y no tiene reacción cruzada con *Chlamydophila pecorum*.

5.5.2 Prueba de Tarjeta al 3%, para el diagnóstico de brucelosis

Se realizó esta prueba para descartar la presencia de brucelosis en los rebaños, ya que esta enfermedad es un diagnóstico diferencial del AEPR.

La prueba de Tarjeta al 3% es considerada de tamiz debido a su alta sensibilidad, consiste en mezclar el suero problema con el antígeno de Tarjeta. La prueba se considera positiva si se observa aglutinación, esto quiere decir que el suero posee anticuerpos anti-brucela. En caso de no observar aglutinación se considera negativa.

En un cuadro de una placa de vidrio cuadrada de 3 x 3 cm, se depositaron 30 µl de antígeno *Brucella abortus* (Aba test tarjeta al 3%, PRONABIVE) para uso en caprinos y ovinos y después dentro del mismo cuadro muy cercano al antígeno se pusieron 30 µl de suero de las muestras serológicas y se mezclaron con la punta de la micropipeta, con un movimiento circular. Se movió la placa por 4 min y se determinó si habían aglutinado sobre una fuente de luz en un fondo oscuro. Se utilizó como control positivo el suero de un animal infectado con *Brucella melitensis*.

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

Se propagaron monoestratos celulares de fibroblasto L929 de ratón en botellas de poliestireno de 75 cm² (NUNC™). Las células fueron cultivadas en un Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle (InVitro), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), aminoácidos no esenciales 1%, L-Glutamina 1% y antibióticos

(Gentamicina 50 µg/ml y estreptomycin-penicilina 100 µg/ml), (MEM-C), en condiciones de humedad en incubadora (NUAIRE™) a 37°C con un 5% de CO₂

⁽⁶⁾. **(Ver Anexo II)**

5.6.1 Preparación de células para la detección por inmunofluorescencia

Previo a la infección con las muestras clínicas, se prepararon monoestratos celulares, con las condiciones y medio de cultivo indicados arriba, en placas de poliestireno (NUNC™) de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio estériles de 12 mm de diámetro para la posterior identificación de la bacteria por la técnica de inmunofluorescencia y sin cubreobjetos con la finalidad de hacer pases ciegos en caso de ser necesario. La concentración celular que se utilizó fue de 0.5×10^5 células/ml MEM-C/pozo, dejándose incubar 24 h en las condiciones antes descritas hasta obtener un 60-70% de confluencia.

5.6.2 Proceso de infección

Una vez obtenida la confluencia deseada se retiró el MEM-C por completo de cada uno de los pozos e inmediatamente se agregaron 100 µl del inóculo/pozo. Por muestra clínica se utilizaron 2 pozos/placa. Cada placa contó con una muestra testigo positivo y testigo negativo. Para facilitar la infección de las células, las placas se colocaron en una incubadora orbital durante 1 h, 37°C a 50 rpm en condiciones de humedad.

Posteriormente a cada pozo se le agregó 900 µl de MEM-C, las placas se incubaron en condiciones de humedad a 37°C con un 5% de CO₂, durante 72 h (tiempo de infección de la bacteria).

Finalizadas las 72 h de incubación, las placas sin cubreobjetos se mantuvieron a -70°C. A las placas con cubreobjetos se les retiró por completo el MEM-C y se les realizaron 3 lavados con Solución Salina de Fosfatos (PBS) (**Anexo II**) de 5 min cada uno. Una vez que se retiró por completo el PBS se detuvo la infección agregando 1 ml de metanol puro a -20°C a cada pozo durante 10 min. Pasado este tiempo se retiró por completo el metanol de las placas y se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

5.6.3 Técnica de inmunofluorescencia directa

Para la identificación de las inclusiones intracitoplasmáticas producidas por *Chlamydomphila abortus* se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando la prueba comercial IMAGEN™ *Chlamydia* (DakoCytomation LTD, UK). Esta prueba comercial detecta el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína.

Se agregó a cada uno de los pozos fijados 25 µl de Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) diluido 1/10 con PBS y se incubó en atmosfera húmeda por 30 min a 37°C. Como colorante de contraste en esta dilución se utilizaron 2 µl de Azul de Evans al 0.5%. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min

cada uno y se retiraron los cubreobjetos de cada pozo para su secado a temperatura ambiente.

Los cubreobjetos ya preparados se montaron sobre portaobjetos limpios con medio de montaje Vectashield[®] fijándolos con una pequeña cantidad de barniz transparente, alrededor del cubreobjetos y se observaron las preparaciones en microscopio de luz ultravioleta (Olympus IX71 y Leica DM1000) con objetivo de 40x.

En caso de no visualizar inclusiones citoplasmáticas en la primera lectura, se realizaron pases ciegos de las placas sin cubreobjetos que se encontraban mantenidas a -70°C. Las placas se congelaron y descongelaron al menos 5 veces, con el fin de lisar las células y liberar la bacteria. Se transfirió el contenido a microtubos estériles y se realizó la infección de la misma forma antes descrita de nuevos monoestratos celulares.

Una muestra se dio como negativa si tras la realización de 2 pases ciegos no se detectaron inclusiones intracitoplasmáticas.

5.7 Identificación de *Chlamydomphila abortus* mediante la PCR

5.7.1 Estandarización de la PCR a partir de cultivo celular infectado con *Chlamydomphila abortus*

5.7.1.1 Extracción de ADN

Se probaron dos métodos de extracción de ADN a partir de cultivo celular infectado, para determinar con cual se obtiene mejor calidad y cantidad del mismo para su posterior uso en la PCR. Se realizó la extracción de ADN de células de fibroblasto de ratón L929 infectadas con *Chlamydomphila abortus*:

a) Extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

Se tomaron 200 µl de un cultivo celular infectado, éste se inactivó en baño María a 80°C por 20 min. Se realizó una centrifugación rápida para bajar las gotas que pudieran quedar en la tapa, causadas por la evaporación. A continuación se agregaron 40 µl de Buffer NET (**Ver Anexo II**) y 34 µl de SDS al 24% (Concentración final de 3.4%), en seguida se incubaron a 80°C durante 10 min. Se volvió a realizar una centrifugación rápida y se agregó RNAsa a una concentración final de 75 µg/ml y se incubó 2 h a 50°C. Pasado este tiempo se agregó Proteinasa K a una concentración final de 325 µg/ml y se incubó a 50°C durante 90 min. Posteriormente se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se pusieron en un agitador orbital durante 15 min. Después se centrifugó a 16,060 xg durante 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió delicadamente el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando no aspirar la interfase.

Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló gentilmente. Se dejó reposar durante 2 h y luego se centrifugó a 16,060 xg durante 15 min. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% frío (-20°C) y se centrifugó durante 5 min a 16,060 xg. Una vez realizada la centrifugación se desechó el etanol y se dejó secar el ADN en la campana de flujo laminar hasta el día siguiente. Por último se resuspendió la pastilla con 25 µl de agua libre de DNAsas.

b) Extracción de ADN con kit comercial.

Se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Mini de la marca QIAGEN de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El cual está diseñado para la rápida purificación de ADN total utilizando la técnica de microcentrifugación

De igual forma se realizó la extracción de ADN de células de fibroblasto de ratón L929 sin infectar, el cual se utilizó como control negativo, con cada una de las técnicas arriba descritas.

5.7.1.2 Iniciadores

Para la identificación de *Chlamydomphila abortus* se utilizaron dos juegos de iniciadores. Los cuales se diseñaron a partir del gen 16S RNAr, para tal propósito se utilizó el programa IDT SciTools Primer QuestSM y del gen de la proteína polimórfica de membrana externa (POMP 90-91B) sacado del banco de genes (número de acceso EF372585)⁽³⁰⁾.

- Iniciadores del gen 16S RNAr

Amplifica 342 pb

16S Forward (5'-TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGT-3') y 16S Reverse (5'-GTCAATGCCAAGGCATCCACCAAT-3')

- Iniciadores del gen *pomp* 90-91B

Amplifica 912 pb

Forward CpaX1 (5'-ACGGTCACTTGGAAACAAGG-3') y Reverse CpaX2 (5'-AGCAGAGGTTGGGCTCACTA-3').

5.7.1.3 Prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Condiciones de PCR

Se tomaron las precauciones de utilizar material nuevo estéril y el uso de puntas con filtro para las micropipetas. Las reacciones de PCR fueron las mismas para los iniciadores 16S RNAr y *pomp* 90-91B, las cuales se realizaron en un volumen final de 50 µl, conteniendo 1X de Buffer PCR (InVitrogen), 3 mM de MgCl₂, 400 µl de dNTP's, 25 pmol de cada uno de los iniciadores, 1 U de Taq Polimerasa (InVitrogen) y 25 ng de ADN de cultivo celular infectado con *Chlamydophila abortus* cepa A22 utilizado como control positivo y 25 ng de ADN de células de fibroblasto de ratón línea L929 como control negativo.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (PCR Express, Thermo Hybaid.)

El programa que se utilizó para la amplificación de *Chlamydomphila abortus* fue distinto para los dos juegos de iniciadores, siendo de la siguiente manera:

Gen 16S RNAr

Después de un periodo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, las reacciones fueron expuestas a 40 ciclos de 1 min a 95°C, 30 segundos a una temperatura de alineación de 63°C, luego 72°C durante 1 min y finalmente un paso de extensión final de 72°C por 10 min.

Gen *pomp* 90-91B

Después de un periodo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, las reacciones fueron expuestas a 40 ciclos de 1 min a 95°C, 30 segundos a una temperatura de alineación de 62°C, luego 72°C durante 45 segundos y finalmente un paso de extensión de 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa al 1%, adicionado con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) en un fotodocumentador (Gel Logic200) ⁽³¹⁾. Se utilizó un software para mejorar las características de las fotos tomadas (Kodak, Molecular Imaging Software v.4.0.2)

5.7.1.4 Sensibilidad y especificidad

Para determinar la sensibilidad se realizaron diluciones décuples a partir de 200 µl de células de fibroblasto de ratón L929 infectadas con *Chlamydomphila abortus*, las

cuales tenían una concentración de 10^{12} Unidades Formadoras de Inclusión, por mililitro (UFI/ml), que correspondió a una concentración de 25 ng/ μ l.

La especificidad se determinó utilizando el ADN de diferentes géneros bacterianos como *Brucella abortus*, *Leptospira Hardjo*, *Histophilus somni*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus* y *Mycoplasma bovis*, los cuales están relacionados con problemas reproductivos y con excepción de *M. bovis*, son Gram negativos.

5.7.2 Estandarización de la PCR para la identificación de *Chlamydomphila abortus* a partir de muestras clínicas

5.7.2.1 Extracción de ADN

Debido a que la infección de monoestratos celulares para la determinación de la bacteria se realiza con el sobrenadante de la muestra tomada, se realizó la extracción de ADN de 100 μ l de sobrenadante de 5 muestras de exudado vaginal. Para este procedimiento se utilizaron las dos técnicas de extracción de ADN antes descritas (con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y por el kit comercial QIAamp DNA Mini de la marca QIAGEN) con la finalidad de determinar con cual se obtenía mejor calidad y cantidad de ADN para su posterior uso en la técnica de PCR a partir de muestras de exudado vaginal.

Debido a que no se logró la amplificación de ADN a partir del sobrenadante de las 5 muestras de exudado vaginal, se decidió realizar la extracción de ADN de 500 μ l

del contenido restante de la centrifugación de la muestra de exudado vaginal de 8 muestras. A estas muestras se les realizó la extracción de ADN con las dos técnicas antes descritas, con la finalidad de compararlas.

Se determinó que la extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico era la más adecuada para obtener el ADN de las muestras de hisopo vaginal, por lo que se decidió utilizar esta técnica con las 118 muestras de exudado vaginal restantes. Se homogeneizó con la micropipeta este contenido restante de la muestra de exudado vaginal almacenada a -70°C y se tomaron 500 μl , que inmediatamente se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo estéril y se inactivó en baño María a 80°C por 20 min. Se realizó una centrifugación rápida para bajar las gotas que pudieran quedar en la tapa, causadas por la evaporación. A continuación se agregaron 100 μl de Buffer NET (**Ver Anexo II**) y 50 μl de SDS al 24% (Concentración final de 3.4%), en seguida se incubaron a 80°C durante 10 min. Se volvió a realizar una centrifugada rápida y se agregó RNAsa a una concentración final de 75 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó 2 h a 50°C . Pasado este tiempo se agregó Proteinasa K a una concentración final de 325 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 50°C durante 90 min. Posteriormente se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se pusieron en un agitador orbital durante 15 min. Después se centrifugó a 16,060 xg durante 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió delicadamente el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando no aspirar la interfase. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló gentilmente. Se dejó reposar durante 2 h y luego se centrifugó a 16,060 xg durante 15 min. Ahora se lavó con etanol, agregando 1 ml de etanol frío (-20°C) al 70% y se centrifugó

durante 5 min a 16,060 xg. Una vez realizada la centrifugación se tiró el etanol y se dejó secar el ADN en la campana de flujo laminar hasta el otro día. Por último se resuspendió la pastilla con 25 µl de agua libre de DNAsas.

Los iniciadores, las condiciones de PCR y los programas que fueron utilizados para la estandarización del PCR en cultivo celular infectados fueron los mismos para las muestras de hisopo vaginal.

5.8 Análisis estadístico

Se evaluó el rendimiento de la PCR de los dos genes utilizados en el estudio mediante una tabla corriente de concordancia (**Cuadro 2**) en cuanto a tres parámetros: sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la prueba (positiva y negativa). También se determinó la validez de la PCR ^(32,33).

		Aislamiento		
		Positivos	Negativos	Total
PCR	Positivos	Verdadero positivo A	Falso positivo B	Positivos verdaderos y falsos a + b
	Negativos	Falso negativo C	Verdadero negativo D	Negativos verdaderos y falsos c + d
	Totales	Bacteria aislada a + c	No enfermos b + d	Población estudiada a + b + c + d = N

Cuadro 2. Tabla corriente de concordancia ^(32,34).

La sensibilidad que es la capacidad de una prueba para calificar como positivos a una alta proporción de casos verdaderos ⁽³²⁾, se midió con la fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = (a / a + c) * 100$$

La especificidad que es la capacidad de una prueba para calificar como negativos a una alta proporción de sujetos sanos ⁽³²⁾, se midió con la fórmula:

$$\text{Especificidad} = (d / b + d) * 100$$

El valor predictivo positivo de la prueba es la proporción total de casos verdaderos que resultan positivos en la prueba empleada y el valor predictivo negativo es la proporción de no enfermos que resultan negativos en la prueba empleada ⁽³²⁾, para medir estos parámetros se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{VP}(+) = (a / a + b) * 100$$

$$\text{VP}(-) = (d / c + d) * 100$$

También se determinó la validez de la PCR utilizada en este trabajo, con lo cual se garantiza que se está midiendo un fenómeno, es decir, el que realmente deseamos valorar de una prueba de laboratorio ⁽³²⁾. Se utilizó la siguiente fórmula para medir la validez:

$$\text{Validez} = (a + d / N) * 100$$

6. RESULTADOS

6.1 Resultado de la prueba de tarjeta al 3%

Las 125 muestras sanguíneas de las cabras analizadas resultaron negativas a brucelosis, se conoce que estos rebaños son certificados como libres de brucelosis.

6.2 Resultados de la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* mediante ELISA

De las 125 cabras muestreadas 12 resultaron positivas, dando una seropositividad a *Chlamydophila abortus* del 9.60 %.

En el **cuadro 3** se desglosa por granja:

Granja	Animales muestreados	Positivos	Negativos
Rancho A	12	0	12
Rancho B	34	10	24
Rancho C	30	1	29
Rancho D	15	1	14
Rancho E	13	0	13
Rancho F	21	0	21
Total	125	12	113

Cuadro 3. Resultados por granja de la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* mediante ELISA

6.3 Resultados del aislamiento de *Chlamydophila abortus* mediante la técnica de inmunofluorescencia directa

De las 126 muestras de exudado vaginal obtenidas de las cabras, 34 resultaron positivas al aislamiento, siendo el 26.98%.

En el **cuadro 4** se desglosa por granja:

Granja	Animales muestreados	Positivos	Negativos
Rancho A	12	1	11
Rancho B	34	15	19
Rancho C	31	7	24
Rancho D	15	3	12
Rancho E	13	4	9
Rancho F	21	4	17
Total	126	34	92

Cuadro 4. Resultado por granja del aislamiento de *Chlamydophila abortus*

6.4 Estandarización de la PCR a partir de cultivo celular infectado con *Chlamydomphila abortus*

Como se puede observar en la **Figura 3**, se logró la estandarización de la PCR en cultivo celular infectado con los dos juegos de iniciadores.

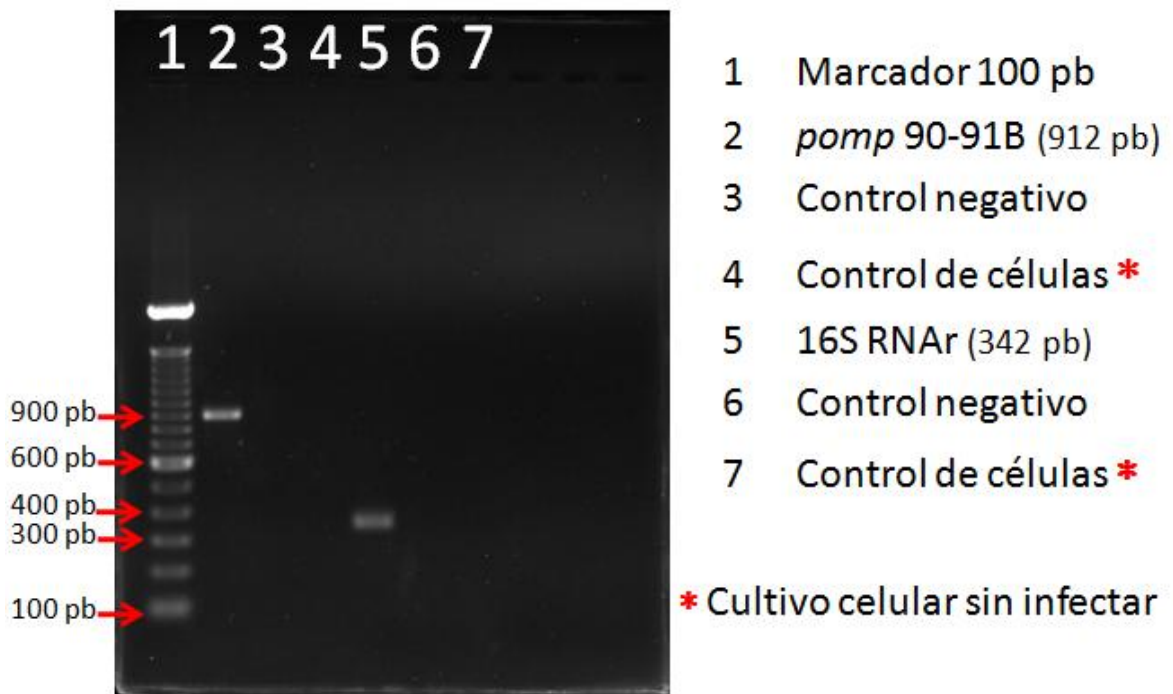


Figura 3. Amplificación de los genes de *pomp* 90-91B y 16S RNAr de *Chlamydomphila abortus*.

6.4.1 Sensibilidad de la PCR en cultivo celular infectado

La sensibilidad de ambos iniciadores fue similar, logrando amplificar hasta 2.5 ng de ADN (**Figura 4 y 5**).

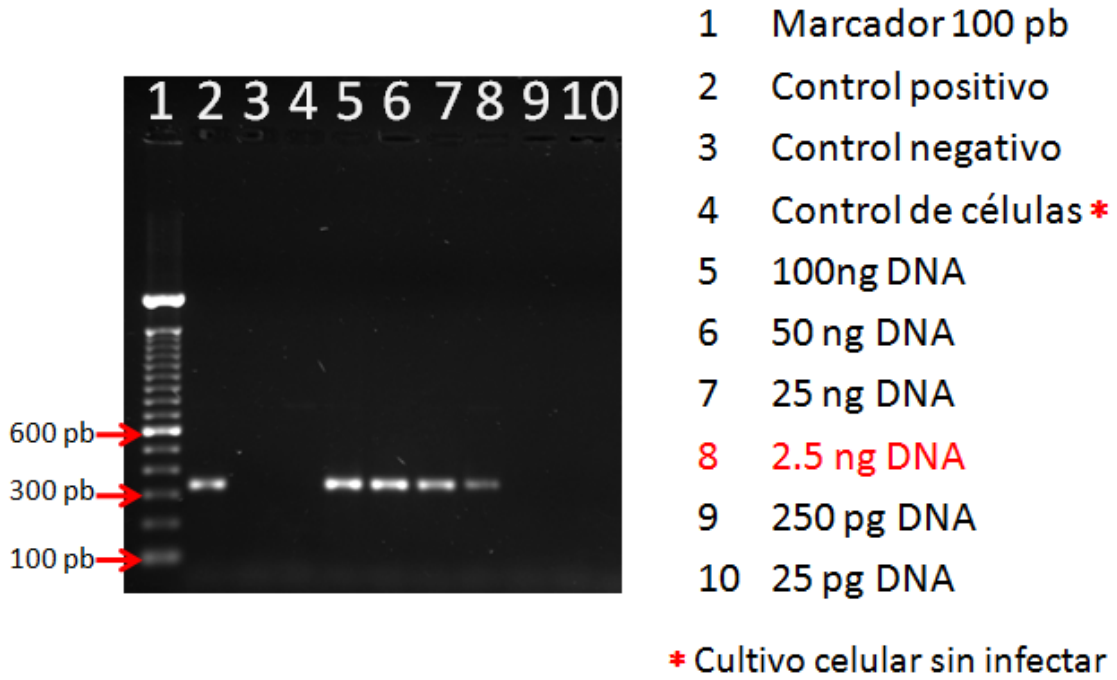


Figura 4. Sensibilidad del PCR para el iniciador 16S RNAr *Chlamydomophila abortus*.

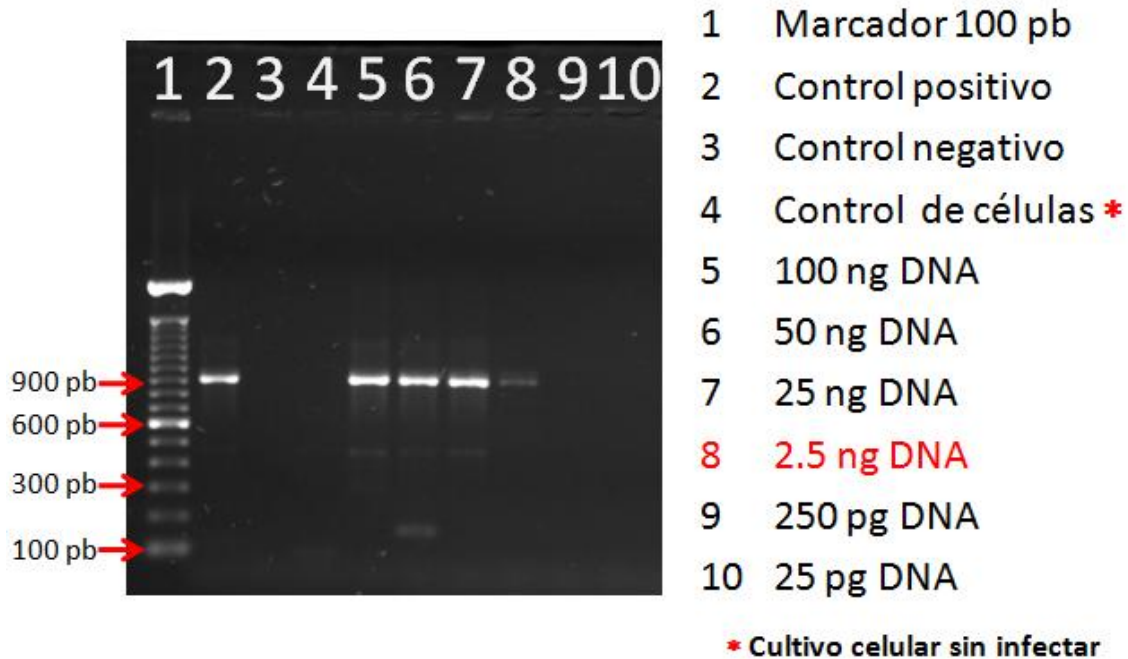


Figura 5. Sensibilidad del PCR para el gen *pomp* 90-91B de *Chlamydomphila abortus*.

6.4.2 Especificidad de la PCR en cultivo celular infectado

Ninguno de los dos iniciadores amplificó DNA de *Leptospira Hardjo*, *Histophilus somni*, *Salmonella typhi* y *Mycoplasma bovis*; sin embargo, con el iniciador 16S RNAr se observó la amplificación de ADN de *Brucella abortus*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter fetus* (**Figura 6**) y en el caso del iniciador *pomp* 90-91B sólo amplificó el DNA de *Campylobacter jejuni* (**Figura 7**).

Sin embargo, aunque el amplicón resultó aproximadamente de 900 pb para *Brucella abortus*, 400 pb para *Campylobacter jejuni* y 800 pb para *Campylobacter fetus*, no impide la identificación de *Chlamydomphila abortus*.

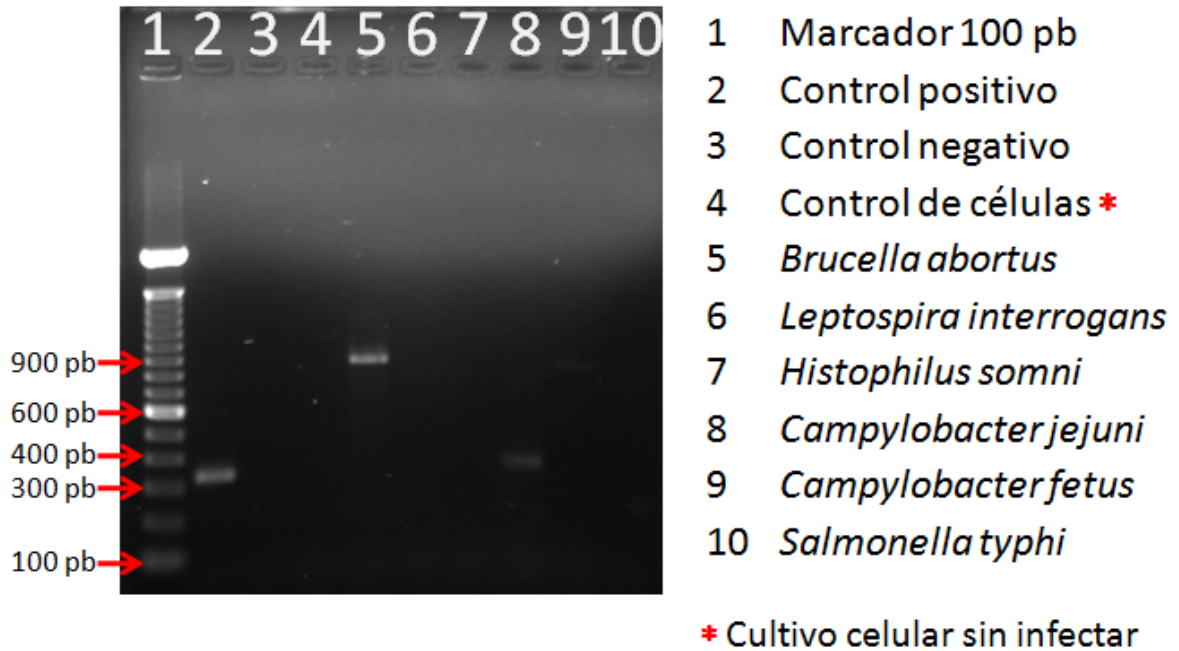


Figura 6. Especificidad del iniciador 16S RNAr

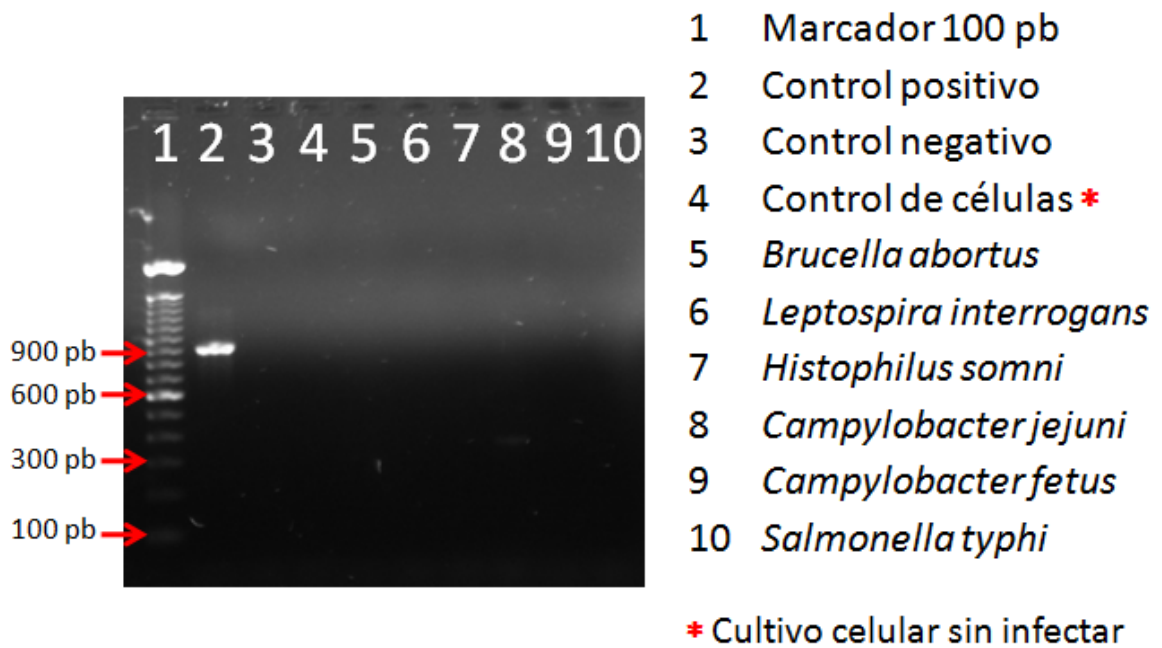


Figura 7. Especificidad del iniciador *pomp* 90-91B

6.5 Estandarización de la PCR en muestras de hisopo vaginal

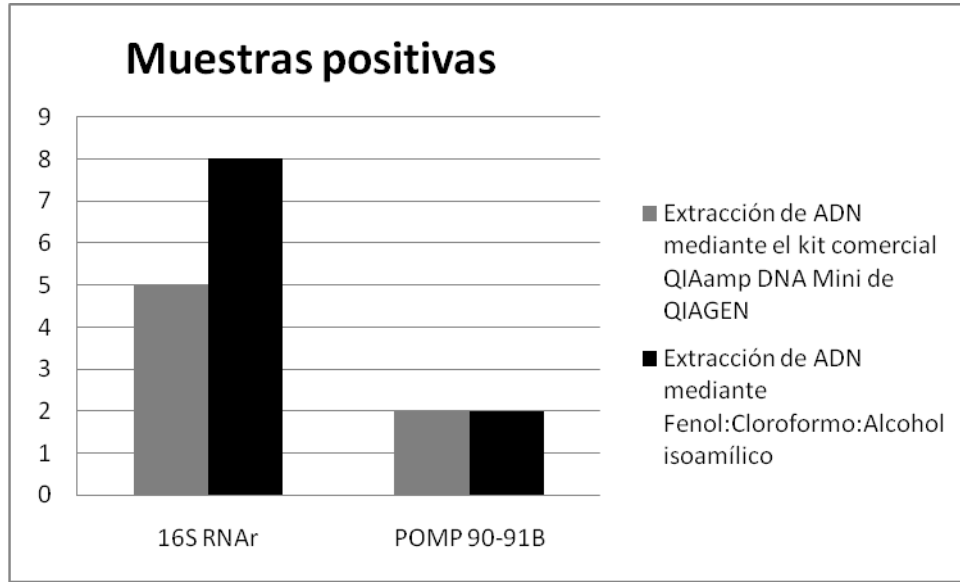
6.5.1 Extracción de ADN de muestras de hisopo vaginal

Primero se realizó la extracción de ADN del sobrenadante de 5 muestras de exudado vaginal, mediante las dos técnicas de extracción antes descritas, dando un resultado negativo al PCR con los iniciadores 16S RNAr y *pomp* 90-91B.

Estas muestras salieron positivas a ELISA e inmunofluorescencia.

Entonces a 8 muestras de exudado vaginal se les realizó la extracción de ADN del contenido restante de la centrifugación de la muestra de hisopo vaginal, mediante las dos técnicas antes descritas. Cabe mencionar que estas 8 muestras resultaron positivas a ELISA e inmunofluorescencia.

Como se puede ver en la **Gráfica 1** en el caso del iniciador 16S RNAr con la técnica de extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico las 8 muestras resultaron positivas a la prueba de PCR y en el caso de la técnica comercial de la marca QIAGEN solo salieron 5 positivas. Tomando en cuenta esta información se decidió que la técnica de extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico era mejor y se utilizó en las muestras de exudado vaginal restantes.



Gráfica 1. Resultado de la comparación de las técnicas de extracción de ADN a partir de muestras de exudado vaginal.

6.6 Resultados de la identificación de *Chlamydophila abortus* mediante PCR

Los resultados de los PCRs a partir de las muestras de exudado vaginal con los dos genes de *Chlamydophila abortus* que se utilizaron en este estudio se describen a continuación:

6.6.1 PCR con iniciadores del Gen 16S RNAr (**Cuadro 5**):

Granja	Animales muestreados	Positivos	Negativos
Rancho A	12	2	10
Rancho B	34	12	22
Rancho C	31	7	24
Rancho D	15	2	13
Rancho E	13	3	10
Rancho F	21	4	17
Total	126	30	96

Cuadro 5. Resultado por granja de PCR en muestras de exudado vaginal a partir del gen 16S RNAr.

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad de la prueba de PCR en muestras de hisopo vaginal con el iniciador 16S RNAr fue del 70.58% y la especificidad del 93.47% (**Cuadro 6**).

El valor predictivo positivo de la prueba fue del 80% y el valor predictivo negativo de la prueba fue del 89.58%.

Esta prueba tiene una validez del 87.30%.

		Aislamiento		
		Positivos	Negativos	Total
PCR	Positivos	24	6	30
	Negativos	10	86	96
	Total	34	92	126

Cuadro 6. Sensibilidad y especificidad de la PCR en muestras de exudado vaginal con el iniciador 16S RNAr, tomando como prueba de referencia al aislamiento en cultivo celular.

6.6.2 PCR con iniciadores del Gen *pomp* 90-91B (**Cuadro 7**):

Granja	Animales muestreados	Positivos	Negativos
Rancho A	12	1	11
Rancho B	34	7	27
Rancho C	31	0	31
Rancho D	15	1	14
Rancho E	13	0	13
Rancho F	21	0	21
Total	126	9	117

Cuadro 7. Resultados por granja de PCR en muestras de exudado vaginal a partir del gen *pomp* 90-91B

Sensibilidad y especificidad

La prueba con este iniciador obtuvo una sensibilidad del 17.64% y una especificidad del 96.73% (**Cuadro 8**):

El valor predictivo positivo de la prueba fue del 66.66% y el valor predictivo negativo fue del 76.66%.

La validez de la prueba fue del 75.39%

		Aislamiento		
		Positivos	Negativos	Total
PCR	Positivos	6	3	9
	Negativos	28	89	117
	Total	34	92	126

Cuadro 8. Sensibilidad y especificidad de la PCR en muestras de hisopo vaginal con el iniciador *pomp* 90-91B, tomando como prueba de referencia al aislamiento en cultivo celular.

6.7 Comparación de resultados entre PCR, aislamiento y ELISA (**Cuadro 9**)

Número de cabras	Aislamiento	PCR	ELISA
7	+	+	+
17	+	+	-
1	+	-	+
2	-	+	+
9	+	-	-
5	-	+	-
2	-	-	+
83	-	-	-
126			

Cuadro 9. Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto enzoótico de los pequeños rumiantes.

Al contrastar los resultados entre rebaños para determinar los factores de riesgo para la presencia de la clamidiosis, no fue posible de determinarlos debido a que el manejo que se realiza en los seis rebaños es el mismo, como la reproducción, la genética, la alimentación y la sanidad.

7. DISCUSIÓN

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) es una enfermedad que es considerada como exótica para nuestro país por las autoridades de sanidad animal ⁽⁵⁾. Se decidió trabajar con los seis rebaños caprinos lecheros del estado de Guanajuato debido a que los propietarios mencionaron que han tenido en años recientes problemas de abortos en el último tercio de la gestación y el nacimiento de crías débiles que mueren a los pocos días de nacidos. El rancho B en el 2009 en una temporada de pariciones presentó un 60% de abortos aproximadamente, en la literatura se menciona que es característico del AEPR la presencia de una “tormenta de abortos” en donde los rebaños presentan de un 30 al 90% de abortos, para mantenerse en un 5 a 10% de abortos durante 3 años hasta que se presenta un nuevo brote ^(1,2,11).

Estos rebaños cuentan con un certificado que los acredita como libres de brucelosis. Tienen un sistema de producción intensivo en donde las cabras se encuentran permanentemente estabuladas. Este contacto estrecho puede provocar que la enfermedad se pueda transmitir a cabras susceptibles del mismo corral, ya que los animales paridos continúan eliminando la bacteria en descargas vaginales hasta dos semanas después del parto ⁽¹⁾.

El estudio serológico de las cabras realizado con una ELISA específica para *Chlamydophila abortus*, dio como resultado un 9.60% de seropositividad a anticuerpos contra la bacteria en las seis producciones caprinas. La identificación de la bacteria a partir de muestras de exudado vaginal en el aislamiento fue del

26.98% de animales positivos y para la prueba de PCR fue del 23.81% de animales positivos. Todos los animales resultaron negativos a la prueba de tarjeta al 3%, para el diagnóstico de brucelosis.

Como se puede ver en el **Cuadro 8**, solo 7 cabras resultaron positivas a ELISA, aislamiento bacteriano y PCR, cabe destacar que de estos animales, dos abortaron un mes antes de la toma de muestras. Esto indica que todavía un mes después del aborto se siguen eliminando bacterias vía vaginal.

El kit comercial ELISA del Instituto Pourquier está basado en un antígeno recombinante, una proteína de 80-90 KDa la cual es específica para *C. abortus* y no hay reacción cruzada con *C. pecorum*. En estudios recientes se ha demostrado en sueros de referencia una buena especificidad (90-100%) y sensibilidad (80-93.5%) con respecto a otras pruebas serológicas ⁽²¹⁾. La desventaja que tiene este kit comercial es que al ser el AEPR una enfermedad exótica en el país es muy complicada su importación ya que se requiere un permiso de importación, el cual puede tardar más de un año. Esto provoca que el precio de la prueba sea alto (\$20,000). Con el kit solamente se pueden realizar 245 pruebas, por lo que es inviable su diagnóstico en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico.

El rancho B fue el que tuvo un mayor número de animales positivos, lo que correlaciona con un alto porcentaje de abortos en este rebaño durante los últimos dos años, como se mencionó antes un 60% de abortos en una temporada de abortos en 2009. En cuatro rebaños, los propietarios indicaron que a todas las

cabras primíparas les inyectan oxitetraciclinas y ya no han tenido problemas de abortos, aunque ocasionalmente se presenta un aborto o el nacimiento de una cría débil. La administración de oxitetraciclinas afecta la replicación de la bacteria y puede prevenir abortos, pero no erradica la infección, por lo que la bacteria se sigue eliminando en los fluidos vaginales. Esto en consecuencia provoca que otros animales se infecten ^(1,2). Esto se comprobó en este trabajo ya que algunos ranchos no han tenido problemas de abortos en los últimos 2 – 3 años, pero algunas cabras siguen eliminando la bacteria.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite lograr un diagnóstico rápido y preciso. El aislamiento de la bacteria en cultivo celular es la “prueba de oro” para la identificación de la bacteria. Pero el diagnóstico por cultivo celular requiere de trabajadores de laboratorio con mucha experiencia, debido a la dificultad de realizar el diagnóstico por inmunofluorescencia y de protocolos estandarizados ⁽³⁴⁾. Otra ventaja de la PCR con respecto al aislamiento bacteriano es la reducción del tiempo de diagnóstico, ya que en tan solo 2 días se puede obtener un resultado y con el aislamiento son 3 semanas. Además como comprobamos en una muestra de exudado vaginal, no es necesario que la bacteria se encuentre viable para su identificación.

La estandarización de la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consistió en 2 fases: la estandarización de la prueba a partir de cultivo celular infectado con *Chlamydia abortus* y el uso de la prueba en muestras de hisopo vaginal de cabras.

Las técnicas de extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y el kit comercial de la marca QIAGEN resultaron adecuadas para su uso en células infectadas con *Chlamydomphila abortus* y células no infectadas.

Para la identificación de la bacteria, la mayoría de las publicaciones mencionan que utilizan dos diferentes regiones genómicas blanco para la amplificación de ADN, una es la región del gen RNA ribosomal y otra es el gen del antígeno MOMP (*omp1* y *ompA*)^(21,34).

Se logró amplificar el ADN de la bacteria a partir de cultivo celular infectado con los dos iniciadores: 16S RNAr y *pomp* 90-91B, los cuales amplifican 912 pb y 342 pb respectivamente. La sensibilidad fue la misma para los dos iniciadores siendo de 2.5ng de ADN y la especificidad fue la misma también, no amplificó el ADN de otras bacterias causantes de aborto en cabras.

La extracción de ADN a partir de muestras de exudado vaginal tuvo resultados diferentes a la efectuada en cultivo celular infectado. Como se puede apreciar en la **Gráfica 1** la extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico fue más adecuada. Esto se puede deber a que se obtiene una mayor cantidad de ADN mediante esta técnica. La infección de cultivo celular con muestras de exudado vaginal se efectúa con el sobrenadante obtenido de la centrifugación de la muestra procesada. Basado en esto se decidió realizar la extracción de ADN del sobrenadante y se comparó con la extracción de ADN del resto del contenido de la

centrifugación y se observó que ninguna de las 8 muestras utilizadas amplificó el sobrenadante. Mientras que el PCR resultó positivo en el resto del contenido de la centrifugación, estas 8 muestras resultaron positivas al aislamiento. De acuerdo a estos resultados se recomienda hacer extracción de ADN de la muestra total, sin realizar centrifugación.

La prueba de PCR realizada a partir muestras de exudado vaginal, con los iniciadores que amplifican los genes 16S RNAr y *pomp* 90-91B tuvieron un comportamiento diferente al observado en cultivo celular; tanto la sensibilidad como la especificidad fue diferente, siendo mejor el PCR que amplifica el gen 16S RNAr. Se utilizó al aislamiento como prueba comparativa para realizar este análisis. La sensibilidad del iniciador 16S RNAr fue del 70.58%, esto indica que 24 cabras resultaron positivas a PCR y al aislamiento y la especificidad fue del 93.47%. El iniciador *pomp* 90-91B tuvo una sensibilidad y especificidad del 17.64% y 96.73% respectivamente.

Para que una prueba sea considerada buena necesita tener una sensibilidad mayor al 80% y estar equilibrado con la especificidad⁽³²⁾. En el caso de estos dos iniciadores no se obtiene, pero el iniciador 16S RNAr resulta útil para realizar un tamizaje del rebaño.

Para evitar la transmisión de la enfermedad a otros rebaños o al humano, es indispensable aislar a los animales que aborten, manejar los productos del aborto (placenta y feto) con guantes, eliminar estos productos, limpiar el corral

perfectamente evitar que mujeres embarazadas y personas inmunosuprimidas trabajen con los animales durante la temporada de pariciones ⁽¹⁾.

Algunos propietarios mencionaron que en cabras que abortaron observaron una disminución de la producción láctea. Por lo que es necesario realizar un estudio sobre el impacto económico que puede tener esta enfermedad en los rebaños caprinos lecheros de México, ya que es una industria en franco crecimiento ^(28,29).

Este estudio y otros tantos que se han realizado en el país demuestran que *Chlamydophila abortus* se encuentra presente en el territorio nacional y es causante de abortos en rebaños. En países donde la brucelosis está controlada, el AEPR es la principal causa de abortos.

La introducción de la enfermedad al país se puede deber a la importación de ganado caprino y ovino de países donde la enfermedad es endémica. Hace una década se importaron ovinos Australia, Canadá y Estados Unidos, los cuales son países donde se ha reportado ante la OIE la presencia de AEPR ⁽³⁵⁾. Los propietarios mencionaron que hace muchos años importaron caprinos al país desde Estados Unidos, con la finalidad de mejorar la genética de su rebaño.

8. CONCLUSIONES

Se demostró que *Chlamydomphila abortus* se encuentra presente en rebaños caprinos lecheros del estado de Guanajuato, mediante el aislamiento bacteriano, ELISA y PCR.

Se logró estandarizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de cultivo celular infectado con *Chlamydomphila abortus* y muestras de hisopo vaginal de cabras.

La técnica de PCR es una buena opción para el diagnóstico del AEPR, ya que se reducen los tiempos de identificación de la bacteria considerablemente de 3 semanas con el aislamiento bacteriano a 2 días, no requiere la presencia de bacterias viables y es más sencilla la interpretación de resultados que la inmunofluorescencia.

El PCR basado en los iniciadores elaborados a partir del gen 16S RNAr tiene un mejor funcionamiento que el PCR basado en los iniciadores elaborados a partir del gen *pomp* 90-91B, por lo que es recomendable su uso para la identificación de *Chlamydomphila abortus*.

La técnica de extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico aplicada a muestras de hisopo vaginal es más recomendable que con el kit comercial de la marca QIAGEN.

Es necesario realizar un estudio más profundo sobre la presencia de la enfermedad en el estado de Guanajuato, con la finalidad de conocer su posible impacto económico en la producción caprina y a la salud pública.

9. REFERENCIAS

1. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Path* 2003; 128:217-244.
2. Rodolakis A. Recent advances in goat diseases. Chlamydiosis in goats. Tempesta M. (Ed.) International Veterinary Information Service. [cited 2001 Jan 16]. Available from: URL:<http://www.ivis.org>.
3. Andersen, A.A. Chlamydia. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 3rd ed. Blackwell Publishing, 2004:415-422.
4. Entrican G, Buxton D, Longbottom D. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *J R Soc Med* 2001; 94:273-277.
5. SAGARPA. Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animals, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. México: 2007.
6. Escalante-Ochoa C, Rivera A, Trigo F, Romero J. Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep trough cell culture isolation. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1996; 38:17-23.
7. Escalante-Ochoa C, Díaz E, Segundo C, Suarez F. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: First report. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1997; 39:117-121.
8. Lazcano AC. Detección de *Chlamydophila* spp en rebaños caprinos del estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y aislamiento bacteriológico (tesis de licenciatura). México D.F: UNAM, 2006.

9. Mora DJC, Escalante OC, Díaz AE, Jaimes VMS, Martínez G, Trujillo GB. Determinación serológica de *Chlamydomphila abortus* en ganado caprino lechero en México. En: XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Guadalajara (Jalisco) México; 2008.
10. Escalante-Ochoa C, Lazcano C, Soberón A. *Chlamydomphila* spp como agente zoonótico en México. En: XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Tuxtla Gutiérrez (Chiapas) México; 2001:41.
11. Smith MC, Sherman DM. Goat medicine. USA: Lea & Febiger, 1994.
12. Papp JR, Shewen PE, Gartley CJ. *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. Can. J. Vet. Res. 1993; 57:185-189.
13. Jones GE, Anderson IE. *Chlamydia psittaci*: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion?. Res. Vet. Sci. 1988; 44:260-261.
14. Shewen PE. Chlamydial infection in animals: A review. Can. Vet. J. 1980; 21:2-11.
15. Buxton D, Anderson IE, Longbottom D, Livingstone M, Wattedgedera S, Entrican G. Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. J. Comp. Path. 2002; 127:133-141.
16. Smith MC, Sherman DM. Goat Medicine. 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell 2009.
17. Pospischil A, Thoma R, Hible M, Grest P, Gebbers JO. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). Swiss Med. WKLY, 2002; 132:64-66.

18. Biberstein LE, Hirsh CD. Chlamydiae. In: Hirsh CD, MacLachlan NJ, Walter LR, editors. *Veterinary Microbiology*. Segunda edición. Blackwell Publishing, 2004:173-176.
19. Stephens RS. *Chlamydia*. Intracellular biology, pathogenesis and immunity. USA: ASM Press, 1999.
20. Quinn PJ, Markey BK. Concise review of veterinary microbiology. UK: Blackwell Publishing, 2003.
21. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol* 2009; 135:2-21.
22. Matthews J. Diseases of the goat. 3rd edition. UK: Wiley-Blackwell, 2009.
23. Spencer W, Jonson F. Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet Rec* 1983; 113(23):535 – 536.
24. Organización Mundial de Sanidad Animal. Aborto enzoótico de las ovejas. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Available from: URL: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.07_ENZ_ABOR.pdf
25. Aréchiga CF, Aguilera JI, Rincón RM, Méndez LS, Bañuelos VR, Meza HCA. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. *Trop. Subtrop. Agroecosyt.* 2008; 9:1-14.
26. Caprino, Población ganadera 1999 – 2008 SIAP. Available from: URL: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/caprino.pdf
27. Acevedo A. Cobra auge la caprinocultura en el estado: Oliveros. *El Sol del Bajío*. 3 julio 2009. Available from:

URL: <http://www.oem.com.mx/esto/notas/n1229210.thm>

- 28.** Guanajuato. Avance mensual de la producción pecuaria Año 2010.
Available from: URL: <http://www.oeidrus.guanajuato.gob.mx/f1.php>
- 29.** Resumen estatal pecuario. Leche de caprino. Producción, precio y valor 2009. Available from: URL: http://siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=371
- 30.** Jiménez EJM, Escobedo GMR, Arteaga TG, López HM, Haro CM, Montes de Oca JR, Guerra IF. Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep (*Ovis aries*) in México. Am J Anim Vet Sci. 2008; 4:91-95.
- 31.** Sambrook J, Russell D. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd edition Volumén 2. USA: CSHC Press, 2001.
- 32.** Armijo RR. Epidemiología básica en atención primaria de la salud. España: Editorial Díaz de Santos, 1994.
- 33.** Greenberg SR, Flanders DW, Daniels SR, Eley JW. Epidemiología médica. Tercera edición. México: Manual moderno, 2002.
- 34.** Sachse K, Hotzel. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by Nested PCR. In: Sachse K, Frey J. Methods in Molecular Biology Vol 216: PCR Detection of Microbial Pathogens : Methods and Protocols. Humana Press. 123-136.
- 35.** Arteaga CJD. Diagnóstico actual de la situación de los ovinos en México. La revista del borrego. Número 46, mayo – Junio 2007.

9. ANEXOS

1.1 Anexo I

Cuestionario 1. Datos generales de las explotaciones

FOLIO EXPLOTACIÓN _____

Sr Productor: Todos los datos que usted proporcione son confidenciales y solamente serán utilizados con fines de investigación para el mejoramiento de la ganadería en este estado.

Fecha: _____ Encuestador: _____
dd/mm/aaaa

Nombre del propietario: _____ Nombre de la granja: _____

Ubicación de la explotación. Comunidad: _____ Municipio: _____

Estado _____

1.- ¿Pertenece usted a un grupo de productores?

() Si ¿Cuál? _____ () No () A veces

2.- ¿Cuánto tiempo tiene como caprinocultor? _____

3.- ¿A qué tipo de producción se dedica?

() Producción de cabrito () Producción de leche
() Doble propósito (leche y carne) () Producción de pie de cría
() Engorda () Chivo adulto () Otra: _____

4. ¿Qué tipo de sistema de explotación tiene?

() Intensivo
() Semi intensivo
() Extensivo

5.- El día de hoy; ¿aproximadamente cuántos caprinos tiene en total? _____

¿Cuántos machos? _____ ¿Cuántos sementales en servicio? _____
¿Hembras 1^{er} parto? _____ ¿Hembras 2^o parto?: _____
¿Hembras de 3 ó más partos? _____ ¿Cuántas crías entre machos y hembras? _____

6.- ¿Cuántos corrales tiene actualmente en uso para los caprinos? _____

7.- ¿La forma como maneja a los caprinos es igual todo el año?

() Si
() No ¿En qué época cambia? _____ ¿Qué hace diferente? _____

8.- ¿Separa los animales por etapa productiva?

() Si () No () A veces

9.- ¿Cuál es el origen de sus cabras?

() Solo son nacidas en su rancho **(Pase a la 13)**
() Solo compradas o llegadas de otro lugar
() Hay nacidas en su rancho y también compradas

10.- De Enero del 2009 a la fecha, ¿Compró o metió cabras a su rancho que hayan venido de otro lugar?

Si No **(Pase a la 13)** No sabe **(Pase a la 13)**

11.- ¿Qué tipo de animales ha comprado o metido a su rancho?

Sementales Hembras Engorda Cabritos

12.- ¿Dónde los compró o cuál es su procedencia?

En la misma comunidad
 Mismo municipio En otro municipio del mismo estado ¿Cuál? _____
 En otro estado ¿Cuál? _____ En otro país ¿En cuál? _____

13.- ¿Cuántos partos tienen sus cabras por año?

Uno ¿En qué época? _____
 Dos ¿En qué épocas? _____

14.- ¿Cuántas temporadas de empadre tiene al año?

Una dos tres

15.- ¿Realiza diagnóstico de gestación?

Si No A veces

16.- ¿Separa a las hembras cuando están gestantes?

Si No A veces

17.- ¿Separa a las hembras antes del parto?

Si No A veces

18.- ¿En donde paren las cabras?

Corrales Parideros Pradera

19.- ¿Cuándo separa a los cabritos de las madres?

Al nacer Al destete

20.- ¿Qué sistema de reproducción utiliza?

Empadre controlado Empadre no controlado
 Inseminación artificial

21.- Los sementales, ¿andan junto con las hembras todo el año?

Si No No sabe Por temporada

22.- ¿Cada cuándo cambia el semental?

Cada año Cada dos años Cada tres años Nunca lo cambia

23.- ¿Usted llega a pedir prestado o presta el semental?

Si No A veces No sabe

24.- De Enero del 2008 a la fecha ¿Ha tenido cabras que aborten, mal paran o tiren la cría?

Si No **(Pasa 32)** No sabe

25.- ¿Qué cabras han abortado?

Las que han nacido en el rancho Las compradas
 Han abortado por igual las del rancho y las compradas No recuerda

26.- ¿De qué tipo eran las cabras que le han abortado?

- () Primer parto () Las de segundo parto () Las de tres o más partos
 () En cualquier parto

27.- ¿Cómo eran las crías abortadas?

- () Muy chiquitas () De buen tamaño, bien terminadas
 () Como momias, estaban secas () No recuerda o no se fijó () Otra _____

28.- ¿Qué hace con los productos del aborto?

- () Los quema () Los tira a la basura
 () Los entierra () Les hecha cal

29.- ¿Utiliza guantes al tomar los productos de abortos y partos prematuros?

- () Si () No () A veces

La información que a continuación se pregunta es pensando de Enero del 2009 a la fecha:

30.- ¿Ha tenido cabritos que nazcan débiles y mueran al poco tiempo?

- () Si () No () No sabe

31.- ¿Ha tenido cabritos que nazcan con defectos como cabeza grande, patas cortas, hocico malformado, entre otros?

- () Si ¿Cómo eran? _____ () No () No sabe

32.- ¿Ha tenido cabras que parecía que ya estaban cargadas y que después entran en calor nuevamente (repetidoras)?

- () Si () No () No sabe

33.- ¿Ha tenido o tiene cabras que se les inflame o ponga dura la ubre?

- () Si () No () No sabe

34.- ¿Ha tenido cabras que pierdan la ubre o se queden sin leche?

- () Si () No () No sabe

35.- ¿Ha tenido o tiene cabras a las que les salga una “nube” en el ojo y que lleguen a quedar ciegas?

- () Si () No () No sabe

36.- ¿Ordeñan a sus cabras? () Si () No **(Pase a 46)** () A veces

37.- ¿Cuenta con sala de ordeño o lugar especial para ordeñar a sus animales?

- () Si () No () A veces

38.- ¿Cuántas veces al día ordeña a sus cabras? () Una () Dos

39.- ¿Cómo ordeña a sus cabras? () A mano () Ordeñadora mecánica

40.- ¿Llega a mezclar leche de cabras con la leche de vacas?

- () Si () No

41.- ¿Qué hace con la leche que ordeña?

- () La vende () La deja para el consumo en casa () Hace quesos () Otra _____

42.- ¿Qué hace con estos quesos?

- () Los vende ¿Dónde? _____ () Son para el consumo de la familia
 () Son para consumo familiar y venta

43.- ¿Usted acostumbra vacunar a sus cabras? () Si () No **(Pase a 51)**

44.- ¿Qué vacunas les pone?

- Contra la brucelosis Septicemia (Enfermedades respiratorias) Mal de paleta
 Leptospirosis Otras: _____

45.- ¿A qué animales vacuna contra la brucelosis?

- Hembras de 3-6 meses de edad Hembras adultas Machos

46.- ¿Cada cuándo vacuna contra la brucelosis?

- Una vez al año Después de cada época de partos Cuando le dicen los técnicos
 Otra _____

47.- ¿Qué vacuna contra la brucelosis utiliza? _____**48.- ¿Cuándo vacuna o inyecta a sus cabras cómo lo hace?**

- Usa una aguja y una jeringa para cada animal
 Con una jeringa y una sola aguja inyecta a todos
 Usa una sola jeringa pero cambia la aguja para cada uno
 No se fija o como la administre el técnico o MVZ

49.- ¿Cómo son las agujas que usa?

- Nuevas Usadas Tanto nuevas como usadas

50.- ¿Realiza cuarentena de los animales de nueva adquisición?

- Sí No A veces

51.- ¿Cuántos días de cuarentena realiza en promedio?

- Un mes o más Más de dos semanas
 Dos semanas Una semana

52.- ¿A los animales recién llegados les realiza alguna prueba diagnóstica?

- Sí No
 ¿Cuál?: _____

53.- ¿Tiene perros conviviendo con sus cabras?

- Sí No A veces

54.- Los perros de casas vecinas pueden entrar a donde están sus cabras

- Sí No A veces

55.- ¿Qué otros animales tiene en su rancho que estén junto o convivan con las cabras?

- Bovinos Borregos Puercos Gatos Gallinas Otros: _____

56.- Generalmente ¿Qué hace usted con la placenta o pares?

- La deja tirada Se la comen los perros La quema
 Le echa cal encima La entierra

57.- ¿Usted acostumbra darles medicamentos contra las lombrices o desparasitar a sus caprinos?

- Sí Fecha última desparasitación: _____ No A veces

58.- ¿Quién es el encargado de cuidar sus cabras?

- Empleado(s) Usted Sus familiares Especifique _____

59.- ¿Con qué frecuencia realiza la limpieza de los corrales?

- Todos los días Cada tercer día
 Una vez a la semana Una vez cada dos semanas

() Una vez al mes

60.- ¿Qué hace con el excremento que recoge?

() Lo utiliza para abono

() Lo vende

61.- ¿Si usted compra cabras, pide que le den algún certificado o un documento donde le aseguran que ese animal está libre de brucelosis?

() Si

() No

() A veces

62.- ¿Usted asiste con sus cabras a ferias ganaderas?

() Si

() No

63.- Diga las enfermedades más comunes que afectan a sus cabritos.

64.- Diga las enfermedades más comunes que afectan a sus cabras adultas.

65.- Diga cuales son las principales causas de muerte de sus cabritos.

66.- Diga cuales son las principales causas de muerte de sus cabras adultas.

67.- ¿Cómo conserva la leche antes de venderla o procesarla como queso?

LE AGRADECEMOS SU VALIOSA COOPERACIÓN

Cuestionario 2. Datos particulares de animales muestreados

FOLIO INDIVIDUAL _____

Nombre o identificación del caprino _____

Fecha _____ Municipio _____ Rancho _____

1.- Raza _____ 2.- Peso aproximado Kg. _____ 3.- Edad (meses) _____

4.- Sexo () Macho () Hembra

5.- Tipo de animal:

- () Cría, Tripón o destetado () Semental
 () Primas
 () Cabra 2º parto () Cabra 1er parto
 () Cabras con más de 5 partos () Cabra 3 a 5 partos

6.- Estado de carnes

() Muy malo () Malo () Bueno () Gordo

7.- ¿Este animal es nacido en el rancho?

() Sí (pase a 10) () No () No sabe

8.- Si fue comprado, ¿en dónde se compró?

() En el mismo municipio () En otro municipio, pero el mismo estado
 () En otro estado. () En otro país () Otro: _____

9.- Si fue comprado, ¿hace cuánto tiempo que llegó a su rancho?

() Menos de 6 meses () de 6 meses a un año
 () Más de un año () No recuerda

10.- ¿Este animal ha sido vacunado contra la brucelosis?

() Sí ¿cuántas ocasiones? _____ () No () No sabe

11.- ¿Que otra vacuna se le ha aplicado a este caprino?

12.- Este animal ha recibido algún tratamiento en los últimos 5 días?

() Si ¿Qué tratamiento? _____ () No

Si el animal muestreado es una hembra en producción.**13.- ¿De cuánto es su producción máxima de litros de leche por día en el ordeño? _____ Litros****14.- Esta cabra ¿ha tenido algún aborto? () Sí () No () No sabe****MUESTRAS OBTENIDAS**

() SUERO () HISOPO VAGINAL

SR. GANADERO AGRADECEMOS SU COOPERACIÓN.

1.2 Anexo II

Técnicas y preparación de medios y reactivos

- **MEM-C**

(Medio para cultivo celular – complementado)

Aminoácidos No Esenciales	1 %
L-Glutamina	1 %
Suero Fetal Bovino (SFB)	10 – 15 %
Gentamicina	10 µg/ml
Estreptomicina	100 µg/ml

- **SPG**

(Sucrose-Phosphate/Glutamate diluent)

Solución para preparar 1 L	
Sucrosa	74.6 g/L
KH ₂ PO ₄	0.512 g/L
K ₂ HPO ₄	1.273 g/L
L-Glutamina	1 %

Esterilizar por autoclave y agregar:

SFB	5 – 10 %
Estreptomicina	100 µg/ml
Gentamicina	50 µg/ml

- **PBS**

(Solución Salina de Fosfatos. 0.01 Molar; NaCl 0.15 Molar; pH 7.2)

Solución para preparar 1 L	
Agua bidestilada	800 ml
PBx (Solución de Fosfatos)	100 ml
NaCl	8.75 g

- **PBx**
(Solución de Fosfatos)

Solución para preparar 500 ml	
Agua bidestilada	200 ml
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2.62 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g

- **Buffer NET**

NaCl	50 mM
EDTA	125 mM
Tris HCl (pH 7.6)	50 mM