



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

PRESENCIA DE *Chlamydia abortus* EN CABRAS DE MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA:

LILIANA SÁNCHEZ ROCHA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F. Junio 2014



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.

Dedicatorias

A mis padres: María Guadalupe Rocha Vilchis y Honorio Sánchez Gómez, porque siempre han apoyado mis decisiones y me han respaldado, gracias por la paciencia que me han tenido y por todo lo que me han dado para que mejore como profesionista y como persona, espero no defraudarlos.

A todos mis amigos, los que han estado conmigo desde la secundaria, preparatoria y universidad, porque en un principio de esta etapa no pude darles toda la atención necesaria, pero a pesar de todo ello lograron comprender las circunstancias, no importa las veces que nos veamos, lo importante es que la amistad es sincera.

Ferdinand: gracias por permanecer firme en nuestros objetivos aún cuando el panorama se tornó confuso siempre te has mantenido comprensivo y amoroso.

A kiki (Bicho), porque aunque te hayas ido justo antes del inicio de esta nueva etapa, me acompañaste todo una vida y sin saberlo, me dirigiste a este punto, te extrañamos y siempre vivirás en nuestros recuerdos.

Agradecimientos

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio por haberme abierto las puertas de este proyecto aún sin conocerme, por su disponibilidad, confianza y asesoramiento a lo largo de la maestría.

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso por aceptar ser mi tutora y haber sido tan paciente y comprensiva conmigo, no solo en lo profesional, sino en lo personal, no pude haber tenido mejor tutora.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por ser parte de mi comité tutorial y por todo el tiempo de asesoría en la escritura de esta tesis.

A los miembros de mi jurado: Dra. Rosa Elena Miranda Morales, Dra. Gabriela Palomares Resendiz, Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez y al Dr. Roberto Montes de Oca Jiménez por el tiempo que me dieron al revisar la tesis y darme sus comentarios.

A mis compañeros de laboratorio por haberme alegrado los días de trabajo y por haber compartido un poco de sus vidas conmigo.

A todo el departamento de Microbiología e inmunología de la FMVZ por dejarme ser parte de él.

Este trabajo pudo ser realizado al financiamiento de SAGARPA CONACyT "Estudio epidemiológico de las principales enfermedades que afectan a los caprinos en México" por financiar este proyecto.

Contenido

	Pág.
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 HISTORIA Y EVOLUCIÓN DEL GENERO CHLAMYDIA.	7
1.2 CHLAMYDIA SPP.	9
1.3 ABORTO ENZOÓTICO DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES	13
2 IMPACTO DEL AEPR EN LA CAPRINOCULTURA MEXICANA	18
2.1 CAPRINOCULTURA EN MÉXICO	18
2.2 SITUACIÓN DEL AEPR EN MÉXICO	19
3 JUSTIFICACIÓN	20
4 HIPÓTESIS	21
5 OBJETIVOS GENERALES	21
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
7 MATERIAL Y MÉTODOS	22
7.1 MUESTREO	22
7.2 TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS	23
7.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CHLAMYDIA SPP EN CULTIVO CELULAR	23
7.4 PROCESO DE INFECCIÓN	24
7.5 DETERMINACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	25
7.6 PROPAGACIÓN DE LA CEPA DE REFERENCIA C. ABORTUS A.22	26
7.7 EXTRACCIÓN DE ADN	27
7.8 INICIADORES	28
7.9 CONDICIONES DE PCR	28
7.10 SECUENCIACIÓN	29
8 RESULTADOS	30
8.1 AISLAMIENTOS	30
8.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	33
8.3 SECUENCIACIÓN	36
9 DISCUSIÓN	41
10 CONCLUSIONES	47
11 ANEXO	48
12 BIBLIOGRAFÍA	49

Resumen

LILIANA SÁNCHEZ ROCHA. Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México. Bajo la dirección de: Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dr. Efrén Díaz Aparicio y Dr. Rigoberto Hernández Castro

Chlamydia abortus es el agente etiológico del aborto enzoótico en pequeños rumiantes (AEPR), una de las principales causas de aborto infeccioso en pequeños rumiantes y generador de grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria a nivel mundial. Actualmente el AEPR es considerada una enfermedad exótica en México por lo cual los métodos para su diagnóstico clínico no se encuentran disponibles, no obstante, en los últimos años se han realizado reportes que indican su implicación en abortos de cabras dentro de la República Mexicana. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *C. abortus* en casos de abortos en rebaños caprinos de los estados de Veracruz, Jalisco, Coahuila, Querétaro y Puebla. Se tomaron muestras de exudado vaginal de cabras de parto reciente con historial de aborto, de cabras con aborto reciente y de fetos abortados. Se obtuvieron 186 muestras procedentes de 49 rebaños de los estados de Coahuila, Jalisco, Puebla, Veracruz y Querétaro. El aislamiento bacteriano se realizó infectando la línea celular L929 con las muestras clínicas y utilizando *C. abortus* cepa A.22 como cepa de referencia. Paralelamente se realizó la prueba de PCR que amplificó un fragmento de 342 pb correspondiente a los genes ribosomales 16S, 5S y 23S. Los productos de amplificación fueron secuenciados y comparados con la base de datos del GenBank para determinar homología y posibles cambios en la secuencia de nucleótidos.

Mediante el aislamiento se encontró un 23.1% de muestras positivas a inclusiones clamidiales durante la infección en las células L929. Por otro lado la PCR mostró un 9.6% de muestras positivas. El análisis de la secuencia de los productos de amplificación mostraron una homología del 99% con *C. abortus* cepa A.22, FAS, S26, EBA y VPG. Este reporte confirma la presencia de *C. abortus* en muestras clínicas de abortos de cabras en México mediante aislamiento bacteriano, PCR y secuenciación. Las técnicas como el aislamiento bacteriano y pruebas moleculares son una excelente combinación para el diagnóstico de *C. abortus* en nuestro país.

Abstract

Chlamydia abortus is identified as the etiological agent for enzootic abortion in small ruminants or ovine enzootic abortion (OEA), it is one of the main causes of infectious abortion in small ruminants and generates great economic losses in the livestock industry worldwide. Currently OEA is classified as an exotic disease within the federal republic of Mexico, and for OEA this signifies the categorical absence of clinical diagnostic methods in our country. However, in recent studies, performed over the past several years, OEA began to be an increasingly likely culprit and a suspected contributing factor to a significant number of goat abortions nationwide. The aim of this study was to determine the presence of *C. abortus* in cases of abortions in goat herds in the states of Veracruz, Jalisco, Coahuila, Querétaro and Puebla. For the purpose of this research an investigation was conducted towards goats with recently known cases of abortion and with a history thereof; here, the vaginal swabs of such goats was sampled and tested for the presence of *C. abortus*. In total 186 samples from case studies were obtained from 49 different goat populations in the states of Coahuila, Jalisco, Puebla, Veracruz and Queretaro. Bacterial isolation was performed by means of realizing the infection of cellular line L929 by direct exposure to the clinical samples. In these cases *C. abortus* strain A.22 was used as a reference. Parallel to induced infection, PCR testing was performed as a means to amplifying a fragment counting 342 bp, this genetic fragment corresponds to the ribosomal 16S, 23S and 5S genes. The amplified products were sequenced and compared to the GenBank database to determine homology and possible alterations in the nucleotide sequence. By means of visual isolation of the bacteria in the L929 cells *C. abortus* could be positively identified for, and was encountered in, 23.1% of the tested cases, furthermore the PCR showed 9.6% of positive samples. The sequencing analysis of the amplified products showed a 99% homology with *C. abortus* strain A.22, FAS, S26, EBA and VPG. This report successfully confirms the presence of *C. abortus* in clinical samples of goat abortions in Mexico by bacterial isolation, PCR and sequencing. Techniques such as bacterial isolation and molecular tests are a great combination for the diagnosis of *C. abortus* in our country.

1 Introducción

1.1 Historia y evolución del Género *Chlamydia*.

Las infecciones causadas por especies del género *Chlamydia* han sido descritas desde hace cientos de años, la primera descripción de tracoma se encuentra en el Papiro Ebers que data del año 1500 A.C. (1). En 1895 se describió una relación entre casos de neumonía en humanos que habían estado en contacto con aves psitácidas, en 1930 se aisló el agente causal de la psitacosis y dos años después se describió por primera vez el ciclo de desarrollo intracelular de este agente. En 1934 Thygerson identificó un parecido en el ciclo de desarrollo del agente de la psitacosis con aquel que causaba tracoma (2).

Fue en 1936, en un rebaño de ovinos de Escocia, cuando Greig describió casos de abortos a los que les dio el nombre de Aborto Enzoótico de los ovinos (AEO) el cual se creía se producía a causa de carencias nutricionales (3). No obstante en 1950 Stamp demostró que se trataba de una enfermedad infecciosa causada por un microorganismo del grupo linfogranuloma venéreo psitacoso (4). Sin embargo, por varios años los integrantes del género *Chlamydia* fueron clasificados como virus debido a su incapacidad de crecer fuera de células vivas, posteriormente se les dio una clasificación intermedia entre virus y bacterias (5).

Con la llegada de técnicas más desarrolladas y con la introducción del microscopio electrónico se pudieron realizar observaciones en las que se encontró que su pared celular semejaba a la de una bacteria Gram negativa, que poseía RNA y DNA, así mismo se realizaron ensayos en donde se descubrió su sensibilidad a antibióticos, de este modo en 1966 se les clasificó como bacteria, reconociendo dos especies; *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci* (6,7).

En años consecutivos esta familia sufriría cambios importantes, dándose el primero en los años 80 a consecuencia del desarrollo de la clasificación basada en el DNA, se adicionaron *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*, para 1993 se reconocieron un total de 9 especies (*C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. pneumoniae*, *C. abortus*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. caviae* y *C. pecorum*), pero en 1999 vendría otra

reclasificación importante por parte de Everett y colaboradores, en la cual esas nueve especies se agruparían en dos géneros; *Chlamydia* y *Chlamydophila*, considerando características de tipo morfológico, patogénicas, epidemiológicas y análisis genéticos (8).

La clasificación no fue bien aceptada entre la comunidad científica y no fue adoptada uniformemente, así que en el 2011 se retomó un solo género; *Chlamydia* **Tabla 1** (9).

* **Phylum:** *Chlamydiae*, * **Clase:** *Chlamydia*, * **Orden:** *Chlamydiales*, * **Familia:** *Chlamydiaceae*, * **Género:** *Chlamydia*, * **Especies:** 9.

Especies	Hospedero principal	Antigua clasificación	
		<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydophila</i>
<i>C. trachomatis</i>	Humanos	✓	
<i>C. suis</i>	Porcinos	✓	
<i>C. muridarum</i>	Ratones	✓	
<i>C. psittaci</i>	Aves		✓
<i>C. felis</i>	Gatos		✓
<i>C. abortus</i>	Ovinos, caprinos, Bovinos		✓
<i>C. caviae</i>	Cuyes		✓
<i>C. pecorum</i>	Bovinos, Porcinos, Koalas		✓
<i>C. pneumoniae</i>	Humanos, Koalas, caballos		✓

Tabla 1.- Clasificación actual y antigua del género *Chlamydia* (7).

1.2 *Chlamydia spp.*

Chlamydia es una bacteria Gram negativa, de forma cocoide, no móvil, intracelular obligada ya que no es capaz de producir eficientemente compuestos de alta energía como el ATP, posee un genoma de entre 1.1 – 1.25 Mb (10).

Presenta un ciclo de desarrollo multimórfico asincrónico, el cual cuenta con dos formas de la bacteria, denominadas cuerpo elemental (CE) y Cuerpo reticular (CR) **Figura 1**. Dentro de la célula estos cuerpos residen dentro de una vacuola a la que se le conoce como Inclusión (9). Ambas formas poseen lipopolisacáridos (LPS) y a diferencia de la pared celular bacteriana típica no posee ácido murámico, por lo que en lugar de peptidoglicano, la pared está constituida de proteínas de membrana externa que se entrelazan por puentes disulfuro confiriéndole rigidez, exhibe proyecciones de forma hexagonal conformadas por nueve subunidades que forman el sistema de secreción tipo III (9,11).

Estructura y ciclo de desarrollo:

El CE tiene un tamaño de entre 0.2 y 0.4 μm de diámetro, es antigénico, no proliferativo, posee una pared trilaminar rígida que lo hace ser osmóticamente estable (12,13) y el ADN se encuentra altamente compactado (9).

El CR tiene un tamaño aproximado de 0.6 y 1.2 μm de diámetro, su ADN está menos denso, no son antigénicos, obtiene nutrientes del citoplasma de la célula y se multiplica por fisión binaria, posee un menor número de enlaces disulfuro entre sus proteínas de membrana por lo que son lábiles, osmóticamente inestables e incapaces de infectar otras células (12,14).

El ciclo de desarrollo de *Chlamydia* puede dividirse en 5 eventos importantes:

- 1) Adherencia y entrada. 2) Transformación primaria. 3) División. 4) Transformación secundaria. 5) Liberación de nuevos cuerpos elementales.

Adherencia y entrada:

Se desarrolla en dos sucesos: El primero se da por una interacción electrostática reversible, el segundo evento es irreversible al darse el reconocimiento específico ligando-receptor entre el CE y la célula huésped (9,15).

Transformación primaria

Tras la entrada de los cuerpos elementales a la membrana de la bacteria, estos forman poros para ser permeables al ATP del hospedador (9). Al penetrar metabolitos como fosfatos ricos en energía y aminoácidos, aumenta su actividad metabólica y forma proteínas involucradas en la translocación de moléculas, en la modificación de la inclusión y otras funciones desconocidas, de este modo el cuerpo elemental se transforma en reticular (10–12,14).

La inclusión intercepta vesículas derivadas del aparato de Golgi, de donde obtiene esfingomiélin y colesterol que utiliza para asemejar una vesícula exocítica, de tal modo que no es detectada y evade su destrucción (16,17).

División celular

La multiplicación de *Chlamydia* se da por fisión binaria de los CR, las primeras divisiones pueden ser observados de 8-10 horas post infección, la inclusión crece llegando a ocupar gran parte del citoplasma y desplazando al núcleo a la periferia, el ciclo termina alrededor de 40 a 72 horas después de la infección, cuando la célula hospedadora no puede mantener las exigencias de nutrientes de parte de las *Chlamydias* en división (9,11).

Transformación secundaria

Los cuerpos reticulares madurarán al reducir su tamaño y reorganizar su pared celular, dando la formación de cuerpos intermedios y posteriormente a los CE, la transformación se da de modo asincrónico por lo que se pueden encontrar mezclados diferentes estadios de maduración de los CR dentro de la misma inclusión en las últimas horas del ciclo (12,18).

Salida

Se han caracterizado dos modelos independientes que ocurren aproximadamente con la misma frecuencia *in vitro*:

1) Lisis 2) Extrusión

La **lisis** es un proceso rápido que se da la por la disgregación de la membrana de inclusión y de la membrana plasmática como resultado de la acción de varias proteasas, liberando las *Chlamydias* junto con restos de la célula.

La **extrusión** es un proceso lento, en el cual se da el empaquetamiento de varios cuerpos clamidiales en vesículas provenientes de la inclusión para después ser liberadas envueltas en la membrana celular (19).

El ciclo se puede detener, permanente o temporalmente en la fase de cuerpo reticular, denominándose entonces cuerpo persistente, estos son cuerpos reticulares más grandes, que se dividen lentamente. Uno de los mecanismos que induce un estado persistente es la presencia de interferón gamma (IFN- γ). Este estado críptico conlleva la reducción en la expresión de antígenos, cambios de la morfología y la pérdida de la infectividad. Esta fase puede ser temporal y luego continuarse el ciclo, los cuerpos persistentes podrían ser una adaptación de la bacteria al hospedador para evitar el sistema inmunológico, reducir una virulencia innecesaria o mantenerse viable en condiciones adversas (12,16).

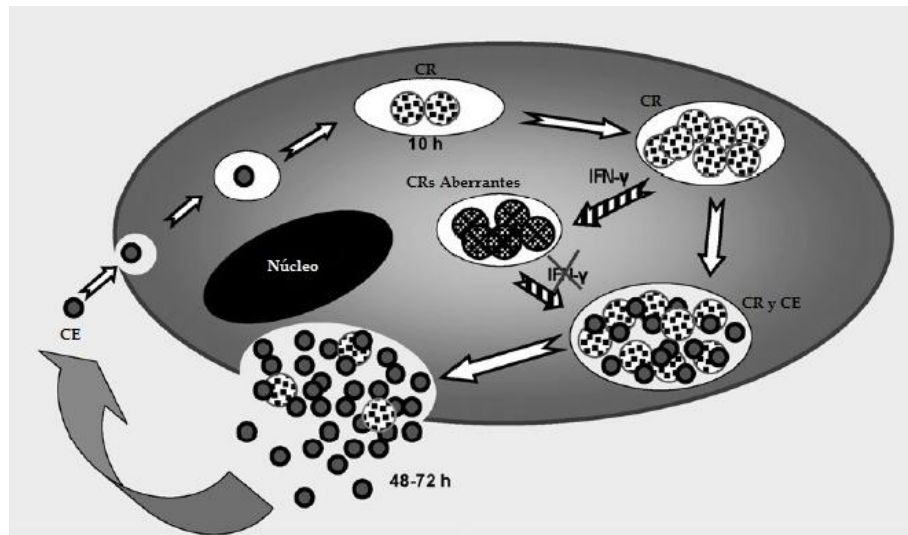


Figura 1.- Ciclo de desarrollo de *Chlamydia* spp. Inicia con la unión de CE a la célula huésped formando una inclusión citoplasmática, los CE se diferencian a CR para replicarse, posteriormente se reorganizan en CE y salen de la célula. Ante altos niveles de IFN- γ los CR adoptan formas aberrantes que pueden revertir al eliminar las condiciones adversas para la bacteria. Tomado de Caro, M. et al. 2009 (20).

1.3 Aborto enzoótico de los pequeños rumiantes

Definición

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR) es una enfermedad infecciosa que causa afecciones de tipo reproductivo, como abortos, nacidos muertos o nacidos débiles que mueren poco después, ocurre en ovinos, caprinos y puede darse también en bovinos. Su agente etiológico es *Chlamydia abortus*, tiene una distribución mundial, ha sido reconocida como la principal causa de pérdidas reproductivas en cabras y borregos en países del norte de Europa, se ha reportado que *C. abortus* ha provocado aproximadamente el 44% de todos los abortos infecciosos diagnosticados en el Reino Unido (21).

AEPR se presenta típicamente en el último tercio de la gestación, alrededor de las últimas dos o tres semanas, más comúnmente como resultado de una infección persistente, los animales infectados resultan muy complicados de diagnosticar ya que usualmente no se presentan signos clínicos previos al aborto aunque en algunos individuos se pueden observar descargas vaginales 24 horas antes de que se dé el aborto (21,22).

El impacto económico de estos abortos es muy alto, dado que un tercio de los animales gestantes en un rebaño, ocasionalmente más, abortarán a la siguiente época de parición después de la primera exposición a *C. abortus*, estos niveles altos de abortos persistirán durante dos o tres años hasta que casi todas las hembras del rebaño hayan abortado, posteriormente la enfermedad adquiere un carácter cíclico en el que solo hay de 1 al 5% de abortos, hasta que exista un nuevo brote cuando el rebaño haya sido repoblado con hembras primíparas (23).

Transmisión

El ciclo inicia con la introducción del patógeno al hospedador, el foco principal de infección son los abortos, membranas placentarias y fluidos vaginales, de tal modo que las principales rutas de transmisión son a través de contacto directo con estos

elementos, por ingesta de alimentos contaminados, o por inhalación de aerosoles del ambiente contaminado. Sucesivo a éste primer contacto se da la primera infección en tonsilas, donde *C. abortus* se multiplica para después diseminarse por sangre o linfa hasta llegar a colonizar órganos secundarios como el hígado, bazo y pulmones, en donde permanecerá indetectable (24,25). Si estas hembras se encuentran en las últimas 5 o 6 semanas de gestación o bien no están gestantes, desarrollarán una infección latente mostrándose aparentemente sanas hasta la siguiente temporada de partos (26). Las cabras con menos de 100 días de gestación son las más susceptibles, aunque pueden infectarse a cualquier edad si las condiciones de riesgo están presentes (23).

Patogenia

Tras la gestación de la cabra la modulación inmune libera a la bacteria de su estado de supresión permitiendo su multiplicación en los órganos de colonización secundarios, provocando una segunda bacteremia que inicia con la infección de la placenta (27,28).

Alrededor del día 60 de la gestación, se desarrollan hematomas en los hilios de la interface materno-fetal de los placentomas debido a la fusión entre células binucleadas trofoblasto fetales y las células maternas (29), lo que resulta en un intercambio de sangre entre el feto y la madre, es probable que *C. abortus* aproveche este evento para pasar de la madre al feto y así se establezca en las células epiteliales del trofoblasto.

La patología placentaria se observa a partir del día 90 de gestación, sin embargo se han detectado anticuerpos contra *C. abortus* alrededor del día 60 de la gestación, coincidiendo con la aparición de los hematomas (30). Una vez en la placenta, *C. abortus* crece eficientemente y se extiende fuera de la región intercotiledonaria del corion, ocasionando daños en el epitelio, edema e inflamación causada por la infiltración de neutrófilos, macrófagos linfocitos y células plasmáticas, el nivel de inflamación es variable, ya que no todos los placentomas se infectan (31).

La principal característica patológica en las infecciones por *C. abortus* es la necrosis del epitelio endometrial y del trofoblasto fetal (32). El daño causado por la inflamación modifica el desarrollo del corioalantoides, es por esto que se piensa que el aborto es una consecuencia de diversos factores en las que las funciones de la placenta son

interrumpidas; la función metabólica: por trombosis vascular inducida por citocinas compromete el intercambio de nutrientes y oxígeno que lleva a un estrés fetal; la disrupción del epitelio coriónico por un crecimiento descontrolado de *C. abortus* provoca la pérdida de la función endócrina en la que hormonas esenciales para el mantenimiento de la gestación no pueden ser producidas por la placenta, tales como la progesterona, el estradiol y lactógeno placentario (22,33,34). Todos estos factores pueden conllevar a que en los dos últimos meses, particularmente en las últimas dos semanas de la gestación se dé el aborto, en el cual se liberará una gran cantidad de *Chlamydias*.

Las hembras que hayan abortado una vez desarrollarán inmunidad que las protegerá en la siguientes gestaciones y su futuro potencial reproductivo no se ve comprometido, sin embargo podrán seguir eliminando la bacteria en cada temporada de parición de siete a catorce días después del parto, se ha reportado hasta por un periodo de tres años (35).

Signos clínicos y lesiones:

Aunque la enfermedad cursa sin signos clínicos aparentes, pueden observarse descargas vaginales hasta 48 horas antes de la pérdida del producto, estas descargas pueden continuar por dos o tres semanas (36).

Se pueden encontrar membranas placentarias necróticas, engrosadas de color amarillo rojizo con aspecto arenoso, exudado vaginal de color rosa con apariencia sucia, los fetos abortados usualmente están bien desarrollados y no tienen anomalías anatómicas graves (22,31). En algunos casos se puede observar cubiertos de material amarillento o rojizo, edema subcutáneo o difuso, no hay lesiones macroscópicas específicas, histológicamente afecta abomaso, hígado, bazo, pulmón, en caso de que la inflamación haya sido severa se puede encontrar evidencia de hipoxia en el cerebro (32).

Zoonosis

El control de esta enfermedad no solo es importante desde el punto de vista de la sanidad animal, sino que además representa un riesgo zoonótico para los grupos expuestos ocupacionalmente en actividades pecuarias durante el manejo y cuidado de animales enfermos o portadores asintomáticos. El riesgo se incrementa en sujetos

inmunocomprometidos y en mujeres embarazadas, ocasionando abortos espontáneos, si la infección ocurre en el primer trimestre puede causar mortinatos y labor prematura (5). Se ha aislado *C. abortus* en casos de abortos en mujeres de países como Francia, USA, Suiza, Países bajos, Italia, Reino Unido, por mencionar algunos, adicionalmente al aborto, pueden aparecer complicaciones, como falla renal aguda, coagulación intravascular diseminada o dificultades respiratorias que requieren ventilación mecánica, rara vez es fatal cuando se diagnostica a tiempo y se aplica terapia adecuada (30,37).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se puede realizar con base en el historial clínico del rebaño, el periodo de tiempo del aborto (últimas dos a tres semanas de la gestación) y observación de las lesiones en las membranas placentarias, Se debe realizar un diagnóstico diferencial de otros patógenos que causan abortos al final de la gestación, tales como *Brucella melitensis*, *Coxiella burnetti*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Toxoplasma gondii*, *Campilobacter fetus*, *Salmonella abortus*, o bien con abortos no infecciosos, el diagnóstico se puede dar de forma directa; detectando los cuerpos clamidiales o bien indirectamente detectando los anticuerpos contra *Chlamydia* (7).

Frotis: Se realizan a partir de las vellosidades coriónicas afectadas, para teñir se utiliza Machiavello modificado, Gimenez, Giemsa, Stamp o Ziehl Neelsen modificado (38)

Serología: Una de las primeras pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de *Chlamydia* fue la fijación del complemento; sin embargo, debido a su dificultad para la estandarización y de su falta de especificidad, se prefiere utilizar la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ésta ha sido una de las principales herramientas de diagnóstico gracias a su rapidez, facilidad, por ser adecuada para el análisis de un gran número de muestras (39), y por tener alta sensibilidad y especificidad. Se basa en el reconocimiento de 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 (40,41).

Detección DNA: Tras la introducción de la PCR se aumentaron considerablemente las posibilidades de la detección de *Chlamydia*, aportando grandes ventajas como lo es la diferenciación de la especie, la rapidez al no tener que recurrir al cultivo celular y su alta sensibilidad (42). Sin embargo, hay que tomar en cuenta el riesgo de contaminación cruzada entre muestras y la producción de falsos negativos resultantes de las sustancias inhibidoras del PCR en las mismas muestras (38).

Aislamientos: Se puede realizar a partir de cotiledones, membranas placentarias, hígado pulmones fetales y exudado vaginal; estas muestras deben mantenerse en el medio de transporte específico para *Chlamydia*: Sacarosa/fosfato/glutamato (SPG) para ayudar a preservar la viabilidad de la bacteria cuando deba ser congelada. *C. abortus* sólo puede aislarse en células vivas; por tanto, se requiere disponer de instalaciones y equipos para el cultivo en embriones de pollo o en cultivos celulares, con las correspondientes medidas en cuanto a contención de bioriesgo (43). Posterior a la infección se debe realizar la técnica de inmunofluorescencia para poder visualizar al agente patógeno.

2 Impacto del AEPR en la caprinocultura mexicana

2.1 Caprinocultura en México

Las cabras son uno de los pocos animales que pueden aprovechar eficientemente zonas áridas, semiáridas, trópico, zonas templadas y utilizar diferentes tipos de forrajes, lo cual da ventaja a nuestro país al tener las condiciones para la cría de caprinos en casi todo su territorio, las cabras pueden contribuir a la industria del país a través de la venta de leche, carne, venta de estiércol, cueros y subproductos lácteos, como el queso, la cajeta, dulces y cremas, productos que son bien pagados a causa de la alta demanda que se ha acrecentado en los últimos años (44).

A pesar del enorme potencial que la caprinocultura podría tener en nuestro país, su situación en México ha estado marcada por grandes rezagos tecnológicos, el alto costo de los insumos, servicios y la ausencia de los requerimientos mínimos de material, instalaciones, equipo y problemas sanitarios han sido la causa de que no se haya logrado un desarrollo pleno en este sector; sin embargo, es importante hacer notar que a pesar de todos estos obstáculos en el 2010 existían alrededor de 494,000 unidades de producción caprina y aproximadamente 1.5 millones de mexicanos se relacionaron con esta actividad productiva de forma primaria o secundaria (45).

Las cifras preliminares de la población caprina del año 2012 arrojan un número de 8,743,949 cabezas en el país, siendo Puebla el estado con mayor cantidad 1,291,119, seguido por Oaxaca con 1,193,426 cabezas y en tercer lugar Coahuila con 663,349 cabezas (46), en este mismo año se produjeron 155,636 miles de litros de leche, con un valor total de producción de \$731,179,000, siendo Coahuila el estado que más reporto con una cantidad de 53,382 miles de litros de leche, seguido por Guanajuato con 31,664 miles de litros de leche y Durango con un aporte de 30,163 miles de litros de leche, en cuanto a la carne en canal, se obtuvieron en este mismo año 41,492 toneladas, con un valor total de producción de \$1,867,178, siendo nuevamente Coahuila el mejor productor con 5,081 toneladas, seguido de Zacatecas con 4,045 toneladas, y por Oaxaca con 4,033 toneladas de carne en canal (47). Enfermedades de tipo reproductivo podrían tener repercusiones en el desarrollo de de la caprinocultura y un retroceso en los logros obtenidos.

2.2 Situación del AEPR en México

De acuerdo a la norma oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995 del Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica, la cual previene, controla y erradica plagas que afecten a la ganadería nacional, se han clasificado las enfermedades en tres grupos según su presencia o ausencia en el país y al impacto que representan, el aborto enzoótico o clamidiosis se encuentra clasificada en el grupo I, en el cual se consideran aquellas enfermedades transmisibles con gran poder de difusión que no existen en el territorio nacional o en parte de éste y cuya aparición tendría graves consecuencias de tipo sanitario, socioeconómico y de comercio nacional e internacional, por tal motivo es de notificación inmediata y obligatoria (48,49).

A pesar de que en la actualidad *C. abortus* continúa en este grupo se tienen reportes de su presencia desde hace varios años, fue desde la década de los 90, cuando se empezó a sospechar de la participación de *Chlamydia* en abortos de ovinos del altiplano (50), En 1997 se realizó el primer reporte de aislamiento de lo que en aquel momento era *C. psittaci* serotipo 1, hoy *C. abortus*, en cabras (51). En el 2001 se demostró la presencia de *Chlamydia* en un proceso zoonótico, en nuestro país, a partir de ganado caprino infectado (52), Por medio de serología y aislamiento se demostró en el 2004 la presencia de *C. abortus* en borregos del estado de México, en el 2005 y 2006 se encontró en hatos caprinos de Michoacán (53,54), en el 2008 en borregos de los municipio de Almoloya de Juárez y Xalatlaco, en el estado de México (55), en el 2011 se realizó un estudio en cabras de Guanajuato en donde se aisló *C. abortus* del 26.9% de cabras muestreadas y se obtuvo una seropositividad del 9.60% (56), estas observaciones fueron corroboradas en una publicación del 2014 en la que por medio de ELISA recombinante y PCR se identificó *C. abortus* en rebaños lecheros de Guanajuato (57).

En el 2013 se realizó un trabajo en el cual se detectaron anticuerpos específicos contra *C. abortus* mediante la prueba de ELISA (Kit Instituto Pourquier®, Francia) en personas expuestas a riesgo en explotaciones ovinas en Xalatlaco, se mostró una baja prevalencia de anticuerpos, no obstante la simple presencia de sueros positivos indica que la bacteria ha tenido contacto con las personas en por lo menos los cinco años siguientes a su aislamiento en dicho municipio (37).

3 JUSTIFICACIÓN

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes representa una de las principales causas de abortos en hatos de ovinos y caprinos a nivel mundial, lo que resulta en grandes pérdidas económicas en estos sectores. Debido a su relevancia, en México ha sido clasificada en el grupo I de enfermedades exóticas que representan riesgos de tipo sanitario, socioeconómico y de comercio nacional e internacional, por lo cual la introducción al país de los elementos necesarios para su diagnóstico, control y prevención se encuentra bajo estricta regulación. Actualmente se cuenta con reportes de abortos a causa de *C. abortus* en diferentes estados de la república mexicana, por lo que es de vital relevancia confirmar estos reportes mediante la detección y aislamiento del agente etiológico, *C. abortus*.

La falta de disponibilidad de los métodos diagnósticos deriva en la ausencia de control sobre la enfermedad y en el desconocimiento del impacto real del AEPR en nuestro país. Se ha reportado que en países como España y Reino Unido, *Chlamydia* es la causa del 50% de todos los abortos infecciosos diagnosticados, representando pérdidas de hasta £20 millones anuales (58,59). Si el AEPR permanece como una enfermedad exótica en nuestro país seguirán sin autorizarse el uso de pruebas diagnósticas, en la actualidad países europeos utilizan sistemas inmunoenzimáticos especializados que logran el diagnóstico rápido y preciso durante brotes de abortos.

En nuestro país es necesario demostrar la participación de este agente patógeno en casos de abortos, para de este modo implementar y estandarizar pruebas de diagnóstico rutinarias para *C. abortus*.

4 Hipótesis

- * *Chlamydia abortus* está presente en rebaños caprinos con problemas de aborto en México.

5 Objetivos generales

- * Determinar la presencia de *C. abortus* en casos de abortos en rebaños caprinos de los estados de Veracruz, Jalisco, Coahuila, Querétaro y Puebla.

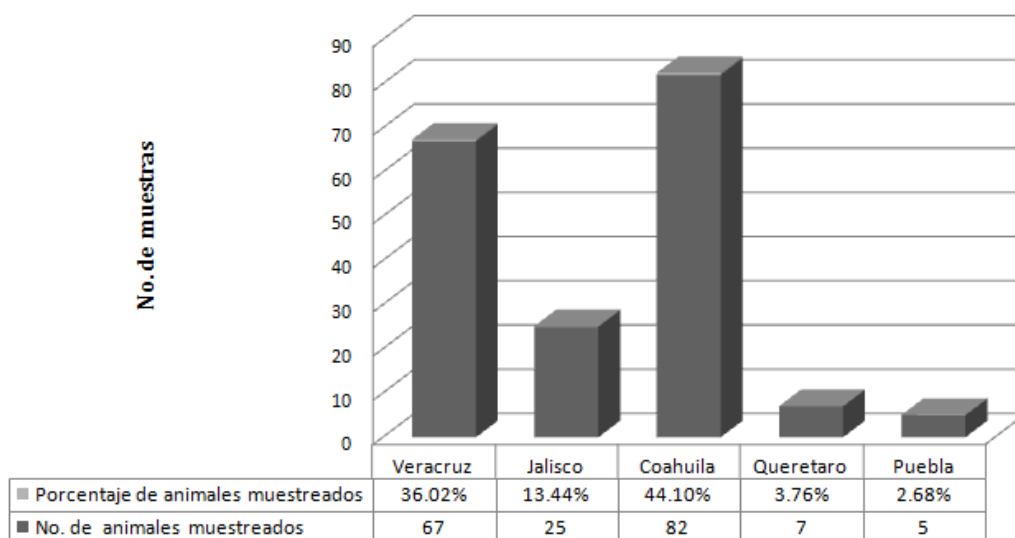
6 Objetivos específicos

- * Aislamiento de *C. abortus* utilizando las muestras de exudado vaginal de cabras y de fetos abortados en cultivo celular de fibroblastos de ratón (L929).
- * Detección de *C. abortus* por medio de inmunofluorescencia directa.
- * Identificación de *C. abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando una región de los genes ribosomales 16S, 5S y 23S.

7 Material y Métodos

7.1 Muestreo

Los exudados vaginales fueron obtenidos de rebaños con problemas de abortos, procedentes de los estados de Veracruz en donde se obtuvieron 67 muestras (36.02%), Jalisco con 25 muestras (13.44%), Coahuila con 82 muestras (44.10%), Querétaro con 7 muestras (3.76%) y Puebla con 5 muestras (2.68%) (**Gráfica 1**). De estos estados se muestrearon 14 municipios y de estos 49 rebaños, en el estado de Veracruz se evaluaron 18 rebaños provenientes de los municipios de Centalpan Ayahualco, Coacoatzintla, Cosautlán de Carvajal, Jilotepec, Teacelo, Tepletlán, Totalco. En Jalisco el muestreo se realizó de 3 rebaños provenientes del municipio de Monte real Tonaya, en Coahuila las muestras se obtuvieron de 24 rebaños originarios de Matamoros, Viesca y Zaragoza, en Querétaro se obtuvieron de un solo rebaño del municipio de Tequisquiapan, y en Puebla se evaluaron 3 rebaños de los municipios Libres y Tepeyahualco. En total se obtuvieron 186 muestras.



Gráfica 1.- Estados de la república muestreados.

Se seleccionaron cabras con aborto reciente o cabras recién paridas con historial de abortos, se tomaron muestras de exudado vaginal dentro de un periodo de dos a tres semanas después del parto o del aborto; de igual modo se obtuvieron muestras de

líquido abomasal de dos fetos abortados. En el caso particular de Puebla los exudados vaginales se realizaron más de un mes después del periodo de parto o aborto, tiempo que ha sido referido como el momento óptimo para la detección de *C. abortus* (36)

7.2 Transporte de muestras clínicas

Las muestras se tomaron con hisopos estériles, y se transportaron al laboratorio en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml, adicionado con 2 ml de SPG (sacarosa–fosfato /glutamato), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO, EE.UU.) y gentamicina (Invitrogen™, EE.UU) Anexo1 (42) a 4°C. En el laboratorio se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

Los hisopos fueron esterilizados y manejados como residuos biológicos-infecciosos antes de ser desechados. El medio de transporte que contenía las muestras fue transferido a microtubos estériles identificados y conservados a -20 °C.

Todo el manejo de la bacteria viva o de las muestras en medio SPG se realizó en gabinete de seguridad (Veco, BH-012).

7.3 Aislamiento e identificación de *Chlamydia spp* en cultivo celular

Los aislamientos y la propagación de la cepa A.22 de *C. abortus*, se realizaron en el laboratorio de bioseguridad del departamento de microbiología e inmunología de la FMVZ certificado ante SAGARPA.

La cepa de referencia A.22 previamente *C. psittaci* A.22 fue aislada de un aborto ovino en Inglaterra, Proveniente del Central Veterinary Laboratory, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB United Kingdom. Donada por Petter C. Griffiths, en el año 1993.

Permiso de importación otorgado por el Departamento de Autorizaciones Zoosanitarias. Dirección General de Salud Animal NO, 0012839, agosto 23, de 1993, otorgado a la MVZ Cristina Escalante Ochoa. Certificado Zoosanitario de importación No. 27491. Propiedad de la FMVZ-UNAM.

Previo a la infección con las muestras clínicas, se propagaron monoestratos celulares de fibroblastos L929 de ratón en botellas de poliestireno de 75 cm² (NUNC™). Las células fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle (Invitrogen™, EE.UU), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), aminoácidos no esenciales 1% (NEAA, GIBCO, EE.UU.), L-Glutamina 1% (Invitrogen™, EE.UU) en condiciones de humedad en incubadora (NAIRE, UN-4750) a 37°C con un 5% de CO₂ (50).

Se utilizaron placas de poliestireno (NUNC™) de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio estériles de 12 mm de diámetro para la identificación de cuerpos clamidiales por la técnica de inmunofluorescencia, en paralelo se hizo uso de placas de 24 pozos sin cubreobjetos para efectuar pases ciegos adicionales en caso de ser necesario. La concentración celular que se empleó fue de 0.9 X 10⁵ células por pozo, dejándose incubar 24 h hasta obtener un 80-90% de confluencia (56).

7.4 Proceso de infección

Una vez alcanzada la confluencia de 80-90% se retiró el MEM-C por completo de cada uno de los pozos e inmediatamente se agregaron 100 µl del inóculo/pozo. Por cada muestra clínica se utilizaron 2 pozos, uno por placa. Cada placa contó con una muestra testigo positivo y testigo negativo.

Las placas se colocaron en incubación durante 1 h a 37°C, para facilitar la infección se transportaron a una incubadora orbital por 30 min más, a 37°C y 50 rpm en condiciones de humedad (60). Tras este tiempo se agregaron 900 µl de MEM-C, adicionado con gentamicina 50 µg/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Invitrogen™, EE.UU.) a cada pozo. Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C con un 5% de CO₂ durante 72 h.

Al concluir el periodo de incubación, se realizó un raspado en los pozos de las placas sin cubreobjetos para obtener el tapete celular, las células junto con el MEM se conservaron en microtubos estériles identificados y 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) de 5 min cada uno. Una vez retirado por completo el PBS se fijaron las muestras con 1 ml de metanol puro, en algunos casos se

sustituyó por acetona, ambos a -20°C por pozo, las placas se conservaron a -70°C hasta que se realizó la inmunofluorescencia.

7.5 Determinación de cuerpos de inclusión

Para la identificación de las inclusiones intracitoplasmáticas producidas por *C. abortus* se empleó la técnica de inmunofluorescencia directa utilizando la prueba comercial IMAGEN™ Chlamydia test (OXOID, UK).

Esta prueba comercial detecta el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína.

Para realizar la inmunofluorescencia directa se tomaron los cubreobjetos previamente fijados con alcohol o acetona y conservados a -70°C, se extrajeron de las placas y se dejaron secar a temperatura ambiente. A cada cubreobjeto fijado se le aplicaron 25µl de Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) diluido 1/5 con PBS y se incubaron 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 y se secaron a temperatura ambiente (56).

Los cubreobjetos secos se montaron sobre portaobjetos limpios con el medio de montaje proporcionado en el Kit, fueron fijados al portaobjetos con una pequeña cantidad de barniz alrededor del cubreobjetos y se observaron en microscopio de luz ultravioleta (Olympus IX71 y Leica DM1000) con objetivos de 40x y 100x.

En caso de no visualizar inclusiones citoplasmáticas en la primera lectura, se realizaron pases ciegos de los inóculos que se habían conservado a -70°C, se realizó la infección de la misma forma antes descrita de nuevos monoestratos celulares.

Una muestra fue negativa si después de la realización de 2 pases ciegos no se detectaron inclusiones intracitoplasmáticas (38).

7.6 Propagación de la cepa de referencia *C. abortus* A.22

Se propagaron monoestratos celulares de fibroblasto de ratón L929 en botellas de poliestireno de 75 cm² (NUNC™). Las células fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle (InVitro), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), aminoácidos no esenciales 1%, L-Glutamina 1%, en condiciones de humedad en incubadora (NAIRE, UN-4750) a 37°C con un 5% de CO₂ (50).

Una vez que alcanzaron de 80-90% de confluencia se procedió a hacer la propagación preparando el inóculo para la infección en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml estéril, en el que para dos cajas de 75 cm² se prepararon 15 ml de DMEM, dietil-Amino-Etil-Dextrano en una concentración de 100 µg/ml (DEAE, Sigma-Aldrich, EE.UU.), y un aproximado de 1% de la cepa de *C. abortus*, en la botella donde se cultivaron las células se eliminó el DMEM, cuidando de no desprender el tapete celular, se aplicaron 5 ml del inóculo por botella (se prepararon 5 ml más del inóculo para prevenir algún imprevisto y tener suficiente durante la infección) y se incubaron por 1.5 hrs a 37 °C con 5% de CO₂, después de este tiempo se trasladaron a una incubadora de agitación orbital a 37 °C, 50 rpm durante 20 min. A continuación se adicionaron 15 ml de DMEM complementado por botella y se dejaron incubar bajo las mismas condiciones. A las 48 h post infección se detuvo la división de las células L929 al agregar 2 µg/ml de cicloheximida (Sigma-aldrich) por botella, se continuó su incubación hasta completar 7 días. Se realizó congelación a -70 y descongelación a 37°C cuatro veces, hasta observar que el tapete celular se hubiera desprendido en su totalidad, se colectó todo el medio y se transfirió a un tubo cónico de polipropileno de 50 ml y se centrifugó durante 10 min a 1,788 x g (Jouan, Modelo CR412) a temperatura ambiente, se obtuvo todo el sobrenadante, y se desechó la pastilla celular en la que quedaron los detritus celulares; el sobrenadante se repartió en microtubos de 2 ml los cuales se centrifugaron a 16,060x g durante 30 min a temperatura ambiente, a continuación solo se conservó la pastilla de todos los microtubos y se homogeneizaron en un volumen final de 600 µl del DMEM complementado, se conservó en un criotubo identificado a -70°C.

7.7 Extracción de ADN

Las muestras de exudado vaginal y de líquido abomasal de los abortos almacenadas a -20°C fueron homogeneizadas y de cada una se transfirieron 500 µl a un microtubo estéril el cual se inactivó mediante baño María (Cole Pamer, polystot, modelo 12105-30) a 80°C por 20 min.

A continuación se adicionaron 100 µl de Buffer NET (50 mM NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7.6) y 50 µl de SDS al 24% (Concentración final de 3.4%), seguido de una incubación a 80°C durante 10 min.

Al terminar la incubación se agregó RNAsa (Invitrogen™, EE.UU) a una concentración final de 75 µg/ml y se incubó por 2 h a 50°C. Transcurrido este tiempo se aplicó Proteinasa K (USB Corporation, Ohio, EE.UU) 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 (Fenol: Sigma-Aldrich, EE.UU, Cloroformo: JT BAKER, Alcohol isoamílico: JT BAKER) y se colocaron en un agitador orbital (LabLine modelo. 4630) durante 15 min. Finalizada la agitación se centrifugó a 16,060 x g durante 5 min a temperatura ambiente.

El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo, al que se le añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se homogeneizó, las muestras permanecieron inmóviles por un periodo de 2 h tras las cuales se centrifugó a 16,060 x g durante 15 min.

Se agregó 1 ml de etanol frío (-20°C) al 70% y se centrifugó durante 5 min a 16,060 x g, al final de la centrifugación se eliminó el etanol y se permitió que los restos de etanol se evaporaran durante toda la noche. Por último se resuspendió la pastilla con 25 µl de agua libre de DNAsas y se realizó la cuantificación de nucleótidos por espectrofotometría con un espectrofotometro NanoDrop ND-1000 (56).

7.8 Iniciadores

Para la identificación de *C. abortus* por PCR se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento de 342 pb el cual contiene la región final de la subunidad 16S, la subunidad 5S y una porción corta de la 23S (**Figura 2**). Los iniciadores fueron diseñados con el programa IDT SciTools Primer QuestSM, empleando la secuencia del operón ribosomal *C. abortus* A.22 depositada en el GenBank (56).

16S Forward (5'-TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGT-3')

16S Reverse (5'-GTCAATGCCAAGGCATCCACCAAT-3')

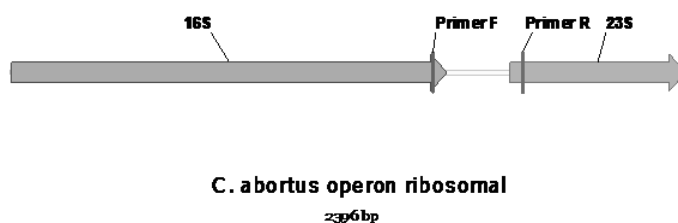


Figura 2.- Mapa del operón ribosomal de *C. abortus* 16S.

7.9 Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l, con los siguientes elementos:

1X de Buffer PCR (Thermo scientific, EE.UU), 3 mM de $MgCl_2$, 400 μ M de dNTP's (Thermo scientific, EE.UU), 25 pmol de cada uno de los iniciadores, 1 U de DreamTaq Polimerasa (Thermo scientific, EE.UU) y 25 ng o más de ADN, dependiendo de la cantidad y pureza obtenida de la extracción de las muestras clínicas, como control positivo se utilizó *C. abortus* A.22 y como control negativo se usó agua libre de DNAsas.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (PCR Express, Thermo Hybaid). El programa que se utilizó para la amplificación de *C. abortus* fue el siguiente:

Después de un periodo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, se realizaron 40 ciclos de 1 min a 95°C, 30 seg 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.

Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa al 1% (Thermo scientific, EE.UU) teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Para visualizar las bandas se utilizó un fotodocumentador (Kodak, Gel Logic200) (31). Las figuras fueron digitalizadas con el programa Kodak, Molecular Imaging Software v.4.0.2. (56)

7.10 Secuenciación

Las muestras que resultaron positivas a *C. abortus* por PCR fueron purificadas utilizando el sistema comercial QIAquick gel extraction, el ADN purificado fue obtenido en agua libre de DNAsas.

Para la reacción de secuenciación se utilizaron de 70 a 90 ng de DNA con 10 pmol del iniciado delantero y otro tubo de reacción con 10 pmol del iniciador reverso en un volumen final de 16 µl. La secuencia de nucleótidos fue determinada en ambas direcciones mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Foure-scence-Based Sequencing. La secuencia consenso y alineación de secuencias se realizó utilizando el programa de bioinformática vector NTI. La secuencia completa de nucleótidos fue sometida a la base de datos del GenBank para buscar homologías mediante el sistema Blast. La alineación se realizó con el programa ClustalW2 y el filograma se visualizó con el programa Tree view. La reacción de secuenciación fue realizada en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

8 RESULTADOS

8.1 Aislamientos

Se realizó la infección de las células L929 con las muestras clínicas y posteriormente se efectuó la técnica de inmunofluorescencia para visualizar inclusiones clamidiales. De las 186 muestras evaluadas se observaron inclusiones en 43 de ellas (23.11%), 13 pertenecieron al estado de Veracruz, 7 a Jalisco, 18 a Coahuila y 5 a Querétaro (**Tabla 2**).

Estado	No. De animales	Positivos a aislamiento	Porcentaje de positivos por estado	Negativos
Veracruz	67	13	30.23%	54
Jalisco	25	7	16.27%	18
Coahuila	82	18	41.86%	64
Querétaro	7	5	11.62%	2
Puebla	5	0	0%	5
	186	43		143
	100%	23.11%	100%	76.9%

Tabla 2.- Porcentaje de aislamientos bacteriológicos obtenidos de los 186 animales muestreados. Realizados mediante cultivo celular, con células L929.

De acuerdo a los aislamientos, el estado con más presencia de *C. abortus* en casos de abortos fue Coahuila con un 41.86% del total de aislamientos positivos. **Tabla 2.**

El criterio que se utilizó para asignar un resultado positivo a las muestras fue el siguiente; se buscaron inclusiones redondas fluorescentes de color “verde manzana” en el citoplasma de las células L929, tras su identificación, la observación del mismo campo se realizó bajo luz blanca, para determinar que la estructura se encontrara dentro de la célula y no sobre ésta. Se procuró una distribución uniforme de los elementos fluorescentes o inclusiones claras bajo ambas luces. Se presentaron casos en los que se observó puntilleo fluorescente en zonas determinadas con estructuras poco evidentes, estas muestras se tomaron como negativas y la fluorescencia se asoció a ruido de fondo (**Figuras de 3-6**).

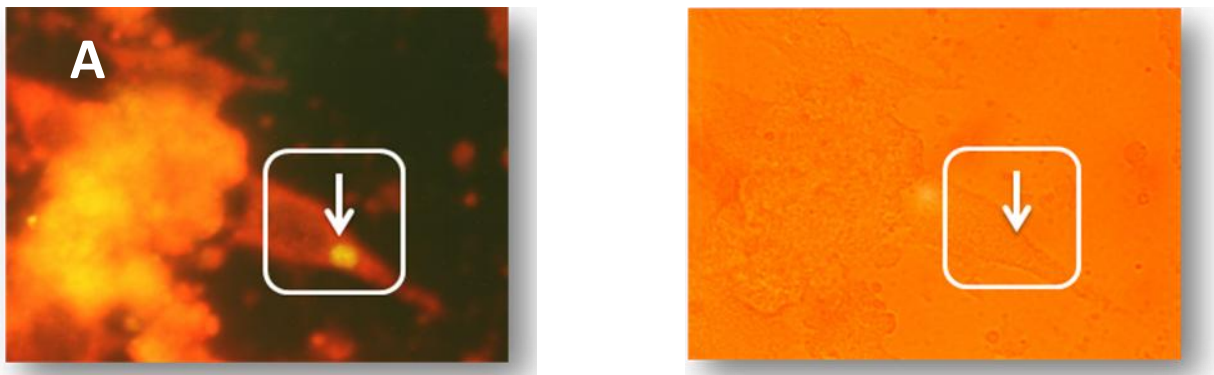


Figura 3.- Aislamiento positivo de exudado vaginal de cabra con aborto. Muestra procedente del estado de Coahuila, las flechas indican las inclusiones citoplasmáticas. La figura del lado derecho fue visualizada con microscopio de fluorescencia y la figura del lado izquierdo visualizada con luz blanca. Imágenes a 100x.

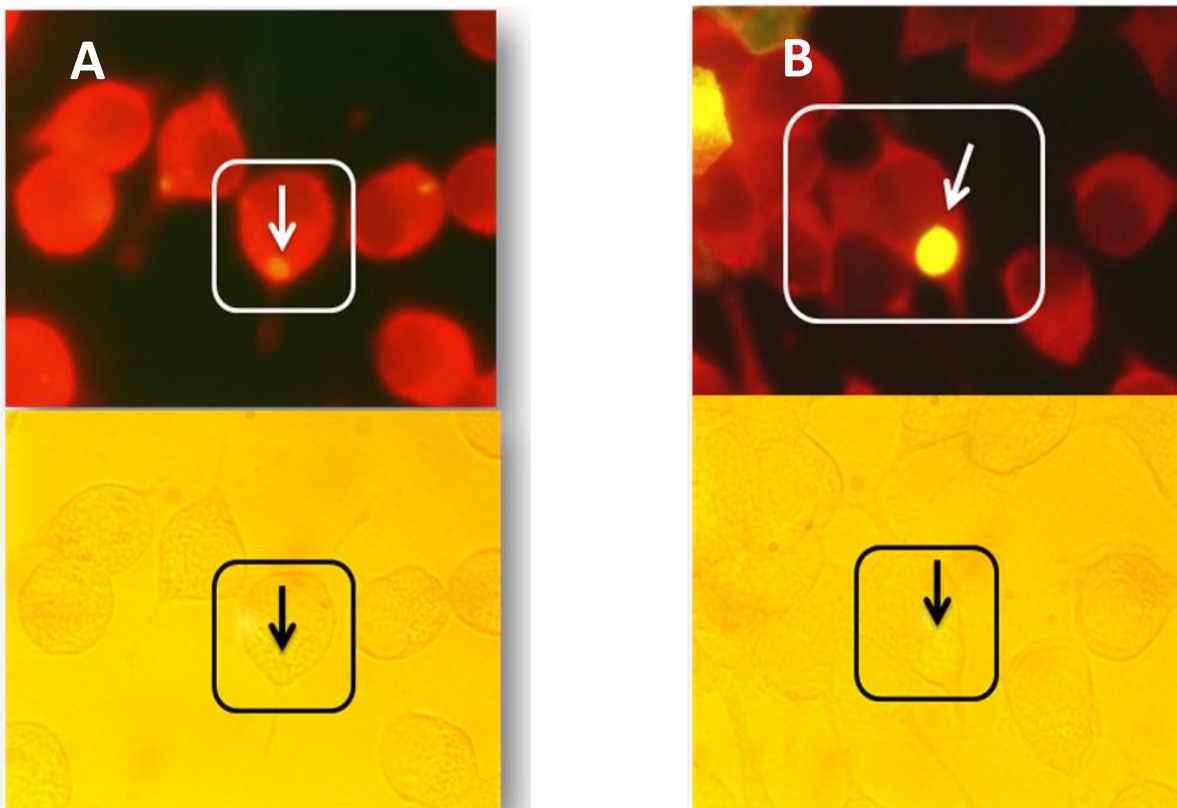


Figura 4.- Aislamientos positivos de exudados vaginales de cabras con aborto. Muestras procedentes de los estados de (A) Coahuila y (B) Veracruz. Las flechas indican inclusiones citoplasmáticas. La figura superior fue visualizada con microscopio de fluorescencia y la figura inferior visualizada con luz blanca. Imágenes a 100x.

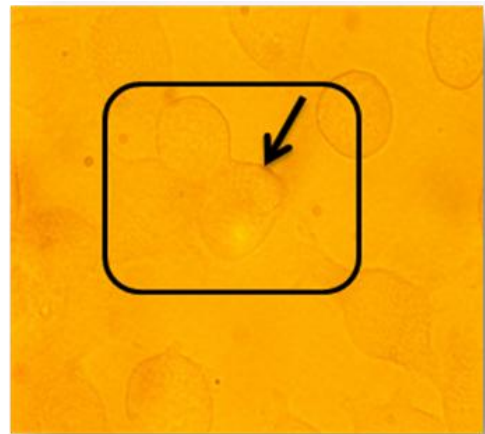
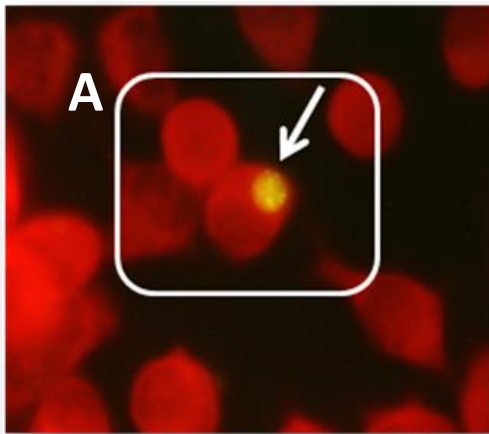


Figura 5.- Aislamiento positivo de exudado vaginal de cabra con aborto. Muestra procedente del estado de Coahuila, las flechas indican las inclusiones citoplasmáticas. La figura del lado derecho fue visualizada con microscopio de fluorescencia y la figura del lado izquierdo visualizada con luz blanca. Imágenes a 100x.

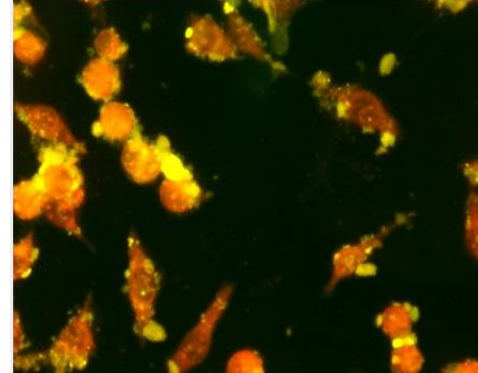
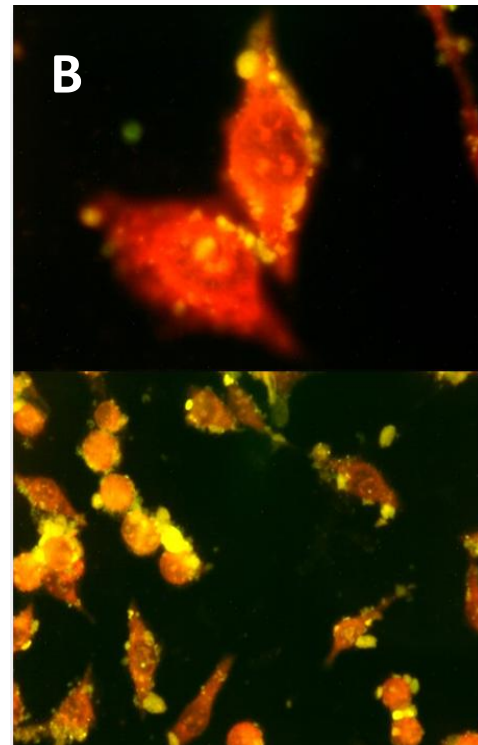
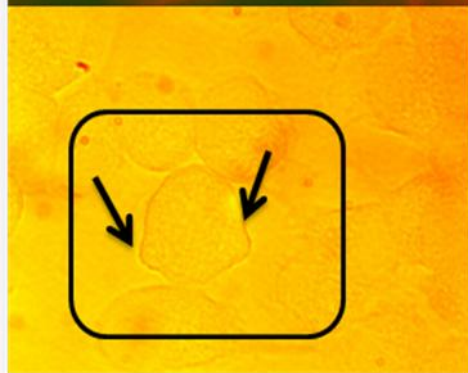
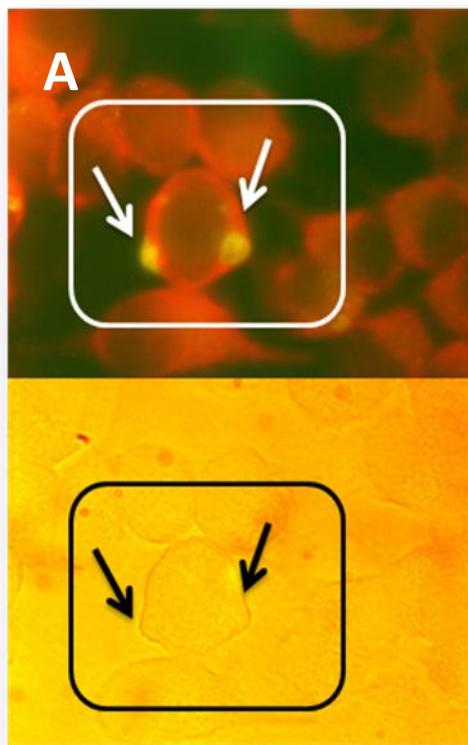


Figura 6.- Aislamientos positivos de exudados vaginales de cabras con aborto. Muestras procedentes del estado de Veracruz. Las flechas indican inclusiones citoplasmáticas. La figura superior fue visualizada con microscopio de fluorescencia y la figura inferior visualizada con luz blanca. (A) Imagen a 100x. (B) imagen superior a 100x, imagen inferior a 40x.

8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico fue realizada para la obtención de DNA proveniente de las 184 muestras obtenidas de exudado vaginal y de 2 muestras de liquido abomasal de abortos. Las PCR fueron efectuados a las 186 extracciones de ADN, sucesivo de una réplica, en el caso de positivos se realizó una segunda réplica.

C. abortus fue detectada en 17 de las muestras de exudado vaginal que fueron obtenidas en un periodo no mayor a un mes postparto o posterior al aborto, asimismo fue detectada en uno de los fetos abortados provenientes de Coahuila. De los 5 estados muestreados únicamente Puebla no mostró resultados positivos, la toma de muestras para este estado a diferencia de los demás estados se realizó fuera del periodo de partos, periodo que ha sido referida como la etapa en la que la bacteria es eliminada y puede ser detectada.

Por medio de ésta técnica se observó un 9.67% de positividad (**Tabla 3**), de las que se identificaron 2 muestras positivas de un mismo rebaño en el estado de Veracruz (11.11%), 5 muestras positivas de dos rebaños en Jalisco (27.77%), 5 muestras positivas de 5 rebaños distintos en Coahuila (27.77) y 6 muestras positivas de un solo rebaño en Querétaro (33.33%).

Estado	No. De animales	Positivos a PCR	Porcentaje de positivos por estado	Negativos
Veracruz	67	2	11.11%	65
Jalisco	25	5	27.77%	20
Coahuila	82	5	27.77%	77
Querétaro	7	6	33.33%	1
Puebla	5	0	0%	5
	186	18		168
	100%	9.67%	100%	90.32%

Tabla 3.- Número total de animales muestreados por estado y total de resultados positivos y negativos para la detección de ADN de *C. abortus* mediante la prueba de PCR.

Durante la visualización de los productos de amplificación de las muestras positivas se observó una ligera diferencia en el peso molecular entre los amplicones y el producto de amplificación de la cepa de referencia de *C. abortus* A.22 (**Figuras 7 y 8**).

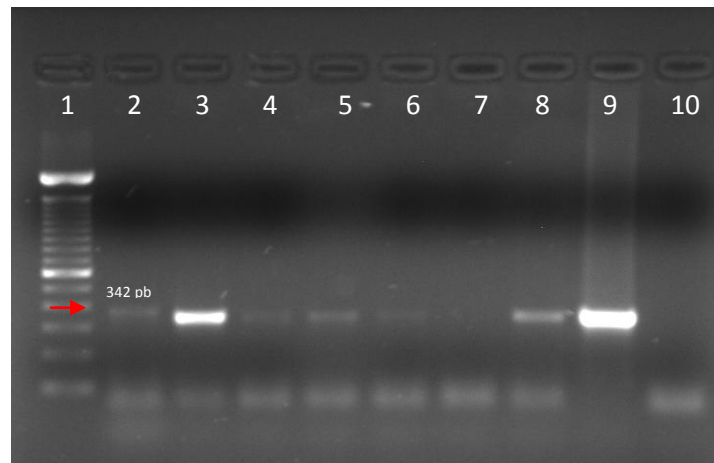


Figura 7.- Amplificación de la región del operón ribosomal de *C. abortus* en muestras de exudado vaginal de cabras que abortaron. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ 100bp). 2) Control positivo de *C. abortus* Cepa A.22. 3-9) Muestras provenientes de Querétaro. 10) Control negativo.

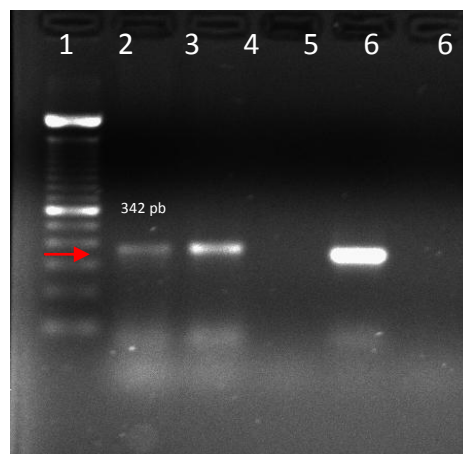


Figura 8.- Amplificación de la región del operón ribosomal de *C. abortus* en muestras de líquido abomasal de fetos abortados. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcador de peso molecular 100pb. 2-3) Control positivo de *C. abortus*, Cepa A.22. 4-5) Muestras de líquido abomasal de fetos abortados. 6) Control negativo.

La región que fue amplificada por el PCR abarcó una fracción de la subunidad 16S, la subunidad 5S y un fragmento corto de la subunidad 23S, estas regiones son muy conservadas, de tal manera que 7 productos de PCR obtenidos de muestras clínicas junto con el producto de la cepa de referencia de *C. abortus* A.22, fueron secuenciadas en ambos sentidos.

8.3 Secuenciación

Los productos de PCR positivos, así como el amplificado de la cepa control fueron purificados utilizando el sistema comercial Qiaquick (Qiagen) y enviados a secuenciar en ambos sentidos.

Por otro lado, se analizó la secuencia de nucleótidos de la cepa de referencia A.22 en el programa Vector NTI y se determinó la ubicación de la región ribosomal amplificada por el PCR. De esta manera se precisó la zona de amplificación que incluye 70 pb de la subunidad 16S ribosomal, una región intergénica de 105 pb, la subunidad 5S ribosomal de 115 pb, otra región intergénica de solo 3 pb y 49 pb de la subunidad 23S ribosomal (Figura 9).



Figura 9.- Secuencia de nucleótidos de la región de amplificación para el diagnóstico de *C. abortus* a través del PCR.

De los productos de amplificación purificados se secuenciaron 7 obtenidos a partir de muestras clínicas más el producto de la cepa de referencia *C. abortus* cepa A.22 (8), de las muestras clínicas solo se obtuvieron 6 secuencias adecuadas para su análisis (1G, 2, 3, 4, 6, 7). De la muestra 1G (Coahuila) y 2 (Veracruz) resultaron 342 pb, de la muestra 3 (Querétaro) se obtuvieron 148 pb, de la muestra 4 (Veracruz) se obtuvieron 265 pb, de la muestra 6 (Jalisco) se obtuvieron 273 pb, de la muestra 7 (Jalisco) se obtuvieron 167 pb y la muestra 8 correspondiente a *C. abortus* cepa A.22 se obtuvieron 302 pb.

Se obtuvo la secuencia consenso utilizando el programa Bioedit y Vector NTI, la secuencia fue sometida a la base de datos del GenBank utilizando el programa Blast-n para determinar homologías. Se encontró homología del 99% con las cepas de *C. abortus* cepa A.22, FAS, S26, EBA y VPG, entre otras (Tabla 4).

Cepa	Origen	Hospedador	Muestra utilizada	Acceso
<i>C. abortus</i> cepa A22	USA	Ovino	Aislado de aborto	U68444.1
<i>C. abortus</i> cepa LLG	Grecia	Capino	Aislado de aborto	EF486856.1
<i>C. abortus</i> cepa POS	Grecia	Ovino	Aislado de aborto	EF486857.1
<i>C. abortus</i> cepa B577	USA	Ovino	Aislado de aborto	U68445.1
<i>C. abortus</i> cepa EBA	USA	Bovino	Aislado de vaca	U76710.2
<i>C. abortus</i> cepa OSP	USA	Ovino	Aislado de aborto	U68446.1
<i>C. abortus</i> cepa S26/3	Escocia	Ovino	Aislado de aborto	CR848038.1
<i>C. abortus</i> cepa VPG	Grecia	Caprino	Aislado de aborto	EF486855.1
<i>C. abortus</i> cepa FAS	Grecia	Ovino	Aislado de aborto	EF486853.1

Tabla 4.- Cepas de *C. abortus*, origen, hospedadero y tipo de muestra.

Las secuencias obtenidas de las muestras clínicas y de la cepa de referencia se alinearon por medio del programa ClustalW2 Phylogeny y fueron comparadas con las secuencias de las diferentes cepas homólogas encontradas en el GenBank.

En las secuencias de las cepas de campo se observó una modificación en la base 98 del fragmento amplificado por PCR, correspondiente a la región intergénica entre la subunidad 16S ribosomal y la subunidad 5S ribosomal, en donde la base citocina que muestra la cepa de referencia es sustituida por una timina en las cepas de campo. Las secuencias de las cepas LLG y POS presentaron una diferencia en la base 151 de la región intergénica, la cual exponen una citocina a diferencia de la timina mostrada en las demás cepas. En la cepa B577 se observó la sustitución de una guanina por una adenina a nivel de la base 56, correspondiente con la subunidad 16S ribosomal.

Las cepas EBA, OSP, S26/3, VPG y FAS fueron idénticas a *C. abortus* cepa A.22 en la región de estudio (**Figura10**).

Las secuencias alineadas fueron visualizadas en un filograma realizado por medio del programa Tree view (Page, 1996). Se pudieron observar 3 clados, el clado principal agrupa a las cepas VPG, FAS, S26/3, OSP, EBA y A.22, todas ellas idénticas en la fracción evaluada de 342 pb. Del clado principal se derivan dos ramas, en la primera de ellas se agrupan la mayoría de las secuencias resultantes de las muestras. La segunda rama comprende dos clados, uno solo con la cepa B577, única en mostrar una diferencia en la subunidad 16S ribosomal, y agrupadas en el otro clado las cepas LLG y POS, las cuales mostraron diferencia en la región intergénica, asociado a este clado se localiza la muestra clínica número 3, la secuencia de esta muestra abarcó 148 pb lo que la hizo menos específica que el resto de las muestras clínicas (**Figura 11**).

```

C. abortus A22      -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
1 G                -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
2                  -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
3
4                  -----ACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
6                  -----GGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
7
8                  -----AGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus LLG     -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus POS     -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus B577    -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus EBA     -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus OSP     -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus S26/3 rc -TGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. abortus VPGs    GTGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT
C. aburtus FASS    GTGAGGCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTACCGGAAGGTGGGGCTGGATCACCTCCTTTTAAGGATAAGGATAACT

C. abortus A22      GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
1 G                GTCTTAGGATGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
2                  GTCTTAGGATGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
3                  -----AGCGTGTGTTCCAAAACAT
4                  GTCTTAGGATGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
6                  GTCTTAGGATGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
7                  -----TCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
8                  GTCTTAGGATGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus LLG     GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus POS     GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus B577    GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus EBA     GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus OSP     GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus S26/3 rc GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. abortus VPGs    GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT
C. aburtus FASS    GTCTTAGGACCGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGCATTTTTTAATCTTGTATTCTATTTCTTTTGCATTGTTAAGCGTGTGTTCCAAAACAT

C. abortus A22      TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
1 G                TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
2                  TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
3                  TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
4                  TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
6                  TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
7                  TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
8                  TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus LLG     TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus POS     TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus B577    TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus EBA     TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus OSP     TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus S26/3 rc TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. abortus VPGs    TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG
C. aburtus FASS    TTAGTTTACGATCAAGTATGTTATGTAATAATATGGTAACAAGTAAATTCACATATAATAATAGACGTTTAAAGAAATATCTGCTCTTTGG

C. abortus A22      TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
1 G                TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
2                  TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
3                  TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
4                  TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
6                  TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
7                  TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
8                  TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus LLG     TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus POS     TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus B577    TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus EBA     TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus OSP     TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus S26/3 rc TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. abortus VPGs    TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----
C. aburtus FASS    TGAAGTTAATTTGCATGGATCAATAATTTACAGACCAAGTTATTAAGAGTTATGGTGGATGCCTTGGCATTGACA-----

```

Figura 10.- Alineación del fragmento de 342 pb del operón ribosomal de *C. abortus* cepa de referencia (A.22), cepas campo (1G-8) y cepas homólogas (LLG, POS, B577, EBA, OSP, S26/2, VPG y FAS).

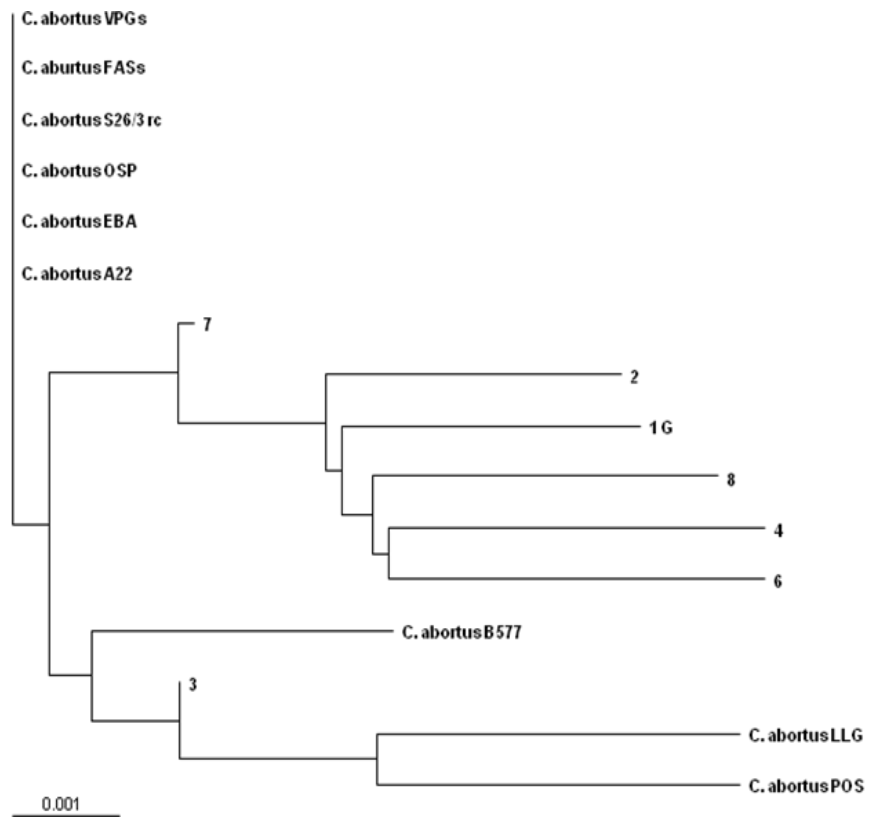


Figura 11.- Filograma realizado a partir del fragmento de 342 pb del operón ribosomal de *C. abortus* cepa de referencia (A.22), muestras (1G-8) y cepas homólogas (LLG, POS, B577, EBA, OSP, S26/2, VPG y FAS).

9 Discusión

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de *C. abortus* en cabras que habían presentado aborto, en cuatro de los cinco estados muestreados, siendo Coahuila en el que se detectó una mayor cantidad de casos positivos (9.67%), seguido de Veracruz (7.52%), Jalisco (4.3%) y Querétaro (3.22%). En estudios previos se aisló *C. abortus* de cabras que habían abortado en el estado de Guanajuato (56) y se tienen antecedentes de serología positiva en Baja California Sur, Michoacán, Guerrero, Estado de México, Puebla, Tlaxcala y San Luís Potosí (61). Estos estados se encuentran distribuidos en el norte, centro, este y oeste del país, lo cual indica que a falta de un diagnóstico rutinario previo a cualquier movilización, se ha permitido el desplazamiento e introducción de animales portadores, resultando en la dispersión del AEPR y de los riesgos sanitarios y socioeconómicos que supone.

Debido a que nuestro estudio se realizó en rebaños con un sistema de producción extensivo donde las cabras pastorean en áreas comunes sin supervisión, las muestras de elección fueron exudados vaginales de cabras que tenían menos de 30 días de haber abortado. De acuerdo a autores como Sachse (42) los tejidos que presentan mayor carga bacteriana son los fetos abortados y las membranas placentarias, los cuales proveen la mejor fuente para realizar el aislamiento bacteriano, la recuperación de estos tejidos raramente es posible en un sistema extensivo; por lo que solo pudieron obtenerse muestras de líquido abomasal de dos fetos abortados, no obstante, estudios en México (56,57,62) y alrededor del mundo (35,63,64) refieren que el exudado vaginal es una muestra idónea y ampliamente utilizado para el diagnóstico.

Las muestras fueron sometidas a cultivo celular infectando células L929, como resultado de esta técnica se obtuvieron 43/186 (23%) muestras positivas, similar a los resultados obtenidos en un estudio del 2011 realizado en caprinos lecheros del estado de Guanajuato, en el que se obtuvieron 34/125 (26.98%) muestras positivas al aislamiento a partir de exudado vaginal (56) contrastando con estos resultados en el 2014, se reportó en el mismo estado de Guanajuato un estudio en 246 cabras lecheras de sistemas tecnificados en el que no fue posible el aislamiento de la bacteria en exudado vaginal ni en tejidos placentarios, donde utilizando técnicas de inmunoensayo específicos para *C.*

abortus se encontró un 4.9% de seroprevalencia, indicando que existían individuos que han estado en contacto con la bacteria (57), es posible que las diferencias en las condiciones de manejo de los sistemas de producción, así como el número de animales portadores introducidos a las unidades, predispongan a la diseminación de la enfermedad o bien a su control. Por otro lado, existen estudios en el estado de Michoacán donde *Chlamydia spp.*, fue aislada del 85.5% de 200 cabras muestreadas, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente, las muestras que se utilizaron para su análisis fueron heces; aunque en este caso no pudo determinarse la especie de *Chlamydia* (65), estos hallazgos se relacionan más con los encontrados en un estudio del Reino Unido, en el cual se tomaron muestras de heces de 781 ovinos, encontrando 149 (19%) positivos, todos ellos se relacionaron a *C. pecorum* (66), la cual no conlleva a los mismos riesgos de aborto en animales ni de zoonosis que *C. abortus* (8); en el presente estudio se logró la identificación de la especie, confirmando que los aislamientos fueron de *C. abortus*. Por otra parte estudios realizados en Túnez utilizando 50 exudados vaginales mostraron un 18% de muestras positivas por aislamiento mientras que por pruebas inmunoenzimáticas con las mismas muestras se encontró un 58% de positividad, ellos señalan que el manejo y el transporte de las muestras puede llevar a variaciones en los resultados (67). De acuerdo a lo reportado por Sachse (42) el cultivo celular puede presentar inconsistencias que lleven a una baja sensibilidad, tales como pérdida de viabilidad del organismo durante su transporte por una inadecuada preservación de la muestra o por contaminación de la misma (68).

El aislamiento fue complementado con la prueba de PCR, obteniendo 18/186 (9.23%) muestras positivas, estos resultados se encuentran por debajo de los descritos en Guanajuato por Mora y colaboradores (56) quienes reportan 30/125 (24%) muestras positivas a PCR de exudados vaginales, logrando confirmar el 88.23% de las muestras positivas obtenidas del aislamiento, mientras que en el presente estudio la PCR confirmó el 42.8% de los resultados positivos observados en el aislamiento. Es posible que obtuviéramos falsos negativos a causa de una baja carga bacteriana de las muestras, de contaminación cruzada o de elementos presentes en las muestras directas de los exudados vaginales que pudieran haber inhibido la PCR (43); por el contrario, nuestros resultados se encuentran por arriba de los obtenidos en el estudio de Campos y

colaboradores (57), en el cual, de las 246 muestras evaluadas, solo pudo determinarse la presencia de *C. abortus* por PCR del bazo de un feto abortado, en nuestro caso también fue posible la detección del patógeno en líquido abomasal de un feto abortado por medio de ambas técnicas (aislamiento y PCR). Otros estudios en México han utilizado la prueba de PCR para detectar *C. abortus* de exudado vaginal: en el 2008 se evaluaron 304 exudados vaginales de ovejas con historial de aborto provenientes del Estado de México en las cuales se determinó el 0.65% de positividad (62), estos resultados se encuentran por debajo de los obtenidos en nuestros muestreos, a diferencia de nuestro estudio la población evaluada por Jiménez et al., (2008) fueron ovinos, sin embargo es posible que bajo algunos sistemas de producción pueda haber interacción entre ambas especies y esto predisponga a la propagación de la bacteria entre ovinos y caprinos, el análisis de ambos estudios pueden ser un indicio de que la bacteria se ha diseminado a través del país, pero no en la misma proporción en los diferentes estados, sin embargo se requieren más estudios para poder corroborar estas observaciones.

Los resultados obtenidos por PCR se encuentran por arriba de los mostrados en algunos estudios de Europa, como es el caso de un comunicado de Sardinia, Italia (69), en el cual por medio del PCR se detectaron 3/40 (7.5%) muestras positivas en hatos de ovejas con alta incidencia de abortos, a diferencia nuestra, la evaluación se llevo a cabo a partir de muestras de placenta y con un número menor de muestras, por otro lado en Alemania (70) se llevó a cabo un estudio en 32 rebaños de ovinos con una tasa de abortos de menos del 1% en el que se evaluaron 352 exudados vaginales por medio de la PCR, los resultados mostraron que 28 animales (7.95%) fueron positivos a *C. abortus*, estos datos indican que las infecciones por *Chlamydia* ocurren con frecuencia en esa zona aún en ausencia de tasas elevadas de abortos, esto puede deberse a que la enfermedad es endémica en la región (70). En México los estudios se han enfocado en hatos de animales con historiales de abortos (51,56), hace falta realizar una evaluación más amplia de la población de pequeños rumiantes para conocer la distribución de la bacteria en territorio nacional.

La prueba de PCR ha sido descrita como una herramienta altamente sensible en el diagnóstico de *C. abortus* por no requerir de la viabilidad de la bacteria (71–73) por lo que ha sido muy usada, así mismo gran parte de los estudios actuales han sustituido al PCR convencional por PCR cuantitativos y más específicos (PCR-Tiempo Real – PCR-TR) capaces de identificar menores cantidades de DNA en exudado vaginal, confiriendo ventaja sobre el aislamiento (63).

Como parte de la identificación de la especie de *Chlamydia* involucrada en los abortos evaluados y para descartar la posibilidad de que se tratara de *C. pecorum*, agente que también induce aborto, fue necesario complementar la PCR, por medio de la secuenciación de los fragmentos amplificados. Los resultados obtenidos por el análisis de secuencias mostraron una homología del 99% con *C. abortus* cepas FAS, FAG, VPG, LLG y POS, previamente analizadas y caracterizadas por Everett y Anderse (74). Este mismo porcentaje de homología se observó con la cepa A.22 incluida en este estudio como cepa de referencia. En el presente trabajo se confirma que la especie de *Chlamydia* encontrada en abortos de cabras de Coahuila, Jalisco, Querétaro y Veracruz pertenecen al agente etiológico del AEPR, lo cual reafirma y soporta los hallazgos citados por Escalante y colaboradores (51,53,56) en los que se reporta AEPR en México.

Dentro de nuestros resultados llamó nuestra atención que Puebla fuera el único de los cinco estados evaluados en no mostrar resultados positivos al aislamiento bacteriológico ni al PCR. Contrario a este resultado se cuenta con estudios en Puebla donde se evaluaron rebaños caprinos por medio de pruebas ELISA en los que se encontró una seroprevalencia del 4% (61), esta discrepancia se debe a que en nuestro trabajo solo se realizaron pruebas de aislamiento y de PCR, las cuales detectan la presencia del agente patógeno en el hospedador, mientras que las inmunoenzimáticas señalan que ha habido contacto y no es necesario la presencia del agente infeccioso. Por otro lado, la población evaluada no fue representativa para poder descartar la enfermedad en el estado, asimismo el periodo de muestreo para Puebla fue realizado fuera de la etapa reproductiva de los animales en la que es más probable el reconocimiento de la bacteria en los exudados vaginales, de acuerdo con Nietfeld y Gutierrez (36,64) las descargas vaginales que contienen gran carga bacteriana persisten hasta 3 semanas posterior al

periodo de parto o bien del aborto. En el caso de Puebla el muestreo se realizó varias semanas después del periodo de partos, por lo que se sugiere realizar una re-evaluación con una mayor cantidad de población en un periodo de tiempo no mayor a un mes postparto o posterior al aborto.

Es una necesidad el estudio de la distribución de *C. abortus* en el territorio nacional, ya que diferentes autores (75–77) han señalado que el AEPR es una de las principales causas de aborto con un alto impacto económico en países europeos, norte americanos y africanos (42), es probable que al estar presente en nuestro país tenga consecuencias similares a las reportadas por estos autores, de modo que al no contar con las herramientas necesarias para su detección, las consecuencias de su introducción en México no hayan podido ser determinadas. Por otro lado, la profundización en el estudio del AEPR no solo se enfoca en el ramo de la caprinocultura, Favila et al., (2012) reporta por medio de serología la presencia de anticuerpos específicos contra *C. abortus* en bovinos lecheros de Puebla y Veracruz, relacionados con abortos y problemas reproductivos como incremento de días abiertos y vacas repetidoras (78), en cuanto a ovinos; trabajos realizados por Mejía y colaboradores en el 2013 revelan por medio de serología la identificación de anticuerpos específicos contra *C. abortus* en los estados de Querétaro (9.69%), Estado de México (7.09%), Hidalgo (11.34%), Tlaxcala (13.08%), Chihuahua (11.56%), Sonora (12.45%) y Chiapas (10.15%), en dicho estudio se concluye que del 100% de unidades de producción muestreadas el 96.6% presentaron serología positiva a *Chlamydia* (79).

Si bien las herramientas propuestas y empleadas en este trabajo tales como el aislamiento bacteriológico y la PCR son indispensables en la determinación de la distribución del AEPR en México, son pruebas costosas que no pueden ser de primera elección para su uso a nivel de campo, sino más bien pruebas confirmatorias que soporten las observaciones de pruebas tipo tamiz para el primer diagnóstico del rebaño, para este fin las pruebas inmunoenzimáticas son las óptimas. Estudios como el de Rekiki (80) indican que las ELISA específicas para *C. abortus* son un método conveniente para el diagnóstico a fin de aplicar medidas profilácticas posterior a los primeros casos de aborto, tanto para detener la propagación de la infección como para evitar las pérdidas

económicas asociadas. La vacunación en las zonas endémicas en conjunto con un manejo higiénico han mostrado ser una estrategia viable para contener la infección por *C. abortus* (81).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación publicó el acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, en dicho acuerdo el AEPR se encuentra en la lista de enfermedades exóticas en México, dicho estado limita el acceso a pruebas ELISA específicas para la detección de *C. abortus*, no obstante los resultados del presente trabajo junto con los reportes previos (51,53,56,61) reafirman la necesidad de reevaluar el estatus sanitario del AEPR, clasificarla como enfermedad endémica podría abrir camino a la introducción de pruebas más específicas que se produzcan en el país, que sean rutinarias y que disminuyan los costos de un aislamiento o un PCR ante brotes de aborto, de este modo se podrán aplicar medidas preventivas y de control para disminuir pérdidas económicas en el campo de la caprinocultura y los riesgos zoonosarios que implica.

Los resultados anteriormente discutidos han sido reportados ante el SIVE en enero de este 2014, quienes están llevando a cabo las pruebas correspondientes para confirmar nuestro reporte.

10 Conclusiones

Los resultados obtenidos mediante el aislamiento (23%), la PCR (9.23%) y la secuenciación concluyen que *Chlamydia abortus* se encuentra presente en casos de abortos de cabras en diferentes estados de la República Mexicana.

El aislamiento bacteriano demostrado mediante la inmunofluorescencia directa fue la prueba con mayor porcentaje de positivos para el diagnóstico de AEPR.

El PCR directo de las muestras de exudado vaginal, demostró un porcentaje menor de resultados positivos comparado con el aislamiento.

La secuencia de nucleótidos de los productos de PCR confirmó que *C. abortus* se encuentra presente en muestras de abortos de cabras en México.

Las pruebas como el aislamiento bacteriano y pruebas moleculares son una excelente combinación para el diagnóstico de *C. abortus* en nuestro país.

11 Anexo

Preparación de medios y reactivos

- * Para complementar el medio de cultivo celular

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

- * Medio de transporte SPG (Sacarosa-Fosfato/Glutamato) para *Chlamydia*

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

- * Buffer NET para la extracción de DNA

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

12 Bibliografía

1. Thygeson P. Trachoma virus: historical background and review of isolates. *Ann New York Acad Sci.* 1962;98:6 – 13.
2. Thygeson P. The etiology of inclusion blennorrhoea. *Am J Ophthalmol.* 1934;17:1019–26.
3. Greig JR. Enzootic abortion in ewes: a preliminary note. *Vet Rec.* 48:1225–7.
4. Stamp J, McEwen A, Watt J, Nisbet D. Enzootic abortion in ewes; transmission of the disease. *Vet Rec.* 1950;17(62):251–254.
5. Bernkopf H, Masiah P, Becker Y. Correlation between morphological and biochemical changes and the appearance of infectivity in FL cell cultures infected with trachoma agent. *Ann New York Acad Sci.* 1962;98:62–81.
6. Moulder J. The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and virus. *Annu Rev Microbiol.* 1966;20:107–30.
7. Rodolakis A, Yousef Mohamad K. Zoonotic potential of Chlamydia. *Vet Microbiol [Internet].* 2010 Jan 27 [cited 2014 Apr 7];140(3-4):382–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345022>
8. Longbottom D. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *Vet J [Internet].* 2004 Jul [cited 2014 Apr 7];168(1):9–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158203>
9. Bergey. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* 2nd ed. Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward WL and WBW, editor. New York: Springer; 2011.
10. Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, et al. Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:1397–406.
11. Lopez Villegas E. Estudio de las características del ciclo de desarrollo de Chlamydia trachomatis relacionadas a la presencia del plásmido 7.5 Kb. *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional;* 2009. p. 72.
12. Villegas E, Sorlózano A, Camacho A, Gutiérrez J. Chlamydia pneumoniae: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2008 Dec;26(10):629–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X08752790>
13. Omsland A, Sixt BS, Horn M, Hackstadt T. Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities. *FEMS Microbiol Rev [Internet].* 2014 Feb 3 [cited 2014 Mar 10];1574–6976. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24484402>
14. Moulder JW. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev.* 1991;55:143–90.
15. Poudel A. *Comprehensive analysis of the impact of endemic Chlamydia pecorum infection in cattle.* Faculty of Auburn University, Auburn, Alabama.; 2012.
16. Beatty WL. Late endocytic multivesicular bodies intersect the chlamydial inclusion in the absence of CD63. *Infect Immun [Internet].* 2008 Jul [cited 2014 Apr 7];76(7):2872–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2446703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Carabeo RA, Mead DJ, Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6771–6.
18. Shaw EI, Dooley C a, Fischer ER, Scidmore M a, Fields K a, Hackstadt T. Three temporal classes of gene expression during the Chlamydia trachomatis developmental cycle. *Mol Microbiol [Internet].* 2000 Aug;37(4):913–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972811>
19. Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2007 Jul 3;104(27):11430–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2040915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

20. Caro MR, Buendía a J, Del Rio L, Ortega N, Gallego MC, Cuello F, et al. Chlamydomphila abortus infection in the mouse: a useful model of the ovine disease. Vet Microbiol [Internet]. 2009 Mar 16 [cited 2014 Mar 18];135(1-2):103–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945558>
21. Stuen S, Longbottom D. Treatment and control of chlamydial and rickettsial infections in sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Mar [cited 2014 Feb 6];27(1):213–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215905>
22. Rocchi MS, Wattedegera S, Meridiani I, Entrican G. Protective adaptive immunity to Chlamydomphila abortus infection and control of ovine enzootic abortion (OEA). Vet Microbiol [Internet]. 2009 Mar 16 [cited 2014 Apr 7];135(1-2):112–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952388>
23. Rodolakis A, Salinas J, Papp J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. Vet Res. 1998;29:275–88.
24. Papp JR, Shewen PE, Gartley CJ. Chlamydia psittaci infection and associated infertility in sheep. Can J Vet Res. 1993;57:185–9.
25. Jones GE, Anderson IE. Chlamydia psittaci: is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? Res Vet Sci. 1988;44:260–1.
26. Aitken I., Clarkson M, Linklater K. Enzootic abortion of ewes. Vet Rec . 1990;126:136–8.
27. Longbottom D, Coulter L. Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol. 2003;128:217–44.
28. Shewen PE. Chlamydial infection in animals: a review. Can Vet J. 1980;21:2–11.
29. Meeusen E, Bischof R, Lee C. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. Am J Reprod Immunol. 2001;46:169–79.
30. Aitken I, Longbottom D. Chlamydial abortion. In: I.D. Aitken OBE, BVMS, PhD, CBiol, FIBiol D h. c., editor. Diseases of sheep. Fourth. Edinburgh; 2007. p. 105–12.
31. Buxton D, Anderson IE, Longbottom D, Livingstone M, Wattedegera S, Entrican G. Ovine chlamydial abortion: Characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. J Comp Pathol. 2002;127:133–41.
32. Navarro J, Garcia de la Fuente, JN Sanchez J, Martinez C, Buendia A, Gutierrez-Martin, CB Rodriguez-Ferri, EF Ortega N, Salinas J. Kinetics of infection and effects on the placenta of Chlamydomphila abortus in experimentally infected pregnant ewes. Vet Pathol. 2004;41:498–505.
33. Entrican G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. J Comp Pathol. 2002;126:79–94.
34. Redondo P, Cañibano I. Estructura y fisiología de la placenta. [Internet]. INEA Escuela Universitaria ingeniería técnica agrícola. 2001. Available from: <http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Placenta.htm>
35. Papp JR, Shewen PE, Gartley CJ. Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus. Infect Immun. 1994;62:3786–92.
36. Nietfeld JC. Chlamydial infections in small ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pr [Internet]. 2001;17:301–14, vi. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11515403
LA - eng\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11515403
37. Barbosa Mireles M, Salazar García F, Fernández Rosas P, Montes de Oca Jimenez R. Detección de anticuerpos serológicos contra Chlamydomphila abortus en dos grupos de personas expuestas a riesgo en explotaciones ovinas en Xalatlaco, México. Trop Subtrop Agroecosystems. 2013;16:483–6.
38. World Organisation for Animal Health O. ENZOOTIC ABORTION OF EWES (ovine chlamydiosis). In: OIE, editor. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth. Paris, France.: World Organisation for Animal Health; 2008. p. 1013–20.
39. Institut Pourquier. Serological diagnosis of Chlamydomphila abortus by ELISA method. France: POURQUIER ELISA Chlamydomphila abortust verification test; p. 0–5.

40. Lenzko H, Moog U, Henning K, Lederbach R, Diller R, Menge C, et al. High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Vet Res*. 2011;7:29.
41. Vretou E, Radouani F, Psarrou E, Kritikos I, Xylouri E, Mangana O. Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydomphila abortus* antibodies. *Vet Microbiol* [Internet]. 2007 Jul 20 [cited 2014 Apr 7];123(1-3):153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382493>
42. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol* [Internet]. 2009 Mar 16 [cited 2014 Apr 7];135(1-2):2–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18986778>
43. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. Aborto enzoótico de las ovejas (Clamidiosis ovina). In: Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, editor. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. Primera. Paris, Francia.: Organización Mundial para la Salud Animal; 2004. p. 683–9.
44. FAO. Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares. [Internet]. 2000. Available from: <http://www.fao.org/docrep/v5290s/v5290s24.htm>
45. Cuéllar Ordaz, Jorge Alfredo Tórtora Pérez J, Trejo González A, Román Reyes P. La producción caprina Mexicana, particularidades y complejidades. Primera. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; 2012.
46. SIAP. Resumen nacional de población ganadera, avícola y apícola. [Internet]. Available from: <http://www.siap.gob.mx/poblacion-ganadera/>
47. SIAP. Producción anual, Resumen Nacional y Cierre de la producción pecuaria por estado [Internet]. 2012. Available from: www.siap.gob.mx/ganaderia-produccion-anual
48. Nacional E, Unidos E, Secretaría M. Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995. [Internet]. México DF: Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica; 1995. p. 1–10. Available from: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=530>
49. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación S. ACUERDO mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. [Internet]. México DF: Diario oficial.; 2007. p. 7–14. Available from: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/Invasoras/pdf/ACUERDO_enfermedades_exoticas_endemicas_DOF20sep2007.pdf
50. Escalante O, Rivera F, Trigo T, Romero M. Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep through cell culture isolation. *Rev Latinoam Microbiol*. 1996;38:17–23.
51. Escalante O, Díaz A, Segundo Z, Suárez G. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: First Report. *Rev Latinoam Microbiol*. 1997;39:117–21.
52. Escalante O, Lazcano A, Soberón M. *Chlamydomphila* spp. Como agente zoonótico en México: Reporte de un caso. *Memorias de la XXXVII Reunión Nacional de investigación Pecuaria*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.; 2001. p. 41.
53. Lazcano A, Escalante O, Ducöing W, Trejo A. Inmunodetección de *Chlamydomphila abortus* en caprinos de Ecuandureo, Michoacán, México, mediante prueba de ELISA. *Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Cuernavaca, Morelos.; 2005.
54. Lazcano A. Detección de *Chlamydomphila* spp. en rebaños caprinos del Estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y aislamiento bacteriológico. *Universidad Nacional Autónoma de México*; 2006.
55. Soriano vargas E, Jiménez estrada JM, Salgado miranda C, López hurtado M, Escobedo guerra MR, Guerra infante FM. Identificación de *Chlamydomphila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *Rev Electrónica Vet* [Internet]. 2011;12(11):1–6. Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111.html>
56. Díaz Mora JC. Determinación de *Chlamydomphila abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis. *Universidad Nacional Autónoma de México*; 2011. p. 1–62.

57. Campos Hernández E, Vazquez Chagoyán JC, Salem A, Saltijeral Oaxaca JA, Escalante Ochoa C, López Heydeck SM, et al. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 2014;
58. Holliman A, Daniel R, Parr J, Griffiths P, Bevan B, Martin T, et al. Chlamydiosis and abortion in a dairy herd. *Vet Rec.* 1994;134:500–2.
59. Bennett R. The “direct costs” of livestock disease: The development of a system of models for the analysis of 30 endemic livestock diseases in Great Britain. *J Agric Econ.* 2003;54(1):55–71.
60. Matthews JG. *Diseases of the goat.* 3rd ed. UK: Wiley-Blackwell; 2009.
61. Arellano Reynoso B. *Memorias de la 21a Reunión Anual de CONASA. Clamidiosis.* Monterrey Nuevo Leon; 2013. p. 24.
62. Jiménez-estrada JM, Escobedo-guerra MR, Arteaga-troncoso G, López-hurtado M, Haro-cruz MDJ De, Montes R, et al. Detection of *Chlamydia abortus* in Sheep (*Ovis aries*) in Mexico. 2008;3(4):91–5.
63. Livingstone M, Wheelhouse N, Maley SW, Longbottom D. Molecular detection of *Chlamydia abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Vet Microbiol* [Internet]. 2009 Mar 16 [cited 2014 Apr 7];135(1-2):134–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930611>
64. Gutierrez J, Williams EJ, O’Donovan J, Brady C, Proctor AF, Marques PX, et al. Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydia abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Vet Microbiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Jan 10 [cited 2014 Mar 10];147(1-2):119–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20638204>
65. Lazcano Arrevillaga C. Detección de *Chlamydia* spp en rebaños caprinos del estado de michoacan mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y aislamiento bacteriológico. UNAM; 2006. p. 53.
66. Clarkson MJ, Philips HL. Isolation of faecal chlamydia from sheep in Britain and their characterization by cultural properties. *Vet J.* 1997;153:307–10.
67. Ekikia AR, Oumedineb KSIDI, Ouriaub AS, Emlia JJ, Ammamia SH, Odolakisb AR. Original article Isolation and characterisation of local strains of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) from Tunisia. 2002;33:215–22.
68. Thejls H, Gnarpe J, Gnarpe H, Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Ostergaard L, et al. Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. *Genitourin Med.* 1994;70:300–3.
69. Chisu V, Porcu R, Tanda A, Masala G. First isolation and characterization of *Chlamydia abortus* from abortion tissues of sheep in Sardinia, Italy. *Vet Ital* [Internet]. 2013 [cited 2014 Mar 10];49(4):331–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362772>
70. Lenzko H, Moog U, Henning K, Lederbach R, Diller R, Menge C, et al. High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Vet Res* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011 Jan [cited 2014 Apr 7];7(1):29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3125319&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
71. Ostergaard L. DNA amplification in the diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 1999;119:2350–6.
72. Huang J, DeGraves FJ, Gao D, Feng P, Schlapp T, Kaltenboeck B. Quantitative detection of *Chlamydia* spp. by fluorescent PCR in the LightCycler. *Biotechniques.* 2001;30:150–7.
73. Sachse K, Grossmann E, J?ger C, Diller R, Hotzel H. Detection of *Chlamydia suis* from clinical specimens: Comparison of PCR, antigen ELISA, and culture. *J Microbiol Methods.* 2003;54:233–8.
74. Everett KD, Andersen AA. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 2:803–13.
75. Marques PX, Souda P, O’Donovan J, Gutierrez J, Gutierrez EJ, Worrall S, et al. Identification of immunologically relevant proteins of *Chlamydia abortus* using sera from experimentally infected

pregnant ewes. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2014 Mar 10];17(8):1274–81. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2916250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

76. Cuello F, Salinas J, Caro M., Gallego M. Prevalencia de la clamidiosis ovina y caprina en la región de Murcia. *An Vet.* 1992;8:39–45.
77. Vega S, Roche M, García A, Gómez T. Estudio de la etiología de los abortos en los pequeños rumiantes en la Comunidad Valenciana. *XXIX Jornadas Científicas de la SEOC.* 2003. p. 262–4.
78. Favila Humara L del C. Identificación de las principales enfermedades infecciosas emergentes en bovinos lecheros de México. México; 2012 p. 35.
79. Mejía S, Díaz A, Aguilar R, Favila H, Palomares R, Santillán M, et al. Enfermedades infecciosas que afectan la producción ovina en los estados de Sonora y Chiapas. *Epidemiología. Reunion anual de investigación pecuaria INIFAP.* México, Veracruz; 2013.
80. Rekiki a., Hammami S, Rodolakis a. Comparative evaluation of a new commercial recombinant ELISA and the complement fixation test for the diagnosis of *Chlamydophila abortus* infection in naturally infected flocks in Tunisia. *Small Rumin Res* [Internet]. 2006 Nov [cited 2014 Apr 7];66(1-3):58–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448805002889>
81. Entrican G, Wheelhouse N, Wattedgedera SR, Longbottom D. New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 May [cited 2014 Mar 25];35(3):271–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209689>