



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Chlamydia* spp. OBTENIDOS A PARTIR DE ABORTOS EN RUMIANTES

TESIS

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA:

MARÍA MAGDALENA LIMÓN GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

EFRÉN DÍAZ APARICIO

CENID- SALUD ANIMAL E INOCUIDAD, INIFAP

COMITÉ TUTORAL

HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ

Faculta de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO.

Hospital General Dr. Manuel Gea González, SS.

CD. MX.

Enero 2022



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 mi Papá, a mi Mamá, y a mis hermanos por su ejemplo y por siempre estar.

A toda mi familia por su apoyo y unión.

A mis amigos, por sus consejos y apoyo.

A Dios.

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco especialmente a mi asesor de tesis, el Dr. Efrén Díaz Aparicio.

Así mismo agradezco al Dr. Hugo Ramirez Alvarez y al Dr. Rigoberto Hernández por sus conocimientos y apoyo.

Agradezco a los miembros del jurado.

Agradezco al CENID – Salud Animal e Inocuidad, INIFAP.

Doctor Pedro Mejía, Gabriela Palomares Resendiz, Isabel Tuxpan, Doctora Laura Hernandez.

A Pao y Abril ya que aprendimos juntas, y nos ayudamos en nuestros proyectos. A Anita, Rocio y Malva. A Erika Ornelas.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A la Unidad de Zoonosis Bacterianas del Laboratorio de Salud Animal de ANSES – Francia.

La tesis fue realizada con el financiamiento de los proyectos:

INIFAP 9323834759, recursos fiscales. Estudio para la determinación de la especie y de la diversidad genética de aislamientos de *Chlamydia* spp.

SAGARPA CONACyT 2017-2-291311: “Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp y *Coxiella burnetii*, en ovinos y caprinos”.

SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS, Francia 291241: Epidemiología y diversidad genética de *Chlamydiaceae* en rumiantes, industria avícola y aves silvestres: ¿Cuáles son sus implicaciones zoonóticas?”.

Resumen

La clamidiosis, era considerada una enfermedad exótica en el país, hasta el año 2016, cuando se reconoció como una enfermedad endémica. Por lo cual, durante ese periodo de tiempo la mayoría de los estudios se limitaron al diagnóstico serológico y se habían realizado muy pocos estudios de aislamiento, identificación y tipificación de esta bacteria, que brindarán información de las especies y cepas presentes en México. El objetivo del trabajo fue determinar la especie y diversidad genética de aislamientos de *Chlamydia* spp. en muestras de borregas, cabras y vacas que presentaron aborto, además de búfalas de agua procedentes del estado de Chiapas. Se obtuvieron 706 muestras, a partir de las cuales se realizó el aislamiento en la línea celular L929 y la confirmación de cuerpos de inclusión mediante inmunofluorescencia. A partir de las muestras positivas a inmunofluorescencia (26%), se realizó extracción de ADN; el cual se analizó mediante PCR tiempo real que identifica a la familia *Chlamydiaceae*, obteniéndose el 96.7 % como positivas; a partir de estas muestras positivas tanto a inmunofluorescencia y PCR tiempo real de *Chlamydiaceae*, se realizaron PCR tiempo real específicos de especie, el 69.7% (124/178) de las muestras fueron positivas a *C. abortus* y 7.9 % (14/178) a *C. pecorum*. Ninguna muestra fue positiva a *C. psittaci*. Posteriormente, la genotipificación de las muestras positivas a *C. abortus*, se realizó mediante MLST, mostrando pertenecer al genotipo 19, relacionado a cepas de cuadro clínico abortivo de origen europeo y de EUA. En cuanto a la genotipificación de muestras positivas a *C. pecorum*, se realizó la secuenciación de la subunidad 16S ARNr y del gen *ompA*, el análisis BLAST mostro un alto grado de similitud con la cepa E58 y la cepa iB1 de *C. pecorum*, mientras que, en los análisis filogenéticos observamos una alta asociación de estas con el genotipo "O" en el cual están incluidas secuencias de borregas sanas y de koalas. Este estudio aporta información sobre la diversidad genética de las cepas presentes en el país, lo cual es de ayuda en el establecimiento de medidas de control y prevención contra la enfermedad.

Palabras clave: inmunofluorescencia, PCR tiempo real, MLST, análisis filogenético.

Abstract

Chlamydiosis was considered an exotic disease in Mexico, until 2016, when it was recognized as an endemic disease. Therefore, during that period of time, most of the studies had been limited to serological diagnosis and very few studies of isolation, identification and typing of this bacterium had been carried out, which will provide with information on the species and strains present in Mexico. The aim of the study was to determine the species and genetic diversity of isolates of *Chlamydia* spp. in samples of sheep, goats and cows that presented abortion, as well as water buffaloes from the state of Chiapas. A total of 706 samples were obtained, from which the isolation in the L929 cell line and the confirmation of inclusion bodies by immunofluorescence was carried out. DNA extraction was carried out from the samples positive to immunofluorescence (26%), and analyzed by real time PCR that identifies the *Chlamydiaceae* family, obtaining that 96.7% were positive; from these positive samples to both isolation and real time PCR, species-specific real time PCRs were performed, 69.7% of the samples were positive to *C. abortus* and 7.9 to *C. pecorum*. No samples were positive for *C. psittaci*. Subsequently, the genotyping of *C. abortus*-positive samples from different herds in different states of the country was carried out by MLST, showing that they belong to genotype 19, related to strains of abortive clinical picture of European and US origin. As for the genotyping of *C. pecorum* positive samples obtained in this study from sheep, the sequencing of the 16S rRNA subunit and the ompA gene was performed. The BLAST analysis showed a high degree of similarity with the E58 strain and the iB1 strain of *C. pecorum*, while in the phylogenetic analysis it was observed a high association of these with the "O" genotype in which sequences from healthy sheep and koalas are included. This study provides us with information on the genetic diversity of the strains present in the country, which is of help in the establishment of control and prevention measures against the disease.

Keywords: immunofluorescence, real-time PCR, MLST, phylogenetic analysis.

Contenido

1. Introducción	1
Clamidiosis en los rumiantes	1
Características generales de <i>Chlamydia</i> spp	3
Evolución y taxonomía del género <i>Chlamydia</i>	4
Transmisión.....	5
Patogenia.....	6
Signos clínicos	7
Diagnóstico	8
Prevención y control	14
Salud pública.....	15
Uso de PCR en tiempo real para la identificación de <i>Chlamydia</i>	¡Error! Marcador no definido.
Genotipificación de <i>Chlamydia</i> spp.....	12
2. Justificación	17
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	18
5. Materiales y métodos	19
Colección de muestras	19
Aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia	19
Extracción de ADN a partir de muestras de rumiantes	20
Identificación de la familia <i>Chlamydiaceae</i>	20
Identificación de la especie de <i>Chlamydia</i> spp mediante PCR-tr	21
Identificación de <i>C. abortus</i> mediante PCR-tr.....	22
Identificación de <i>C. psittaci</i> mediante PCR-tr	23
Identificación de <i>C. pecorum</i> mediante PCR-tr	24
Propagación de muestras positivas en cultivo celular	25
Genotipificación mediante MLST de <i>C. abortus</i>	26
Genotipificación de aislamientos positivos a <i>C. pecorum</i>	27
6. Resultados.....	30
Colección de muestras	30

Aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia	31
Identificación de familia y especie de <i>Chlamydia</i> spp., por PCR-tr	34
Genotipificación de aislamientos positivos a <i>C. abortus</i>	37
Genotipificación de aislamientos positivos a <i>C. pecorum</i>	39
7. Discusión y conclusiones	47
8. Referencias.....	55
9. Anexos	67
Anexo 1. Aislamiento e identificación de <i>Chlamydia</i> spp. por inmunofluorescencia.....	67
Anexo 2. Propagación de <i>Chlamydia</i>	71

Lista de cuadros

Cuadro 1. Iniciadores y sonda empleados para la PCR-tr que identifica diferentes especies de <i>Chlamydia</i>	22
Cuadro 2. Iniciadores empleados para la genotipificación basado en el esquema de MLST de Chlamydiales	26
Cuadro 3. Tipo y cantidad de muestras colectadas por especie animal (tanto órganos como hisopos vaginales)	30
Cuadro 4. Total de muestras positivas por especie animal mediante el aislamiento en cultivo celular e IFD (tanto órganos como hisopos vaginales)	32
Cuadro 5. Borregas positivas a <i>Chlamydia</i> spp., por IFD y por estado de la República Mexicana	32
Cuadro 6. Vacas positivas a <i>Chlamydia</i> spp., por IFD y por estado de la República Mexicana	33
Cuadro 7. Cabras positivas a <i>Chlamydia</i> spp., por IFD y por estado de la República Mexicana	33
Cuadro 8. Identificación por PCR-tr de <i>C. abortus</i> , <i>C. psittaci</i> y <i>C. pecorum</i> a partir de muestras de rumiantes de distintos estados de la República Mexicana	34
Cuadro 9. Identificación de <i>C. abortus</i> , <i>C. psittaci</i> y <i>C. pecorum</i> a partir de muestras de borregas que presentaron aborto de distintos estados de la República Mexicana.....	35
Cuadro 10. Identificación de <i>C. abortus</i> , <i>C. psittaci</i> y <i>C. pecorum</i> a partir de muestras de vacas que presentaron aborto, de distintos estados de la República Mexicana.....	36
Cuadro 11. Identificación de <i>C. abortus</i> , <i>C. psittaci</i> y <i>C. pecorum</i> a partir de muestras de cabras que presentaron aborto de distintos estados de la República Mexicana	37
Cuadro 12. Muestras seleccionadas para la realización de MLST y resultados de secuencias tipo	39

Lista de figuras

Figura 1. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del fragmento de la subunidad 23S ARNr perteneciente a la familia <i>Chlamydiaceae</i> . Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10}	21
Figura 2. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR tiempo real obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del ADN plasmídico del gen ompA específico de <i>C. abortus</i> . Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10}	23
Figura 3. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR tiempo real obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del ADN plasmídico del gen ompA específico de <i>C. psittaci</i> . Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10}	24
Figura 4. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR tiempo real obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del ADN plasmídico del gen ompA específico de <i>C. pecorum</i> . Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10}	25
Figura 5. Estados de la República Mexicana muestreados para la colección de muestras de borregas con antecedentes de aborto.....	30
Figura 6. Estados de la República Mexicana muestreados para la colección de muestras de vacas con antecedentes de aborto.....	31
Figura 7. Estados de la República Mexicana muestreados para la colección de muestras de cabras con antecedentes de aborto.....	31
Figura 8. Muestras positivas mediante la PCR-tr específico de especie de <i>Chlamydia</i> en rumiantes.....	34
Figura 9. Amplificación de los genes que conforman el esquema MLST de la muestra 126. Mpb: marcador de pares de bases, genes amplificados: <i>gatA</i> , <i>oppA</i> , <i>hflX</i> , <i>gidA</i> , <i>enoA</i> , <i>hemN</i> , y <i>fumC</i>	38
Figura 10. Amplificación de la subunidad 16S ARNr. Mpb: marcador de pares de bases, M1: muestra positiva a <i>C. pecorum</i>	40
Figura 11. Amplificación del gen ompA. Mpb: marcador de pares de bases, C-: control negativo, M1: muestra positiva a <i>C. pecorum</i>	40
Figura 12. Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana usando las secuencias ARNr 16S de diferentes especies de <i>Chlamydia</i> . El número junto a los nodos indica la probabilidad posterior para el análisis bayesiano.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana usando las secuencias ompA de diferentes especies de <i>Chlamydia</i> . El número junto a los nodos indica la probabilidad posterior para el análisis bayesiano.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Redes de haplotipos de diferentes secuencias de <i>Chlamydia pecorum</i> . El color de los círculos indica la población geográfica de <i>Chlamydia pecorum</i> analizada = Círculos blancos = datos faltantes. Aborto = AB, Cistitis = CY, Conjuntivitis = CO, Encefalomiелitis = ECM, Endometritis = EM, Conjuntiva sana = HC, Intestino sano =	

HI, Vagina sana = HV, Orquitis = OR, Poliartritis = PO y Neumonía = NP. La flecha negra indica las secuencias obtenidas en el presente estudio. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 15. Distribución de quince grupos genéticos (indicados por colores) de la población de *Chlamydia pecorum*, según la simulación de MCMC bayesiana. Cada secuencia de *C. pecorum* está representada por una delgada línea vertical dividida en segmentos coloreados que indican uno de los grupos genéticos K=15. La flecha negra indica las secuencias obtenidas en el presente estudio.... **¡Error! Marcador no definido.**

1. Introducción

Clamidiosis en los rumiantes

La clamidiosis en rumiantes causa abortos en el último tercio de la gestación, el nacimiento de crías débiles y mortinatos, la principal especie asociada es *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), sin embargo, *Chlamydia pecorum* (*C. pecorum*) y *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) también pueden estar involucradas (Longbottom y Coulter, 2003; Borel y col. 2006; Mohamad y Rodalakis, 2010).

C. abortus es endémica en muchos países, es uno de los principales agentes causales de abortos y pérdidas fetales en rumiantes, además de representar un riesgo zoonótico pudiendo causar en los humanos cuadros clínicos oculares, respiratorios e incluso aborto (Longbottom y Coulter, 2003). La enfermedad ocasionada por *C. abortus* en bovinos se le llama aborto epizoótico bovino, mientras que en cabras y ovinos es conocida como aborto enzoótico de los pequeños rumiantes o aborto enzoótico ovino. (Longbottom, 2004; Laroucau y col. 2009; Karlsson y col. 2010; Rodolakis y Mohamad, 2010; OIE, 2018). Además, existen informes que mencionan la presencia de *C. abortus* en búfalos de agua en Europa (Greco y col. 2007; Roncoroni y col. 2007; Greco y col. 2008) y África (Osman y col. 2012).

C. pecorum infecta a rumiantes, cerdos y koalas. Provoca infecciones vaginales, además de estar asociada con conjuntivitis, encefalomiелitis, enteritis, neumonía y poliartritis en rumiantes. Adicionalmente ha sido aislada de infecciones intestinales asintomáticas. *C. psittaci* infecta a una gran variedad de aves, mamíferos y ocasionalmente humanos; además hay reportes de infecciones por esta especie en bovinos y búfalos de agua (Rodolakis, 2001; De Graves y col. 2003; Longbottom, 2004; Borel y col. 2006; Kalender y col. 2013).

Antecedentes de clamidiasis en los rumiantes

Son numerosos los microorganismos capaces de ocasionar infertilidad y abortos en los rumiantes, lamentablemente en México hay desconocimiento sobre la presencia e importancia de varios de estos agentes infecciosos, en consecuencia, el control y la

detección no se realiza apropiadamente, lo que favorece su diseminación. Entre estas infecciones se encuentra la ocasionada por clamidias en rumiantes, que hasta el mes de mayo del 2016 era considerada una enfermedad exótica en México, actualmente se encuentra en el grupo 3 de enfermedades endémicas y que por representar un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son consideradas de notificación mensual obligatoria (DOF, 2018).

Refiriéndonos a los bovinos en varios países como: Alemania, Gran Bretaña, Italia, Japón, Suiza, Taiwán, EUA y Suecia, en los cuales se ha reportado a *C. abortus* como el agente causal de abortos esporádicos y reducción de la fertilidad en vacas. *C. abortus* ha sido reportado en bovinos de Europa y los EUA, con prevalencias superiores al 45 % en lugares con problemas reproductivos (Borel y col. 2006; Reinhold y col. 2011). En Argentina, en el año de 1995 se detectaron el 30.2 % y el 46.86 % de sueros positivos de un total de 120 bovinos analizados por las técnicas de fijación del complemento e inmunofluorescencia indirecta, respectivamente (Rojas y col. 2018). En un estudio realizado en bovinos lecheros de Puebla, Hidalgo, Tabasco y Estado de México, fue posible detectar animales seropositivos únicamente en este último Estado con una frecuencia de 1.9 % (Praga y col. 2011)

Durante el periodo de enero de 2010 a diciembre del 2012, se realizaron muestreos serológicos en hatos lecheros con antecedentes de aborto en ocho Estados de la República Mexicana, mediante la prueba de ELISA se determinó la frecuencia de animales positivos a *C. abortus*. De un total de 1,032 muestras analizadas, 145 (14 %) resultaron positivas. Con prevalencias que tuvieron una variación desde el 2.9 % al 57 % por animal y del 3.5 % al 72.7 % por hato en los estados de Guanajuato, Aguascalientes, Veracruz, Puebla, Estado de México, Hidalgo, Morelos y Tlaxcala (Limón y col. 2011).

Varios estudios destacan la importancia de *C. psittaci* en los bovinos, en Alemania a partir de muestras vaginales de vacas positivas a la familia *Chlamydiaceae*, mediante la genotipificación se encontraron las especies *C. psittaci* en el 55.8 %, *C. abortus* con el 35.8 % y *C. pecorum* con el 8.4 % (Laroucau y col. 2014).

El aborto enzoótico ovino ha sido reconocido como una de las principales causas de pérdidas económicas en borregas y cabras en Europa, Norteamérica y África. Es la

causa infecciosa más común de la pérdida del cordero, en varios países de Europa occidental, central y septentrional (Aitken 2000); en Reino Unido se identificó como la causa del 50 % de todos los abortos diagnosticados, donde se han considerado pérdidas de 15 millones de libras esterlinas por año debido a esta bacteria y donde los casos de transmisión a humanos son de notificación obligatoria (Markey y col. 1996; Pospichil y col. 2006). Durante los años 2012 al 2013 en un estudio serológico realizado con 5, 321 muestras de borregas de 209 rebaños, en siete estados de México mediante la prueba de ELISA se encontraron animales positivos a *C. abortus* con prevalencias entre el 7.09% al 13.08 %, mientras que por rebaño fue de 43.34 % en los estados de Sonora, Chiapas, Querétaro, Chihuahua, Tlaxcala, Hidalgo y Estado de México (Palomares y col. 2020).

En los rebaños caprinos del mundo la clamidiosis tiene un gran impacto económico y de salud pública, donde se han reportado como la segunda causa de abortos infecciosos después de la brucelosis; en Alemania se hizo el primer reporte sobre abortos por *Chlamydia*, seguido de Bulgaria, España, EUA, Francia, India, Japón, Reino Unido, Grecia y Túnez (Rodolakis, 2001).

En México, en el año 1997 se originó el primer reporte de aislamiento de la bacteria a partir de un aborto en caprinos (Escalante y col. 1997); para el año 2012 se obtuvieron 43 aislamientos de *C. abortus* a partir de muestras de exudado vaginal de cabras que abortaron o que estaban recién paridas en rebaños del estado de Guanajuato (Mora y col. 2015). En el año 2014, se realizó el aislamiento de *Chlamydia* spp., a partir de 186 muestras de exudado vaginal de cabras, observándose inclusiones citoplasmáticas mediante la técnica de inmunofluorescencia en 43 de ellas (23.11 %), pertenecientes a los estados de Veracruz, Jalisco, Coahuila y Querétaro (Sánchez, 2014).

Características generales de *Chlamydia* spp

Chlamydia posee un genoma de 1.1 a 1.25 Mb, poseen también ácidos nucleicos y grupos de enzimas para la síntesis de macromoléculas, aunque no poseen enzimas productoras de energía; de ahí que sean incapaces de sintetizar sus propios componentes energéticos. Son consideradas Gram negativas, cuentan con un lipopolisacárido (LPS) común, pero los estudios bioquímicos demuestran que la pared celular carece de

peptidoglicano (Essig y Longbottom, 2015; Navarro y col. 2004; Borel y col. 2006; Ann-Charlotte y col. 2010; Rodolakis y Mohamad, 2010).

Las bacterias del género *Chlamydia* son intracelulares obligadas y se consideran endémicas a nivel mundial. Se multiplican en el citoplasma celular formando cuerpos de inclusión, se caracteriza por un ciclo de desarrollo que comprende un cuerpo grande, llamado cuerpo inicial reticular e intermedio, de pared fina y no infeccioso; y un pequeño microorganismo de pared celular rígida e infeccioso, denominado cuerpo elemental (Everet y col. 1999; Rodolakis 2001; Longbottom y Coulter 2003; Aitken y Longbottom, 2007).

El llamado cuerpo elemental, que es la forma madura patógena infectiva, inicia la infección celular. El cuerpo elemental es una partícula de 0.2 a 0.4 micras con un núcleo y numerosos ribosomas, provista de una pared bilaminar. Este cuerpo elemental una vez que ha penetrado en la célula hospedadora se sitúa en el interior de una vesícula, cuya pared parece originarse por una invaginación de la membrana citoplasmática. Posteriormente y durante varias horas reorganiza su estructura interna, aumenta de tamaño y se transforma en el llamado cuerpo reticular, que es un esferoide de 0.8 a 1.6 micras de diámetro, de estructura interna reticular que contiene fibrillas nucleares. El cuerpo inicial representa la fase vegetativa aparentemente no es infecciosa y se multiplica dentro de la vesícula, por simple división. Las células hijas así formadas continúan dividiéndose, para finalmente reducir de modo gradual su tamaño y transformarse primero en las llamadas formas intermedias de masa nuclear densa y pared laminar, las cuales al reducirse todavía más forman el cuerpo elemental maduro e infeccioso. Los nuevos cuerpos elementales se liberan por ruptura de la vesícula y de la célula hospedadora e invaden nuevas células, repitiéndose el ciclo (Aitken y Longbottom, 2007).

Evolución y taxonomía del género *Chlamydia*

El género *Chlamydia* fue originalmente considerado como virus, por su incapacidad de crecer fuera de una célula viva, luego se pensó que eran organismos intermedios situados entre bacterias y virus, hasta que el cultivo del agente etiológico de la psitacosis en la membrana corioalantoidea y luego en el saco vitelino de embriones de

pollo, permitió la realización de estudios bioquímicos y biológicos que demostraron que son organismos procariotas que parasitan células eucariotas. Para 1966, solo se conocían dos especies *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia psittaci*, hasta que Everett y col. 1999 ampliaron el análisis de la secuencia de ADN para reevaluar la relación genética en el orden *Chlamydiales* y proponer la nueva taxonomía, reclasificando a la familia *Chlamydiaceae*, del orden *Chlamydiales* en dos géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila* y nueve especies derivadas del análisis de la secuencia de los genes ARN ribosomales 16S y 23S. El género *Chlamydia* incluía las especies: *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum* mientras que el género *Chlamydophila* incluía: *C. psittaci*, *C. felis*, *C. abortus* antes *Chlamydia psittaci* serotipo 1, *C. caviae*, la antigua especie *C. pecorum* y *C. pneumoniae* (Everet y col. 1999; Bush y Everet 2001; Longbottom y Coulter, 2003; Borel y col. 2006; Godin y col. 2008; OIE, 2018).

Actualmente el phylum Chlamydiae consiste en una sola clase (*Chlamydia*) que comprende dos órdenes (*Chlamydiales* y *Parachlamydiales*), el orden *Chlamydiales* comprende cuatro familias, *Candidatus Actinochlamydiaceae*, *Candidatus Clavichlamydiaceae*, *Chlamydiaceae*, y una no clasificada (Chen y col. 2019).

La familia *Chlamydiaceae* actualmente se clasifica en un solo género *Chlamydia* incluyendo especies, que afectan a diferentes hospedadores *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* que son patógenos en humanos, *C. muridarum* afecta a ratón y hámster, *C. caviae* es causante de conjuntivitis en cobayos, *C. suis* está relacionada con abortos espontáneos y neumonías en cerdos, *C. felis* infecta gatos provocando problemas respiratorios, *C. psittaci* relacionada principalmente con afecciones en aves, *C. abortus* es principalmente encontrada en rumiantes y *C. pecorum* está presente en rumiantes y koalas. Además, recientemente se han incorporado las especies *C. avium*, *C. gallinaceae* en aves, *C. ibidis* en aves, *C. serpentis*, *C. poikilothermis* en serpientes. Asimismo, dos especies candidatas llamadas *Candidatus*, *Ca. C. corallus* y *C. sanzinia*, *C. buteonis* (Aitken y Longbottom, 2007; Vorimore y col. 2013; Sachse y col. 2015; Sachse y col. 2015; Taylor-Brown y col. 2016; Staub y col. 2018, Laroucau y col. 2020; Borel y Greub, 2021).

Transmisión

Los rumiantes infectados son la principal fuente de transmisión y en el momento del parto o aborto eliminan gran cantidad de microorganismos en la placenta, el feto y los fluidos fetales. La infección suele originarse a partir de la ingestión de la placenta o hierba contaminada por descargas vaginales y la placenta. Cantidades pequeñas de *Chlamydia* spp. son eliminadas también por la orina, leche y heces durante varios días después del aborto (Petit y col. 2008; Sachse y col. 2009).

Las cabras infectadas eliminan una gran cantidad de bacterias en la placenta y fluidos fetales al momento del parto y cuando ocurre el aborto, algunas hembras lo pueden hacer durante las dos semanas anteriores o posteriores al parto o aborto, lo cual explica la alta incidencia de abortos que ocurren en rebaños recién infectados, ya que la susceptibilidad a la infección varía en relación con el estado fisiológico del animal. Cabras que tienen menos de 100 días de gestación son más susceptibles que aquellas cabras que están al final de la preñez o aquellas que no están gestantes. Las cabritas nacidas de cabras infectadas pueden mantener la infección en el rebaño o transmitirla a otros rebaños (Rodolakis, 2001).

La transmisión venérea también ha sido descrita, estudios han demostrado que las bacterias pueden ser excretadas en el semen de los toros y carneros tanto natural como experimentalmente infectados, donde se ha logrado el aislamiento del agente. La mucosa vaginal en el ganado ovino y la mucosa uterina en el ganado bovino son susceptibles a la infección y se ha demostrado la transmisión de la bacteria por semen infectado experimentalmente a novillas y borregas. En el caso de la transmisión venérea de clamidiosis por los machos cabríos aún no se ha confirmado plenamente (Rodolakis, 2001; Petit y col. 2008; Sachse y col. 2009; Ann-Charlotte y col. 2010; Karlsson y col. 2010; Rodolakis y Mohamad, 2010).

Patogenia

La patogénesis se inicia sobre los 90 días de gestación, coincidiendo con una fase de rápido crecimiento fetal. En rebaños infectados los animales se contagian de cuerpos elementales presentes en fetos abortados, placenta y descargas vaginales, estas formas infecciosas se diseminan primero por sangre, llegando en uno a cinco días a diferentes órganos incluyendo linfonodos mesentéricos e intestino. Se produce un periodo de

latencia hasta los días 45 a 60 de gestación que resulta indetectable. A partir de este momento se produce una segunda clamidemia que llega cerca de la placenta y tras el día 60 de gestación aproximadamente, la bacteria coloniza las células epiteliales de la placenta produciendo hemorragias en el estroma de las carúnculas del corion. Después de esto se presenta placentitis necrótica que altera el paso de nutrientes al feto y una infección sistémica de éste, causando la muerte y expulsión fetal en el último tercio de la gestación. En el hígado fetal y en los pulmones ocurren cambios menos drásticos y en casos en que el daño placentario es grave, puede presentarse daño cerebral debido a hipoxia. El aborto es probablemente el resultado de una combinación de alteraciones en la alimentación materno-fetal y en el intercambio gaseoso, perturbaciones en la regulación hormonal de la gestación y agresión inducida por citoquinas (Navarro y *col.* 2004; Berri y *col.* 2009; OIE, 2018).

Signos clínicos

La clamidiosis se caracteriza clínicamente por abortos en los últimos meses de gestación, animales nacidos muertos o parto prematuro que resulta en animales débiles con bajos pesos al nacimiento. El aborto ocasionado por la bacteria ocurre en borregas y cabras, y con menor frecuencia en vacas y ciervos. Los animales infectados no muestran enfermedad clínica antes del aborto, el cual generalmente ocurre sin signos clínicos específicos, aunque se pueden presentar cambios de comportamiento y descargas vaginales que contienen un gran número de cuerpos elementales (CEs) 24-48 horas previas al aborto, que ocurre en las dos o tres últimas semanas de gestación normal, aunque en algunos casos puede ocurrir antes (Rodolakis y *col.* 1998, Entrican y *col.* 2001, Gutierrez y *col.* 2011, Entrican y *col.* 2012, Longbottom y *col.* 2013).

Las cabras pueden presentar tos, artritis, queratoconjuntivitis y en infecciones experimentales se han observado ligeras descargas vaginales previo al aborto. En las cabras y en los bovinos se observa una frecuencia mayor de retención placentaria, endometritis y vaginitis, aunque esto no es una regla (Entrican y *col.* 2001; Essig y Longbottom, 2015). En borregas s, el aborto en la fase terminal de la gestación es seguido de la expulsión de las membranas fetales necróticas (OIE, 2018).

Después del aborto las hembras suelen recuperarse rápidamente o tienden a presentar una descarga vaginal café en el caso de las cabras. En un rebaño de cabras recién infectado la tasa de abortos es severa, del 30% o hasta el 90% de las gestantes abortan y la producción de leche disminuye. La tasa de abortos es observada en los primeros dos a tres años y después solo el 10% de las hembras gestantes abortaran cada año por varios años hasta que un nuevo brote ocurra y las hembras primíparas abortaran; esta presentación cíclica es debida a la inmunidad adquirida después del aborto en el rebaño y es poco frecuente que una hembra aborte dos veces (Rodolakis, 2001). Papp y Shewen (1996) demostraron que algunas borregas que abortaron pudieron quedar crónicamente infectadas, al ser detectado ADN de *Chlamydia* en vagina, útero y oviductos durante el periodo periovulatorio.

Los cabritos nacidos cerca de la fecha de parto pueden estar cubiertos por un material de color café, edema difuso claro o sanguinolento, fluidos teñidos de sangre en la cavidad abdominal y pleural, además de petequias en la lengua, cavidad bucal y en las pezuñas (Rodolakis, 2001).

Las infecciones agudas con *C. pecorum* y *C. abortus* en bovinos se han asociado con diversas enfermedades clínicas, además del aborto y la infertilidad, se pueden observar encefalomiелitis esporádica, queratoconjuntivitis, neumonía, enteritis y poliartitis (Biesenkamp-Uhe y col. 2007).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la infección por clamidia se hace basándose en la historia clínica de los abortos presentados principalmente en las últimas fases de la gestación. En caso de abortos se debe remitir al laboratorio; cotiledones infectados, membranas placentarias, pulmón o hígado fetal y muestra de sangre de las hembras que han abortado. Se recomienda el envío de exudados vaginales, los cuales deberán ser colectados con hisopos justo después del aborto o máximo 14 días después (Rodolakis y Laroucau, 2015; OIE 2018).

El manejo y la toma de muestras es importante, por lo que tanto las muestras de tejido como los hisopos vaginales deben mantenerse en medio de transporte adecuado, antes de iniciar el proceso de aislamiento. Este medio debe contener

sacarosa/fosfato/glutamato (SPG) suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos, estreptomina y gentamicina, pero no penicilina y un inhibidor fúngico. Normalmente se utiliza una relación de 1:10 entre el tejido y el medio (OIE, 2018).

Existen dos enfoques principales para el diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia* spp., basados en diferentes técnicas de laboratorio:

Detección directa del agente en el tejido

- Bacteriología: al examen microscópico se observa el microorganismo en improntas tenidas de la placenta infectada y de abomaso del feto o frotis a partir de hisopos vaginales de hembras que han abortado o de la lana húmeda de un aborto reciente o de un cordero nacido muerto que aún no haya sido limpiado por su madre. La tinción de *Chlamydia* por la técnica de Stamp (tinción de Ziehl–Neelsen modificada), Gimenez o Machiavelo es rápida y puede ser efectuada en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico, pero su interpretación es difícil ya que se requiere de experiencia para poder diferenciarla de *Brucella* spp. y *Coxiella* spp. En casos positivos teñidos con la técnica de Stamp, se pueden observar por un examen microscópico de alta resolución cuerpos elementales cocoides (300 nm) aislados o en grupo sobre un fondo azul de restos celulares; bajo iluminación en campo oscuro los cuerpos elementales son de color verde pálido. (Kauffold y col. 2007; Sachse y col. 2009; Rodolakis y Mohamad, 2010; Carcenado y Cantón, 2012). Los frotis teñidos pueden ser útiles como una prueba de detección inicial, pero la confirmación por métodos moleculares es muy recomendable debido a la sensibilidad inferior de la tinción y la falta de especificidad de especie (OIE, 2018).

- Aislamiento: el aislamiento es la prueba de oro, para el diagnóstico de la infección, al ser un abacteria intracelular obligada, requiere ser aislada y propagada en embrión de pollo y cultivo celular. El éxito del aislamiento es dependiente de la línea celular y la especie de *Chlamydia*. La línea celular Mc Coy es la más comúnmente utilizada para el aislamiento de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum*; sin embargo también pueden crecer en la línea celular L929 de fibroblastos de ratón y las células BGMK. *C. pecorum* ha mostrado dificultades al ser aislada en cultivo, por lo cual es necesario realizar una serie de pases, además de que se han utilizado otras líneas celulares como las células de adenocarcinoma colonico humano (CaCo). La realización de pruebas como inmunofluorescencia (IF), es necesaria para poder confirmar la

presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en el microscopio de fluorescencia (Kauffold y col. 2007; Sachse y col. 2009; Lenzko y col. 2011; Cebrián, 2012). El proceso crónico de la enfermedad, junto con la reacción generalizada de defensa activa del feto explicaría el reducido número de bacterias encontrados en bovinos comparado con los que se encuentran en ovino donde la enfermedad cursa de una manera más aguda (Cebrián, 2012). El cultivo sigue siendo insustituible en estudios de validación de nuevos métodos diagnósticos como PCR, para demostrar la viabilidad del microorganismo, obtener cepas para caracterización por métodos moleculares, producción de antígenos, en pruebas de sensibilidad a antibióticos o en ensayos clínicos de eficacia de tratamientos (Carcenado y Cantón, 2012).

- PCR: La amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para verificar la presencia de la bacteria en muestras biológicas es el método de elección debido a la alta sensibilidad y especificidad de la PCR. La PCR permite la identificación rápida y específica a partir de muestras clínicas como son placenta o hisopo vaginal, utilizando diferentes grupos de iniciadores que han sido desarrollados para identificar en su conjunto toda la familia o género de *Chlamydia*, así como, para identificar cada una de las especies de estas bacterias. (Everett y Andersen, 1999; Longbottom y Coulter, 2003; Pospischil, 2006; OIE, 2018). Muchos protocolos de PCR han sido descritos en la literatura, la mayoría basados en el ARNr o el gen *ompA* (Sachse y col. 2009; Carcenado y Cantón, 2012).

Detección serológica en muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos.

- Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA): Existen varias pruebas de ELISA para el diagnóstico de *Chlamydia*, sin embargo se debe tener cuidado de seleccionar el apropiado para cada problema de diagnóstico teniendo en cuenta las diferentes especificidades y sensibilidades. Los ELISA basados en antígenos de LPS o EB (corpúsculos elementales) no permiten diferenciar entre los animales infectados por *C. pecorum* y los infectados por *C. abortus*, pero se demostró que son herramientas de detección primaria más sensibles que la prueba de fijación del complemento. Se puede lograr una detección específica de anticuerpos anti-*C. abortus* mediante el uso de ELISA basados en péptidos sintéticos de MOMP, MOMP recombinante. Más recientemente, se ha comercializado un nuevo ELISA indirecto basado en POMP90 y se

ha demostrado que es sensible y específico de *C. abortus*, en particular para la diferenciación de animales infectados por esta bacteria (OIE, 2018; Vretou y col. 2007; Sachse y col. 2009).

- IF: el uso de conjugados de inmunoglobulinas marcados con isotiocianato de fluoresceína incrementa la sensibilidad y la especificidad de la prueba para poder detectar a la bacteria en frotis, cultivo celular o improntas de la placenta (Rodolakis, 2001; Vretou y col. 2007). Las pruebas comerciales que existen, basadas en la detección del LPS específico del género *Chlamydia*, pueden detectar infecciones tanto en humanos como en animales.

- IHQ: la inmunohistoquímica (IHQ) usa anticuerpos monoclonales en combinación con estreptavidina-biotina dirigidos contra antígenos de superficie de *Chlamydia* como LPS y MOMP, lo cual aumenta la sensibilidad de esta técnica, aunque su interpretación depende del resultado obtenido en otras pruebas (Sachse y col. 2009).

Las pruebas serológicas, por su baja especificidad son de poca utilidad, a no ser que se tenga una monitorización continua de la explotación o se asocien a otras pruebas de diagnóstico directo (Cebrián, 2011).

Uso de PCR en tiempo real para la identificación de *Chlamydia*

Los métodos moleculares, particularmente la PCR permite la identificación de la familia y la diferenciación genética de las especies (Sachse y col. 2009; Rodolakis y Laroucau, 2015).

La PCR en tiempo real (PCR-tr) a diferencia de la PCR punto final permite cuantificar la cantidad del agente presente en la muestra y se ha convertido en el método preferido de los laboratorios de diagnóstico debido a su alta especificidad, rapidez y rendimiento (Sachse et al., 2009). La acumulación de producto amplificado se controla midiendo la señal fluorescente generada por la digestión con exonucleasa de una sonda fluorogénica de doble marcado. Además, la PCR-tr no requiere el manejo de la muestra posterior a la PCR, lo que impide la posible contaminación por transferencia de productos de PCR y da como resultado ensayos más rápidos y de alto rendimiento (Sachse y col. 2009).

- La mayoría de estas pruebas de PCR-tr específicas de familia están dirigida al gen de la subunidad 23S ARNr y el gen que codifica el antígeno MOMP designado como *omp1* u *ompA* (Yoshida y col. 1998; Everett y Andersen, 1999; Ehricht y col. 2006; Pantchev y col. 2010; Rodolakis y Laroucau, 2015). La OIE recomienda un sistema jerárquico que incluya una PCR específica de *Chlamydiaceae* basada en las secuencias de subunidad 23S ARNr (Ehricht y col. 2006) y si el resultado es positivo, seguida de una PCR específica de especie basada en secuencias de *ompA* (Livingstone y col. 2009; Pantchev y col. 2009) o ensayos de hibridación de microchips de ADN (Sachse y col. 2005). Este último alberga cuatro dominios variables, cada uno de ellos flanqueado por una región conservada. Esta estructura primaria heterogénea hace que *ompA* sea un objetivo ideal para el diagnóstico por PCR, así como para la diferenciación intraespecífica (Sachse y col. 2009; Carcenado y Cantón, 2012).

Genotipificación de *Chlamydia* spp.

Actualmente, los métodos de genotipificación son una herramienta que complementa a los procedimientos fenotípicos en la identificación de los microorganismos causantes de una enfermedad, permitiendo además la comparación entre cepas de la misma especie, contribuyendo a la determinación de la fuente de la infección, patrones de diseminación y en el establecimiento de la relación entre genotipo y enfermedad, extendiendo los alcances de la epidemiología y permitiendo un mayor entendimiento de los problemas asociados al proceso salud-enfermedad, incrementando la posibilidad de implementar medidas efectivas de control epidemiológico (Vílchez y Alonso, 2009; Carcenado y Cantón, 2012).

La disponibilidad de genomas completos de miembros pertenecientes al orden Chlamydiales, permite definir un genoma núcleo común a todos los miembros conocidos, que llega a ser de más del 90 % de similitud entre miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Este alto grado de similitud entre las diferentes especies de *Chlamydia* spp., está relacionado con su ciclo biológico que dificulta la posibilidad de intercambio genético con otras especies, pero también sugiere que la tasa de variabilidad genética es baja y basada fundamentalmente en mutaciones puntuales, más que en eventos de

recombinación lo que dificulta la realización de esquemas de tipificación dentro de la familia *Chlamydiaceae* (Carcenado y Cantón, 2012).

Con respecto a la caracterización de *C. abortus*, estudios que utilizan diferentes fenotipos y enfoques moleculares, como son, la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales, los patrones de restricción del gen *ompA* y el análisis filogenético de los genes ARNr, han sugerido que la heterogeneidad genética entre cepas de *C. abortus* es baja, mostrando poca o nula evidencia de diversidad genética con respecto al hospedero, la enfermedad asociada o el origen geográfico de las cepas (Denamur y col. 1991; Salinas y col. 1995; Everett y col. 1999; Vretou y col. 2007; Siarkou y col. 2015). Sin embargo, en 2008, Pannekoek y col. describieron el sistema MLST (tipificación por secuencias multilocus) para la familia *Chlamydiaceae*, donde las variaciones en regiones específicas de diferentes genes conservados se detectan de forma directa por secuenciación del ADN, permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con genotipos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) conocidos como secuencias tipo (ST). El sistema MLST, basado en el análisis de secuencias parciales de siete genes conservados, ha permitido la comparación entre cepas de *C. abortus*, estableciéndose distintos genotipos (ST) relacionados con el hospedero, enfermedad y fuentes de origen de dichas cepas (Vázquez y Sonsoles, 2004; Pannekoek y col. 2010). Estas regiones son responsables de la mayor parte de la variabilidad observada en cada gen, mientras que el resto del locus presenta un alto grado de conservación. Por lo que se analiza en cada gen una región de entre 450 a 500 pb, cuyo nivel de variabilidad combinado entre los genes analizados, proporciona un alto grado de discriminación. Estas regiones pertenecen a los genes: *gatA*, *oppA*, *hflX*, *gidA*, *enoA*, *hemN* y *fumC*, que codifican la subunidad A de la amido transferasa de aspartilo/glutamilo- ARNt, proteína que se une a oligopéptidos, proteína de unión a GTP, arnT (uracilo 5) metil transferasa, enolasa, coproporfirinogeno III oxidasa y fumarato hidratasa, respectivamente (Vázquez y Sonsoles, 2004; Pannekoek y col. 2010). Según los datos publicados hasta el momento, se reconocen seis ST diferentes de *C. abortus* ST19, ST25, ST29, ST30, ST86 y ST87 (Pannekoek y col. 2010; Siarkou y col. 2015).

La secuenciación de genes y estudios serológicos, han sugerido que existe una gran diversidad de cepas dentro de la especie *C. pecorum*, consistente con la amplia variedad

de hospedadores y enfermedades relacionadas (Mojica y col. 2011). Existe variación genética entre cepas de *C. pecorum* en los genes *ompA*, *incA*, ARNr y la proteína hipotética ORF663 (Sait y col. 2014). De estos el gen *ompA*, que codifica una proteína de membrana externa asociada con la virulencia, uno de los genes conservados más polimórficos dentro del género *Chlamydia*, ha sido utilizado comúnmente como sustituto para aproximar la evolución general de los genomas de *Chlamydia*; la secuencia de nucleótidos de este gen, ha sido frecuentemente usada para genotipificar *C. pecorum* aislada a partir de bovinos, ovinos, porcinos, caprinos y koalas, mostrando una considerable diversidad genética de múltiples tipos *ompA* de *C. pecorum* en una especie hospedera particular, además permite clasificar las cepas de *C. pecorum* en baja y alta virulencia. Esta diversidad está basada en la recombinación dentro de los cuatro dominios variables del gen (Jackson y col. 1997; Kaltenbok, 2009; Kollipara y col. 2013; Mohamad y col. 2014; Legione y col. 2016).

Prevención y control

Ante un brote, el primer objetivo consiste en limitar los focos de infección. Los animales que abortan o paren una cría débil o muerta deben de ser marcados y aislados hasta que su flujo uterino haya desaparecido. Los fetos abortados, las crías muertas, las placentas y las camas contaminadas deben ser retirados y destruidos; los corrales donde hayan abortado deben limpiarse y desinfectarse. A medida que avanza la época de partos se hace necesaria la vigilancia continua para garantizar la detección y el aislamiento rápido de todos los animales afectados. Para reducir la presencia de los abortos ocasionados por *Chlamydia* se puede emplear una terapia preventiva con oxitetraciclina intramuscular en todos los animales gestantes de la explotación debido a que la supresión de la multiplicación clamidial puede prolongar la duración de la gestación comprometida. Posteriormente se puede continuar con aplicaciones a los 3 y 7 meses de gestación de dos inyecciones de oxitetraciclina separadas por un intervalo de 15 días. Este tratamiento reducirá el número de microorganismos eliminados, pero no evitará la infección ni las lesiones patológicas ya producidas en la placenta. El mejor sistema para evitar la introducción de la infección en un rebaño libre de clamidiosis

consiste en mantenerlo cerrado o bien en obtener la reposición de animales que estén exentos de la infección (Martin y Aitken, 2002).

Con respecto al tema de la resistencia bacteriana a los antibióticos, es importante evitar el uso regular preventivo de estos. Hasta el momento no se han encontrado cepas de las especies que afectan a rumiantes resistentes a tetraciclinas, aunque esta resistencia se ha reportado en cepas de *C. suis* aisladas de cerdos. En humanos el tratamiento es a partir de la administración oral de clorhidrato de doxiciclina o tetraciclina, el cual debe durar al menos 10 a 14 días después de la fiebre (Dugan y col. 2004; Rodolakis y Mohamad, 2010).

Se han utilizado bacterinas con resultados contradictorios. Las pautas de vacunación han variado desde la aplicación a todos los animales presentes en la unidad de producción, hasta la aplicación en el momento de realizar el diagnóstico de gestación. Se han realizado algunas pruebas con vacunas vivas atenuadas elaboradas con cepas mutantes termosensibles obtenidas de ovino y registradas para esta especie. El futuro de estas vacunas es esperanzador si se considera su eficacia en ganado ovino. La adaptación a ganado vacuno permitiría inmunizar a los reemplazos a la edad de seis meses (Martin y Aitken, 2002; Biesenkamp-Uhe y col. 2007).

Salud pública

Las hembras infectadas eliminan un gran número de *C. abortus* al momento del aborto o el parto, sobre todo con las descargas placentarias y uterinas. La infección en humanos ocurre principalmente por contacto directo con tales fuentes o con cultivos de laboratorio manejados con descuido, con efectos que varían desde una infección subclínica a una enfermedad aguda semejante a la gripe. El mayor riesgo es para embarazadas, las cuales presentan dolor de cabeza, malestar general, náuseas, vómitos y se asocia con frecuencia con dolor abdominal bajo, si la infección ocurre en el primer trimestre de gestación pueden llegar a presentar aborto espontáneo debido a la capacidad de *C. abortus* de colonizar la placenta humana, mientras que si la infección ocurre después puede haber partos prematuros o mortinatos. La infección en mujeres embarazadas también suele causar insuficiencia renal aguda, disfunción hepática, dificultad respiratoria y coagulación intravascular diseminada, y puede causar la muerte.

La transmisión de la infección ha sido reportada en el Reino Unido, Francia, los Países Bajos y los EUA, aunque relativamente ocurren pocos casos cada año el peligro potencial para las embarazadas y el feto en desarrollo es considerable (Longbottom y Coulter, 2003; Godin y *col.* 2008; Berri y *col.* 2009).

2. Justificación

La clamidiosis hasta el año 2016, era considerada una enfermedad exótica en el país, en ese año se reconoció como una enfermedad endémica de notificación obligatoria. Por lo cual, durante ese periodo de tiempo la mayoría de los estudios tenían un enfoque de diagnóstico, limitándose a pruebas serológicas; y se han realizado muy pocos estudios de identificación y tipificación de esta bacteria, que brinden información de los aislamientos y cepas presentes en el país. Por lo que este trabajo pretende establecer la identificación molecular de las especies dominantes y las variantes genéticas de *Chlamydia* spp. en muestras de borregas, cabras y vacas que presentaron aborto, además de búfalas de agua procedentes del estado de Chiapas. Con lo cual se podrán establecer medidas de control y prevención contra la infección, encaminadas en la futura aplicación de vacunas y la implementación de las pruebas diagnósticas usadas en este estudio para la identificación de la bacteria.

3. Hipótesis

La infección por *Chlamydia* spp., está altamente extendida en rumiantes del país y con el uso de herramientas moleculares a partir de aislamientos, se identificarán diferentes especies y genotipos de la bacteria.

4. Objetivos

Objetivo general

Determinar la especie y la diversidad genética de aislamientos de *Chlamydia* spp., obtenidos de abortos en rumiantes.

Objetivos específicos

Realizar aislamientos de *Chlamydia* spp., de diferentes estados de la República Mexicana, a partir de muestras de borregas, vacas, y cabras que presentaron aborto, y de búfalas de agua procedentes del estado de Chiapas.

Determinar la especie de *Chlamydia* spp., de las muestras positivas en cultivo celular, mediante la estandarización y realización de PCR tiempo real (PCR-tr)

Identificar el genotipo (secuencia tipo: ST) de los aislamientos de *C. abortus*, usando la técnica de tipificación por secuencias multilocus (MLST).

Secuenciación de los genes ARNr 16S y *ompA* de los aislamientos de *C. pecorum*.

5. Materiales y métodos

Colección de muestras

Se realizó un muestreo de oportunidad, en el cual se colectaron hisopos vaginales, placentas y líquidos abomasales de rumiantes (vacas, borregas y cabras), que presentaron aborto en el último tercio de la gestación y con antecedentes de problemas reproductivos por *Chlamydia* spp., en estados de la República Mexicana donde previamente se contaba con información de la infección basados en estudios serológicos (Jiménez-Estrada y col. 2008; Campos-Hernández y col. 2014; Mora y col.2015; Palomares y col. 2020). Además de muestras de búfalas de agua obtenidas del estado de Chiapas, las cuales convivían con vacas que presentaban aborto en el último tercio de la gestación.

Las muestras de exudado vaginal se colectaron con hisopos estériles y se colocaron en tubos cónicos que contenían 2 ml de medio de transporte SPG (217 mM sucrose, 4 mM KH₂PO₄, 7 mM K₂HPO₄, and 1% L-glutamine), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO, USA) y antibióticos (200 mg/ml estreptomicina, 50 mg/ml gentamicina, 75 mg/ml vancomicina y 25 unidades/ml nistatina (Invitrogen™)) (Sasche,2009). Estas muestras se mantuvieron a 4°C hasta su llegada al laboratorio, para después agitar los tubos con el hisopo en vortex y hacer 2 alícuotas de 0.2 ml; todos los tubos se guardaron en ultracongelación a -80°C hasta su uso.

En los casos en que se contó con la placenta o el feto abortado, estas se mantuvieron a 4°C hasta su llegada al laboratorio, una vez ahí a partir de las placentas se obtuvieron de 3 a 4 muestras de cotiledones. En el caso del feto abortado se realizó la necropsia, en la cual se colectó líquido abomasal e hígado fetal. Todos estos tejidos se maceraron y fueron colocados en tubos cónicos con medio SPG y de igual forma se realizó alícuotas de 0.2 ml; todos los tubos se guardaron en ultracongelación a -80°C hasta su uso.

. Aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia

A partir de las muestras obtenidas se realizó el aislamiento de *Chlamydia* spp., en cultivo celular utilizando la línea L929 de fibroblastos de ratón, el protocolo para la

infección de la monocapa celular fue el descrito por Escalante y *col.* (1996), con algunas modificaciones (Anexo 1). La identificación de cuerpos de inclusión en los cultivos infectados se realizó con la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) empleando el kit comercial IMAGEN *Chlamydia* test (Oxoid, UK).

Extracción de ADN a partir de muestras de rumiantes

Se realizó la extracción de ADN de las muestras de hisopos vaginales y órganos que resultaron positivas a IFD de *Chlamydia* spp. Este ADN sirvió de templado para las diferentes pruebas de biología molecular. Las extracciones se realizaron con el kit comercial Qiagen DNeasy Blood and Tissue® (Qiagen, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante para la extracción a partir de tejidos.

Identificación de la familia *Chlamydiaceae*

Se realizó la PCR-tr con sondas Taqman, que identifica un fragmento (111pb) de la subunidad 23S ARNr, presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, a partir de las extracciones de ADN obtenidas de muestras positivas a *Chlamydia* spp., mediante aislamiento en cultivo celular confirmado por IFD. Se usaron los iniciadores y sonda reportados por Ehrlich y *col.* (2006), Ch23S-F (5'-CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT-3'), Ch23S-R (5'-ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC-3') y la sonda de hidrolisis Ch23S-p FAM-5'-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-3'-TAMRA. Las reacciones fueron llevadas a cabo en una placa de 96 pozos, en volúmenes de reacción de 20 µl: 10 µl de 2X QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard), QuantiNova ProbePCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Qiagen®, Alemania), 0.4 µM de cada iniciador, 0.1 µM de sonda de hidrolisis y 2 µl de ADN de las muestras. La amplificación y la detección fueron realizadas con un equipo LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 seg y 65 °C por 2 seg.

La estandarización de la PCR-tr, se realizó mediante una curva estándar utilizando ADN purificado del fragmento de la subunidad 23S ARNr de 111 pb, de la cepa AB7 de *C. abortus*, con una concentración de 0.06 ng, a partir de este se realizaron diluciones decuples seriadas 10^{-1} hasta 10^{-10} hasta establecer un límite de detección de 0.0066 femtogramos con el ciclo umbral (Ct), determinado en el ciclo 36 (figura 1).

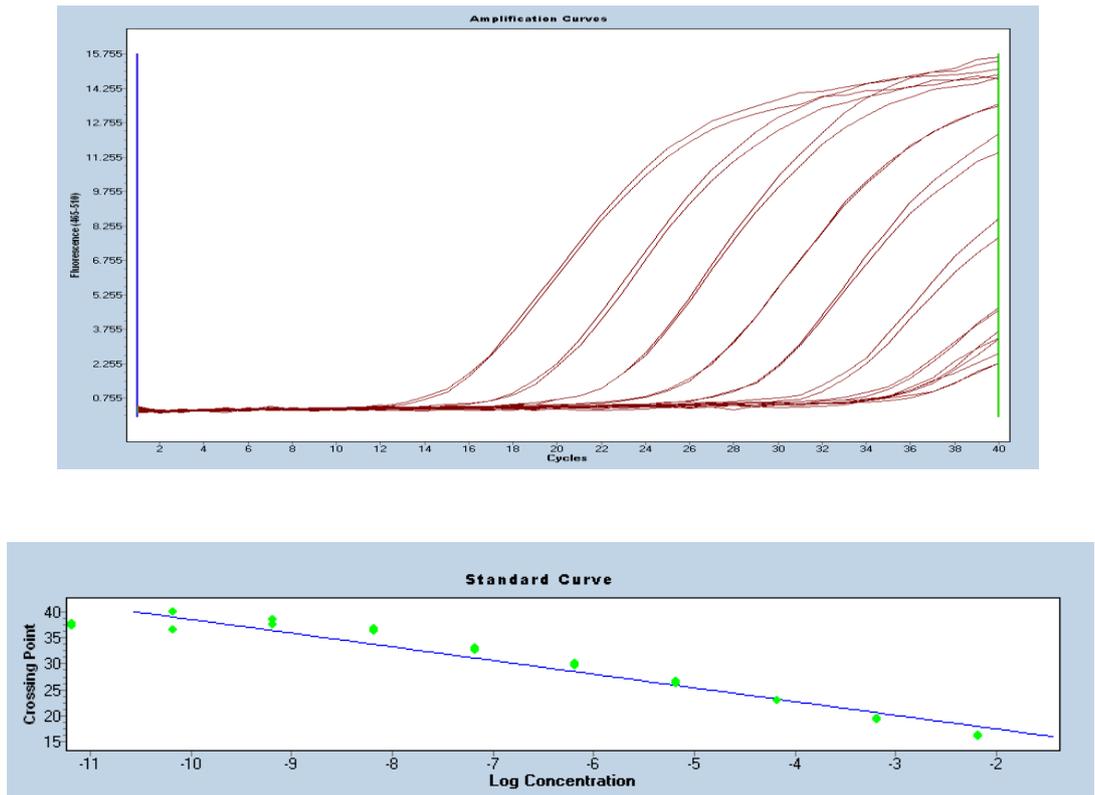


Figura 1. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del fragmento de la subunidad 23S ARNr perteneciente a la familia *Chlamydiaceae*. Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Identificación de la especie de *Chlamydia* spp mediante PCR-tr

Para la identificación de la especie de *Chlamydia* se realizó PCR-tr con sondas Taqman, a partir del ADN de todas las muestras que dieron una señal positiva con la PCR-tr 23S ARNr, basándose en los iniciadores reportados por Pantchev y *col.* (2010) que identifican un fragmento del gen *ompA* específico de cada una de las especies: *C. psittaci*, *C. pecorum* y *C. abortus* (cuadro 1).

Cuadro 1. Iniciadores y sonda empleados para la PCR-tr que identifica diferentes especies de *Chlamydia*

PCR-tr	Iniciadores	Sonda	Amplicón pb
<i>C. psittaci</i>	CppsOMP1-F CACTATGTGGGAAGGTGCTTCA CppsOMP1-R CTGCGCGGATGCTAATGG	CppsOMP1-S FAM- CGCTACTTGGTGTGAC-TAMRA	76
<i>C. abortus</i>	CpaOMP1-F GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA, CpaOMP1-R ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA	CpaOMP1-S FAM- TAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTTAG CG-TAMRA,	82
<i>C. pecorum</i>	CppecOMP1-F CCATGTGATCCTTGCCTACT, CppecOMP1-R TGTCGAAAACATAATCTCCGTAATAAT	CppecOMP1-S FAM- TGCGACGCGATTAGCTTACGCGTAG- TAMRA	76

Identificación de *C. abortus* mediante PCR-tr

Las reacciones fueron llevadas a cabo en una placa de 96 pozos, en volúmenes de reacción de 20 µl: 10 µl de 2X QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard), QuantiNova ProbePCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Qiagen®, Alemania), 0.4 µM de cada iniciador, 0.1 µM de sonda de hidrólisis y 2 µl de ADN de las muestras. La amplificación y la detección fueron realizadas con un equipo LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 seg y 60 °C por 3 seg.

La estandarización de la PCR-tr para la identificación de la especie *C. abortus*. se realizó mediante una curva estándar utilizando el plásmido Plate/*ompACa* que contiene el gen *ompA* específico de *C. abortus* (Santiago, 2019), a una concentración de 8 ng, a partir de este se realizaron diluciones decuples seriadas, 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰ hasta definir un límite de detección 0.0008 femtogramos con el ciclo umbral (Ct), estableciéndolo en el ciclo 35 (figura 2).

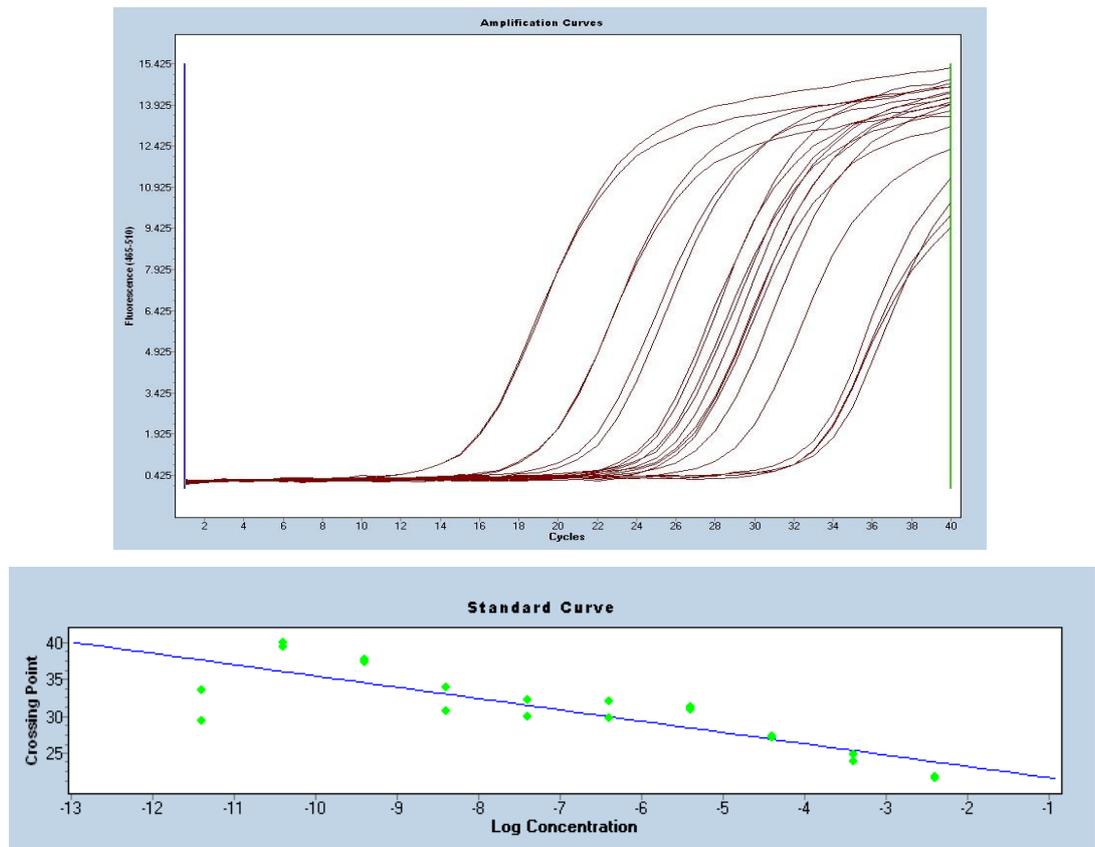


Figura 2. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR tiempo real obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del ADN plasmídico del gen *ompA* específico de *C. abortus*. Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Identificación de *C. psittaci* mediante PCR-tr

Las reacciones fueron llevadas a cabo en una placa de 96 pozos, en volúmenes de reacción de 20 μ l: 10 μ l de 2X QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard), QuantiNova ProbePCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Qiagen®, Alemania), 0.4 μ M de cada iniciador, 0.2 μ M de sonda de hidrólisis y 2 μ l de ADN de las muestras. La amplificación y la detección fueron realizadas con un equipo LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 seg y 60 °C por 3 seg.

La estandarización de la PCR-tr para la identificación de la especie *C. psittaci*. se realizó mediante una curva estándar utilizando el plásmido pGEM-ompA*C. psittaci*, a una concentración de 0.024 ng, a partir de este se realizaron diluciones decuples seriadas, 10^{-1} hasta 10^{-10} hasta definir un límite de detección de 0.024 femtogramos con el ciclo umbral (Ct), estableciéndolo en el ciclo 35 (figura 3).

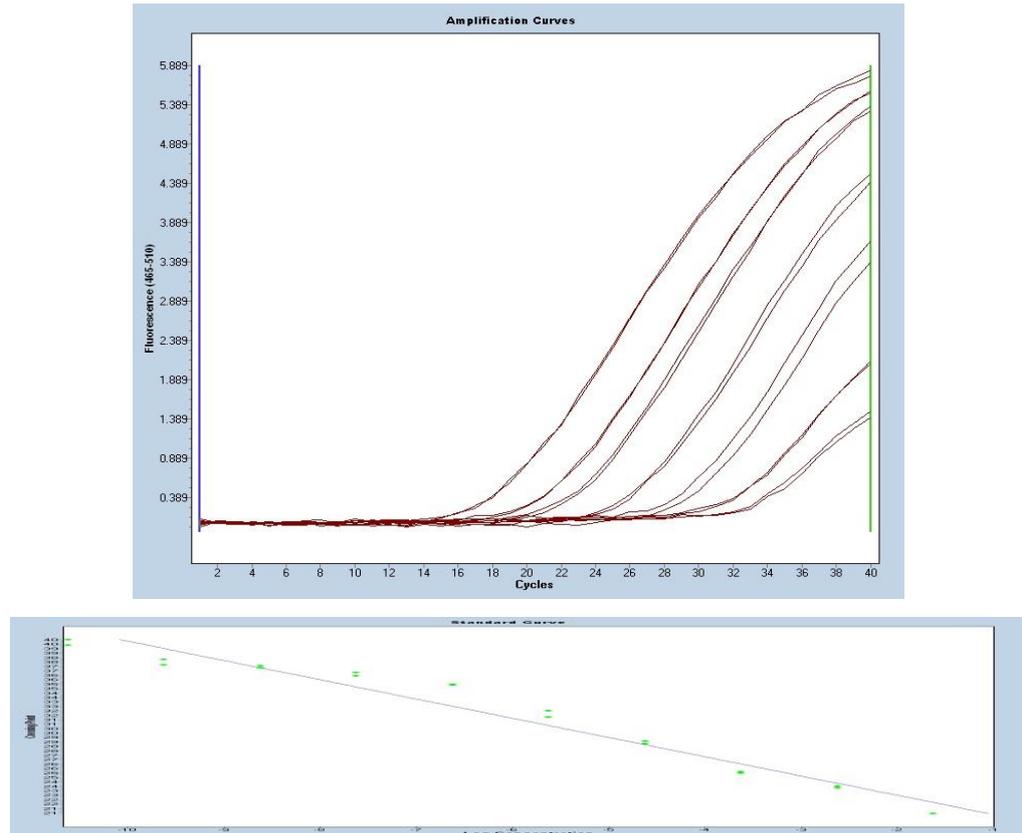


Figura 3. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR tiempo real obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del ADN plasmídico del gen *ompA* específico de *C. psittaci*. Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Identificación de *C. pecorum* mediante PCR-tr

Las reacciones fueron llevadas a cabo en una placa de 96 pozos, en volúmenes de reacción de 20 μ l: 10 μ l de 2X QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard), QuantiNova ProbePCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Qiagen®, Alemania), 0.4 μ M de

cada iniciador, 0.2 μM de sonda de hidrólisis y 2 μl de ADN de las muestras. La amplificación y la detección fueron realizadas con un equipo LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 seg y 60 °C por 3 seg.

La estandarización de la PCR-tr para la identificación de la especie *C. pecorum*, se realizó mediante una curva estándar utilizando el plásmido pGEMompAC. *pecorum*, a una concentración de 0.0185ng, a partir de este se realizaron diluciones decuples seriadas, 10^{-1} hasta 10^{-10} hasta definir un límite de detección de 1.85 femtogramos con el ciclo umbral (Ct), estableciéndolo en el ciclo 36 (figura 4).

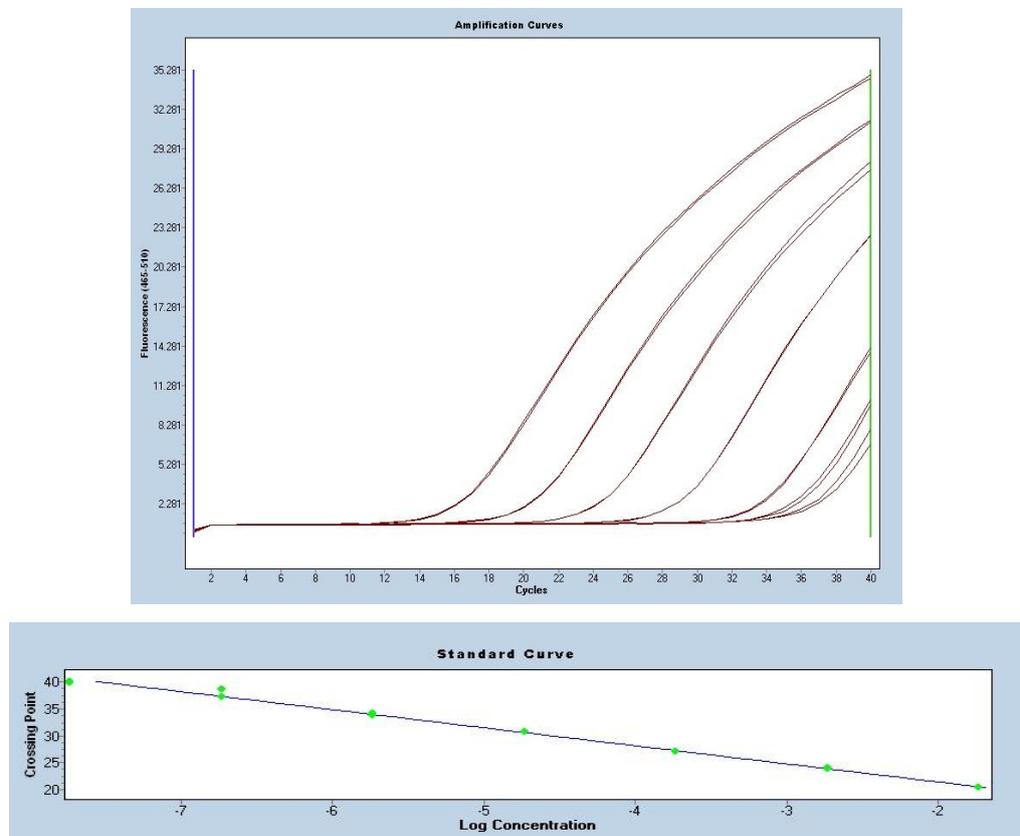


Figura 4. Curvas de amplificación para la estandarización de la PCR tiempo real obtenidas a partir de diluciones decuples seriadas del ADN plasmídico del gen *ompA* específico de *C. pecorum*. Diluciones 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Propagación de muestras positivas en cultivo celular

Se realizó la propagación de la bacteria en cultivo celular a partir de muestras positivas mediante PCR tiempo real a *C. abortus* y *C. pecorum* (Anexo 2), eligiéndose una muestra por rebaño. Posteriormente a los aislamientos se les realizó la extracción de ADN utilizando el kit comercial Qiagen DNeasy Blood and Tissue® (Qiagen, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante para la extracción a partir de cultivo celular.

Genotipificación mediante MLST de *C. abortus*

Se realizó utilizando el esquema de MLST a partir de las muestras propagadas con señal positiva a la especie *C. abortus* en la PCR-tr. Las secuencias de los iniciadores usados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Iniciadores empleados para la genotipificación basado en el esquema de MLST de Chlamydiales

Gen	Iniciador sentido	Iniciador antisentido	Amplificon pb
<i>gatA</i>	GCTTTAGAATTARSARAWGCT	GATCCTCCGGTATCYGATCC	425
<i>oppA</i> ₃	ATGCGCAAGATATCAGTGGG	AAAGCTCCRSTWGMTATMGGWAG	473
<i>hflX</i>	GCTTCTARAGTACTTTTAAATG	TATTTTRGAAATYTTTKCSAGYCG	435
<i>gidA</i>	GGAGTCWCTACWAAAGAAGG	TCGTAYTGYACATCRAAAGG	474
<i>enoA</i>	CCTATGATGAATCTKATCAATGG	TCTTCTTCRGCWAGMCCATCT	381
<i>hemN</i>	AGATCTTCTTCWGGRGGWAGAG A	TTCYTTCAKAACSTAGGTTTT	432
<i>fumC</i>	ATTAAAAAATGTGCTGCT	CCTTCAGGAACATTYAACCC	465

Tomado de Pannekoek y col.2008; Ikryannikova y col.2010 y de la página electrónica Chlamydiales MLST (<http://pubmlst.org/chlamydiales/> <http://mlst.ucc.ie/>).

Los iniciadores se utilizaron a una concentración de 1 µM, en volúmenes de reacción de 50 µl con 25 µl de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix que incluye HotStarTaq® DNA Polymerase, Multiplex PCR Buffer, dNTP Mix (Qiagen, Alemania) y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 5 min, 45 ciclos a 94 °C por 30 s, 48 °C por 45 s y 72 °C por 45 s y una extensión final a 72 °C por 10 min

(Pannekoek y col.2008; Ikryannikova y col.2010). Esto se realizó en un termociclador Multigene Optimax (Labnet, EE. UU.). Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Para visualizar las bandas se utilizó un transiluminador UVP UV/White (Analytic Jena, Alemania). Los amplicones positivos fueron purificados mediante el sistema comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE. UU.). Las muestras fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación en ambos sentidos; enviando una concentración final de 100 ng/μl del ADN y 10 pmol de cada iniciador, en un volumen final de 16 μl.

Las secuencias fueron visualizadas, editadas y alineadas usando el programa BioEdit y Clustal omega. Las secuencias consenso obtenidas mediante PCR MLST fueron comparadas con la base de datos publicada por la Universidad de Oxford <http://pubmlst.org/chlamydiales/>. Los números para alelos y las secuencias tipo (ST) se asignaron usando la página electrónica sequence query - *Chlamydiales* locus/sequence definitions.

Genotipificación de aislamientos positivos a *C. pecorum*

Se realizó amplificando mediante PCR la subunidad 16S ARNr y *ompA* a partir de las muestras propagadas con señal positiva a la especie *C. pecorum* en la PCR-tr.

El gen de la subunidad 16S ARNr se amplificó mediante lo descrito por Everet y col.1999; Sachse y col. 2014. Los iniciadores utilizados para la subunidad 16S ARNr fueron: 16S-IGF CGGCGTGGATGAGGCAT y 16SF2-rev CCATGATGTGACGGGCGG. Se realizó la estandarización de la PCR convencional, las concentraciones finales de los iniciadores fueron de 1μM, 12.5 μl de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix que incluye HotStarTaq® DNA Polymerase, Multiplex PCR Buffer, dNTP Mix (Qiagen, Alemania) y 2 μL de ADN, en una reacción final de 25 μL, con un producto esperado de 1500 pb. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 93 °C por 3 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min y 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 7 min.

Mientras que para la identificación del gen *ompA* se utilizaron los iniciadores CTU (5'ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG-3') y CTL (5'CAAGATTTTCTAGA

(T/C)TTCAT(C/T)TTG-3´) descritos por Denamur, 1991. Se realizó la estandarización de la PCR convencional, las concentraciones de los iniciadores fueron de 1µM, con 12.5 µl de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix que incluye HotStarTaq® DNA Polymerase, Multiplex PCR Buffer*, dNTP Mix (Qiagen, Alemania), y 2 µL de ADN, en una reacción final de 25 uL, con un producto esperado de 1050 pb. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 2 min.

Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Para visualizar las bandas se utilizó un transiluminador UVP UV/White. Los amplicones positivos fueron purificados utilizando el sistema comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Las muestras fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación en ambos sentidos; enviando una concentración final de 100ng/µl del ADN y 10pmol de cada iniciador, en un volumen final de 16 µl.

Las secuencias de la subunidad 16S ARNr y el gen *ompA* se sometieron a análisis BLAST (basic local alignment search tool) en las bases de datos del GenBank, para confirmar la similitud con las secuencias de *C. pecorum* y se establecieron múltiples alimentos utilizando los algoritmos ClustalW y Muscle incluidos en el software MEGA, versión 7.0.26 (Thompson y col.1994; Edgar, 2004; Kumar y col.2016). La reconstrucción filogenética se llevó a cabo para ambos genes y para la secuencia de proteínas deducida utilizando un enfoque bayesiano con MrBayes, versión 3.2 (Ronquist y col. 2012). El análisis se realizó durante 3.000.000 réplicas con muestreos de árboles cada 100 generaciones. Los árboles con puntajes más bajos que los de la fase estacionaria fueron descartados, y los árboles que alcanzaron la fase estacionaria fueron recolectados y utilizados para construir árboles de consenso mayoritario. Se realizó un análisis de Median Joining Network utilizando el software NETWORK 4.611 (fluxus-engineering.com) con configuraciones y suposiciones predeterminadas.

El número más probable de agrupaciones de 198 secuencias de *C. pecorum* de diferentes distribuciones geográficas se determinó con el software STRUCTURE, versión 2.3.2 (Pritchard y col.2000). El valor de K o el número teórico de las poblaciones independientes de la distribución geográfica de cada una de las poblaciones

de *Chlamydia* se obtuvo utilizando los valores predeterminados del software: frecuencias alélicas correlacionadas y mezcla. Se realiza una única ejecución del algoritmo con una asociación aleatoria inicial de alelos en grupos K establecida con diez réplicas independientes para cada valor de K de 1 a 25 y con una longitud del período burnin de 10 000 y número de repeticiones MCMC (Number of Markov chain Monte Carlo) después de la fase estacionaria de 100 000. El número apropiado de grupos se determinó calculando el valor Delta K (Evanno, 2005). Se realizó una segunda ejecución utilizando el valor de Delta K asignado en el programa (K = 15), estos nuevos análisis se realizaron con una duración del período de quemado de 50000 y el número de repeticiones de MCMC después del período burnin de 200000.

6. Resultados

Colección de muestras

Se obtuvo un total de 706 muestras de hisopos vaginales u órganos, procedentes de rumiantes que presentaron aborto (138 borregas, 157 vacas y 359 cabras). Las muestras se obtuvieron justo después del aborto o máximo 14 días después de la presentación de este. Además de 52 muestras de búfalas de agua obtenidas del estado de Chiapas, las cuales convivían con vacas que presentaron aborto en el último tercio de la gestación (cuadro 3). Los estados muestreados, así como la cantidad de muestras obtenidas en el caso de las borregas, cabras y vacas se presentan en las figuras 5, 6 y 7.

Cuadro 3. Tipo y cantidad de muestras colectadas por especie animal (tanto órganos como hisopos vaginales)

Especie	Hisopo	Cotiledones	Hígado	Líquido	Total
borregas	107	13	2	16	
vacas	157				157
cabras	346	7	3	3	359
búfalas	52				52



Figura 5. Estados de la República Mexicana muestreados para la colección de muestras de borregas con antecedentes de aborto.

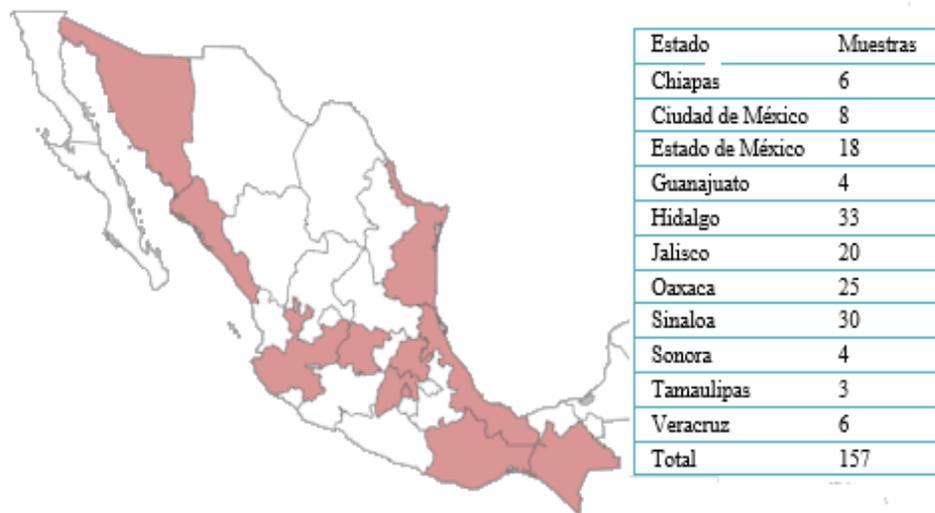


Figura 6. Estados de la República Mexicana muestreados para la colección de muestras de vacas con antecedentes de aborto.



Figura 7. Estados de la República Mexicana muestreados para la colección de muestras de cabras con antecedentes de aborto.

Aislamiento en cultivo celular e inmunofluorescencia

Mediante el aislamiento en cultivo celular e IFD, se logró confirmar la presencia de *Chlamydia* spp., en el 26 % (184/706) del total de muestras estudiadas. Se encontraron muestras positivas en el 36.9 % (51/138) de las muestras de borregos, 25.3 % (91/359)

de las muestras pertenecientes a cabras, el 25.4 % (40/157) de las muestras pertenecientes a vacas y el 3.8% (2/52) de las muestras de búfalas de agua procedentes de Chiapas (cuadro 4).

Cuadro 4. Total de muestras positivas por especie animal mediante el aislamiento en cultivo celular e IFD (tanto órganos como hisopos vaginales)

Especie	Hisopo	Cotiledones	Hígado	Líquido	Total
borregas	36	8	1	6	
vacas	40				40
cabras	80	7	2	2	91
bufalas	2				2

En el caso de las borregas, de los seis estados muestreados en cinco de ellos se encontro por lo menos un animal positivo, solo en las muestras procedentes del estado de Chiapas no se logró el aislamiento de la bacteria. De los once estados muestreados para el caso de las vacas, solo en Guanajuato no se obtuvo ninguna muestra positiva. En cuanto a las cabras en los diez estados muestreados hubo por lo menos un animal positivo (cuadros 5, 6 y 7).

Cuadro 5. Borregas positivas a *Chlamydia* spp., por IFD y por estado de la República Mexicana

Estado	Muestras	+	%
Aguascalientes	20	7	35
Chiapas	5	0	0
Estado de México	62	23	37
Hidalgo	4	2	50
Puebla	10	4	40
Querétaro	37	15	40.5
Total	138	51	36.9

Cuadro 6. Vacas positivas a *Chlamydia* spp., por IFD y por estado de la República Mexicana

Estado	Muestras	+	%
Chiapas	6	1	16,7
Ciudad de México	8	7	87,5
Estado de México	18	1	5,6
Guanajuato	4	0	0,0
Hidalgo	33	10	30,3
Jalisco	20	2	10
Oaxaca	25	4	16,0
Sonora	4	3	75,0
Sinaloa	30	9	33,3
Tamaulipas	3	2	66,7
Veracruz	6	1	16,7
Total	157	40	25.4

Cuadro 7. Cabras positivas a *Chlamydia* spp., por IFD y por estado de la República Mexicana

Estado	Muestras	+	%
Baja California Sur	120	23	19.1
Ciudad de México	22	6	27.3
Estado de México	2	2	100
Guanajuato	23	17	73.9
Morelos	3	1	33,3
Querétaro	10	10	100
Sinaloa	98	9	9.1
Sonora	13	4	30.7
Tlaxcala	37	12	32.4
Veracruz	31	7	22.6
Total	359	91	25.3

Identificación de familia y especie de *Chlamydia* spp., por PCR-tr

De las 184 (2 búfalas, 51 borregas, 40 vacas y 91 cabras) muestras positivas a aislamiento en cultivo celular confirmado por IFD, 178 resultaron positivas a la PCR-tr ARNr 23S que identifica a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Para el caso del PCR-tr de *C. abortus* 124/178 (69.7 %) fueron positivas, para *C. psittaci* no se encontró ninguna muestra positiva, mientras que para *C. pecorum* 14/178 (7.9 %) fueron positivas. Un total de 40 muestras (22.4%) del total de muestras positivas por IFD y PCR-tr de familia *Chlamydiaceae*, no resultaron positivas mediante PCR-tr específico de especie (cuadro 8 y figura 8).

Cuadro 8. Identificación por PCR-tr de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum* a partir de muestras de rumiantes de distintos estados de la República Mexicana

Especie	Total	IFD/ 23S ARNr	<i>C. abortus</i>		<i>C. psittaci</i>		<i>C. pecorum</i>	
		+	Total	+	Total	+	Total	+
Borregas	138	51/51	51	31	51	0	51	8
Cabras	359	91/89	89	71	89	0	89	5
Vacas	157	40/36	36	21	36	0	36	0
Búfalas	52	2/2	2	1	2	0	2	1
Total	706	184/178	178	124	178	0	178	14

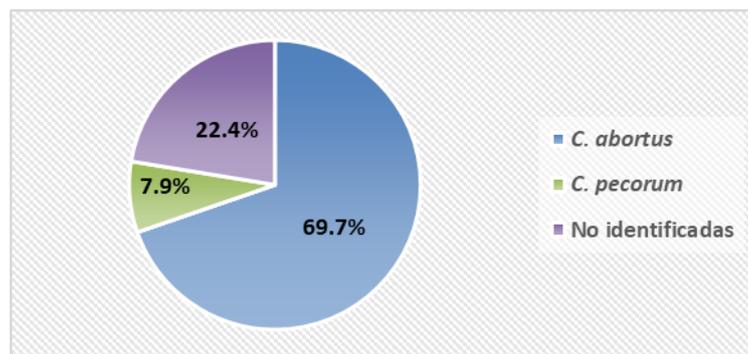


Figura 8. Muestras positivas mediante la PCR-tr específico de especie de *Chlamydia* en rumiantes.

Los 51 ADN pertenecientes a muestras de borregas con aislamiento positivo a *Chlamydia* spp., y confirmado por IFD, fueron positivos a la PCR-tr 23S ARNr de la familia *Chlamydiaceae*. A partir de las 51 muestras positivas, se realizó inicialmente la PCR-tr para identificar el gen *ompA* de *C. abortus*, de estas 31/51 (60.7 %) fueron positivas. La siguiente PCR-tr realizada fue la que identifica a *C. psittaci*, donde no se encontraron muestras positivas. Finalmente, se realizó la PCR-tr para *C. pecorum* encontrando 8/51 (15.6 %) positivas (cuadro 9), estas ocho muestras pertenecientes a animales con aborto en el ultimo tercio de la gestación y procedentes del municipio Coatepec de las harinas, en el Estado de Mexico.

Cuadro 9. Identificación de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum* a partir de muestras de borregas que presentaron aborto de distintos estados de la República Mexicana

Estado	<i>C. abortus</i>			<i>C. psittaci</i>		<i>C. pecorum</i>		+
	+ IFD	+ 23S ARNr	Muestras	+ Muestras	+ Muestras	+ Muestras		
Aguascalientes	7	7	7	6	7	0	7	0
Chiapas	0							
Estado de México	23	23	23	12	23	0	23	8
Hidalgo	2	2	2	2	2	0	2	0
Puebla	4	4	4	3	4	0	4	0
Querétaro	15	15	15	8	15	0	15	0
Total	51	51	51	31	51	0	51	8

De los bovinos, las 40 muestras de vacas con aislamiento positivo a *Chlamydia* spp. que fueron confirmados por IFD, 36 fueron positivas a la PCR-tr 23S ARNr que identifica a la familia *Chlamydiaceae*. A partir de las 36 positivas, se realizó la PCR-tr para identificar el gen *ompA* de *C. abortus*, de estas 21/36 (58.3 %) resultaron positivas. Las siguientes PCR-tr evaluadas fueron para *C. psittaci* y *C. pecorum* para las cuales ninguna muestra fue positiva (cuadro 10).

Cuadro 10. Identificación de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum* a partir de muestras de vacas que presentaron aborto, de distintos estados de la República Mexicana

Estado	<i>C. abortus</i>			<i>C. psittaci</i>		<i>C. pecorum</i>		+
	+	+	Muestras	+	Muestras	+	Muestras	
	IFD	23S ARNr						
Chiapas	1	1	1	1	1	0	1	0
Ciudad de México	7	5	5	3	5	0	5	0
Estado de México	1	1	1	0	1	0	1	0
Hidalgo	10	10	10	8	10	0	10	0
Jalisco	2	2	2	1	2	0	2	0
Oaxaca	4	4	4	2	4	0	4	0
Sinaloa	9	8	8	5	8	0	8	0
Sonora	3	2	2	1	2	0	2	0
Tamaulipas	2	2	2	0	2	0	2	0
Veracruz	1	1	1	0	1	0	1	0
Total	40	36	36	21	36	0	36	0

De los 91 ADN pertenecientes a las muestras de cabras con aislamiento positivo a *Chlamydia* spp., y confirmados mediante IFD, 89 resultaron positivas a la PCR-tr 23S ARNr de la familia *Chlamydiaceae*. Estas 89 muestras positivas a la PCR-tr del gen 23S ARNr, se analizaron mediante PCR-tr que identifica el gen *ompA* de *C. abortus*, resultando positivas 71/89 (79.7 %). La siguiente PCR-tr realizada fue la que identifica a *C. psittaci*, no se encontraron resultados positivos. Finalmente, se realizó la PCR-tr para *C. pecorum* encontrándose que solo 5/89 (5.6 %) fueron positivos. Dos muestras de Baja California Sur fueron positivas tanto a *C. abortus* como a *C. pecorum* (cuadro 11).

Los dos ADN pertenecientes a las muestras de búfalas de agua con aislamiento positivo a *Chlamydia* spp., y confirmados mediante IFD resultaron positivas a la PCR-tr 23S ARNr de la familia *Chlamydiaceae*. Estas 2 muestras se analizaron mediante la PCR-tr de especie, una de las cuales resulto positiva tanto para *C. abortus* como para *C. pecorum* (cuadro 6).

Cuadro 11. Identificación de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum* a partir de muestras de cabras que presentaron aborto de distintos estados de la República Mexicana

Estado	<i>C. abortus</i>		<i>C. psittaci</i>		<i>C. pecorum</i>			
	+ IFD	+ 23S ARNr	Muestras	+ Muestras	+ Muestras	+ Muestras		
Baja California Sur	23	23	23	20	23	0	23	2*
Ciudad de México	6	6	6	6	6	0	6	0
Estado de México	2	2	2	0	2	0	2	2
Guanajuato	17	15	15	11	15	0	15	0
Morelos	1	1	1	1	1	0	1	0
Querétaro	10	10	10	10	10	0	10	0
Sinaloa	9	9	9	4	9	0	9	1
Sonora	4	4	4	4	4	0	4	0
Tlaxcala	12	12	12	10	12	0	12	0
Veracruz	7	7	7	5	7	0	7	0
Total	91	89	89	71	89	0	89	5

*Muestras que mostraron coinfección de *C. pecorum* y *C. abortus*

Genotipificación de aislamientos positivos a *C. abortus*

Se realizó el esquema MLST a muestras positivas a la PCR-tr específico de *C. abortus*, para lo cual se seleccionó una muestra positiva por rebaño (cuadro 10). Se llevaron a cabo las PCR para la amplificación de fragmentos de cada uno de los siete genes que conforman el esquema, siguiendo las condiciones ya descritas. Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (figura 9).

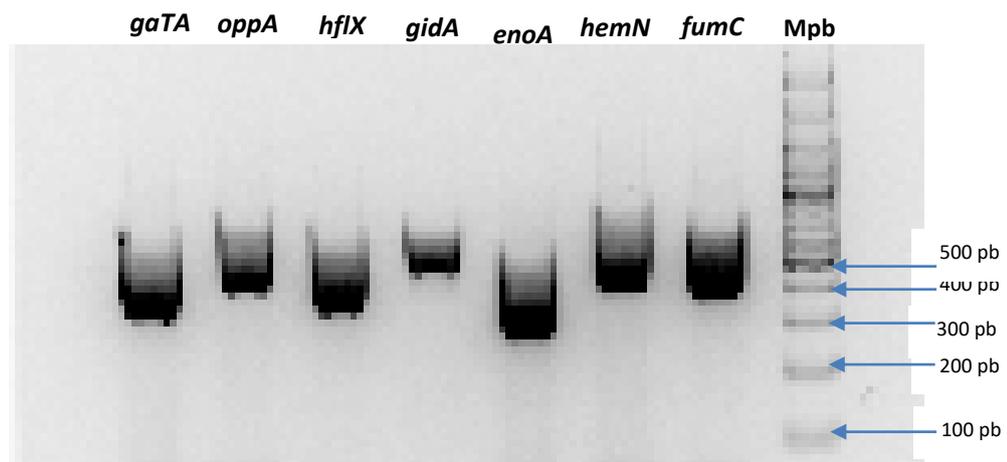


Figura 9. Amplificación de los genes que conforman el esquema MLST de la muestra 126. Mpb: marcador de pares de bases, genes amplificados: *gatA*, *oppA*, *hflX*, *gidA*, *enoA*, *hemN*, y *fumC*.

Las secuencias obtenidas se visualizaron, editaron y alinearon usando el programa BioEdit y Clustal omega. Los números para identificar a los alelos y las secuencias tipo (ST) se asignaron de acuerdo con la base de datos MLST de *Chlamydiales*, usando la página electrónica *Sequence query-Chlamydiales locus/sequence definitions* de PubMLST.

De las 14 muestras seleccionadas, ocho corresponden a cabras y seis a borregas. A partir de diez de las 14 muestras seleccionadas se pudo asignar un alelo para cada uno de los siete genes analizados, lo cual indica que estas muestras pertenecen a la ST 19, revelando que las poblaciones circulantes de *C. abortus* en el país, muestran una alta homología genética. Mientras que de las 4 muestras restantes, aunque comparten el mismo alelo en por lo menos cuatro de los siete genes, correspondiente a la ST 19, la secuenciación de los genes *gidA*, *enoA* y *fumC* no se logró realizar en todos los casos (cuadro 12).

De las muestras de las vacas positivas a *C. abortus*, no se logró amplificar ningún producto mediante esta PCR, debido a la poca concentración de la bacteria evidenciada mediante la PCR-tr de *C. abortus*.

Cuadro 12. Muestras seleccionadas para la realización de MLST y resultados de secuencias tipo

Número	Estado	Especie animal	<i>enoA</i>	<i>fumC</i>	<i>gatA</i>	<i>gidA</i>	<i>hemN</i>	<i>hflX</i>	<i>oppA</i>	ST
1	Aguascalientes	Borrega	8	5	5	*	4	6	8	19
2	Estado de México Zumpango			5	5		4	6	8	
3	Estado de México Tejupilco		8	5	5	8	4	6	8	19
4	Hidalgo		*	5	5	8	4	6	8	19
5	Puebla		8	5	5	8	4	6	8	19
6	Querétaro		8	5	5	8	4	6	8	19
7	Baja California Sur		8	5	5	8	4	6	8	19
8	Ciudad de México		8	5	5	8	4	6	8	19
9	Guanajuato		8	5	5	8	4	6	8	19
10	Morelos				5		4	6	8	
11	Querétaro		8	5	5	8	4	6	8	19
12	Sinaloa				5		4	6	8	
13	Tlaxcala				5		4	6	8	
14	Veracruz		8	5	5	8	4	6	8	19

Genotipificación de aislamientos positivos a *C. pecorum*

Se realizó la amplificación y posterior secuenciación de la subunidad 16S ARNr y *ompA* a muestras positivas a *C. pecorum* siguiendo las condiciones ya descritas, se seleccionaron las muestras del rebaño ubicado en el municipio de Coatepec de las harinas del Estado de México (cuadro 7). Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 1% (figura 10 y 11).

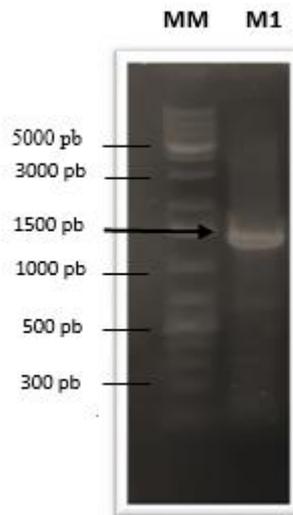


Figura 10. Amplificación de la subunidad 16S ARNr. Mpb: marcador de pares de bases, M1: muestra positiva a *C. pecorum*.

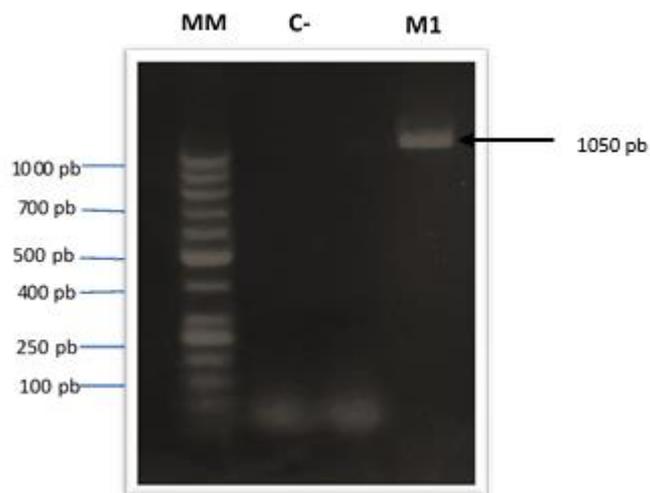


Figura 11. Amplificación del gen *ompA*. Mpb: marcador de pares de bases, C-: control negativo, M1: muestra positiva a *C. pecorum*.

Las secuencias fueron editadas en el programa BioEdit y se generó una secuencia consenso, posteriormente fueron sometidas a la base de datos del GenBank del NCBI, utilizando el programa BLASTn para determinar similitud.

Un 100% de identidad fue observada en las ocho muestras secuenciadas con ambos marcadores, para lo cual una muestra representativa fue registrada en el GenBank con los números de acceso MT453711 (subunidad 16S ARNr) y MT462980 (gen *ompA*).

El análisis BLAST de las secuencias mostro un alto porcentaje de similitud con *C. pecorum*; 100% (1307/1307) de identidad con la subunidad 16S ARNr (NR102975 y CP002608) correspondientes a la cepa E58 aislada de cerebro de un ternero con encefalomiелitis bovina esporádica, USA (Mojica y col.2011) y 99% (1081/1089) con el gen *ompA* (EU684924) correspondiente a la cepa iB1 aislada de heces de borrego asintomático de Francia (Sait y col.2014). En cuanto a los árboles filogenéticos, para la subunidad 16S ARNr se observó un clado altamente apoyado con *C. pecorum* con 1.00 de probabilidad posterior (figura 12), el gen *ompA* tuvo 1.00 de probabilidad posterior con la misma especie; adicionalmente se observó uno asociado al genotipo “O” (figura 13).

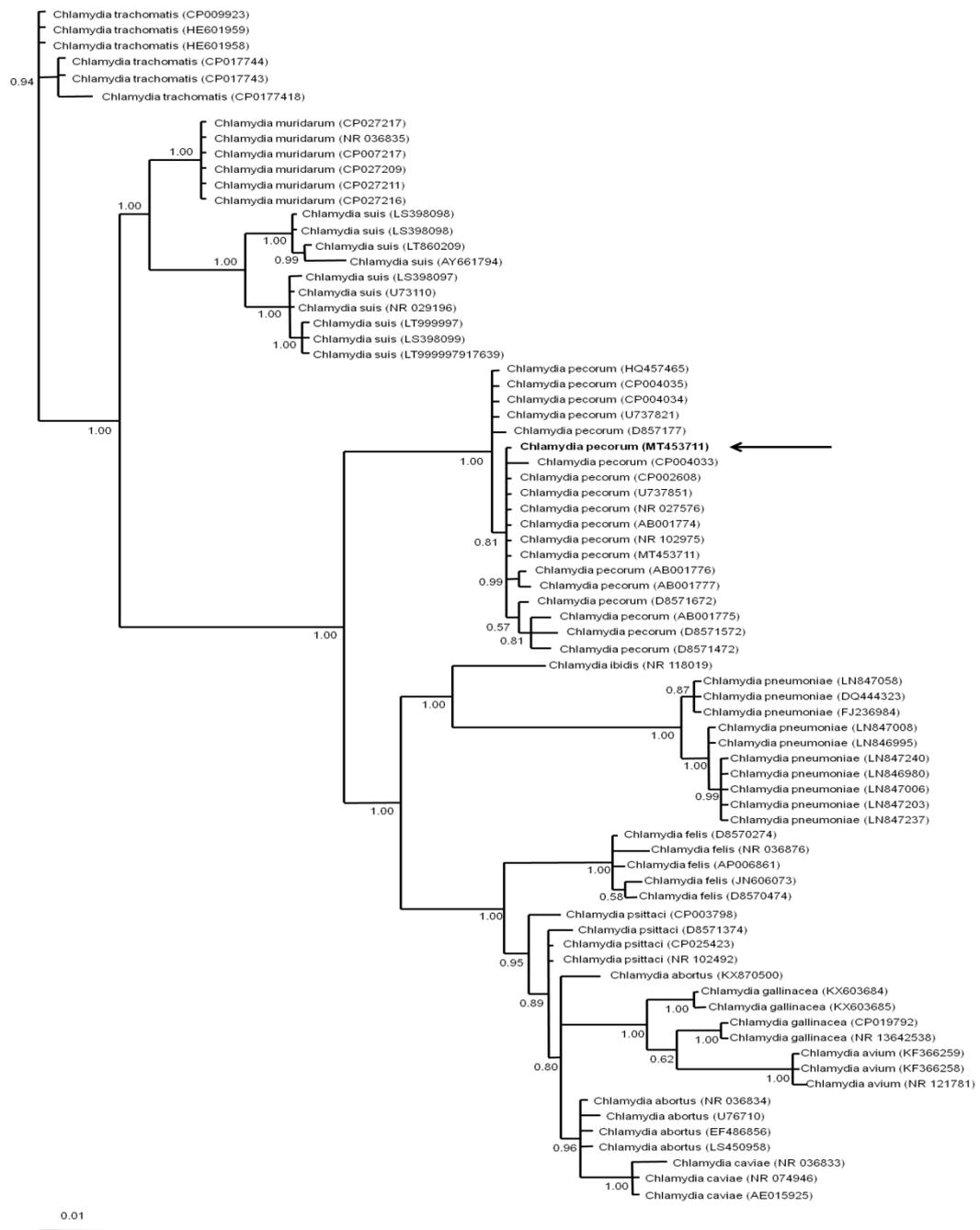


Figura 12. Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana usando las secuencias ARNr 16S de diferentes especies de *Chlamydia*. El número junto a los nodos indica la probabilidad posterior para el análisis bayesiano.

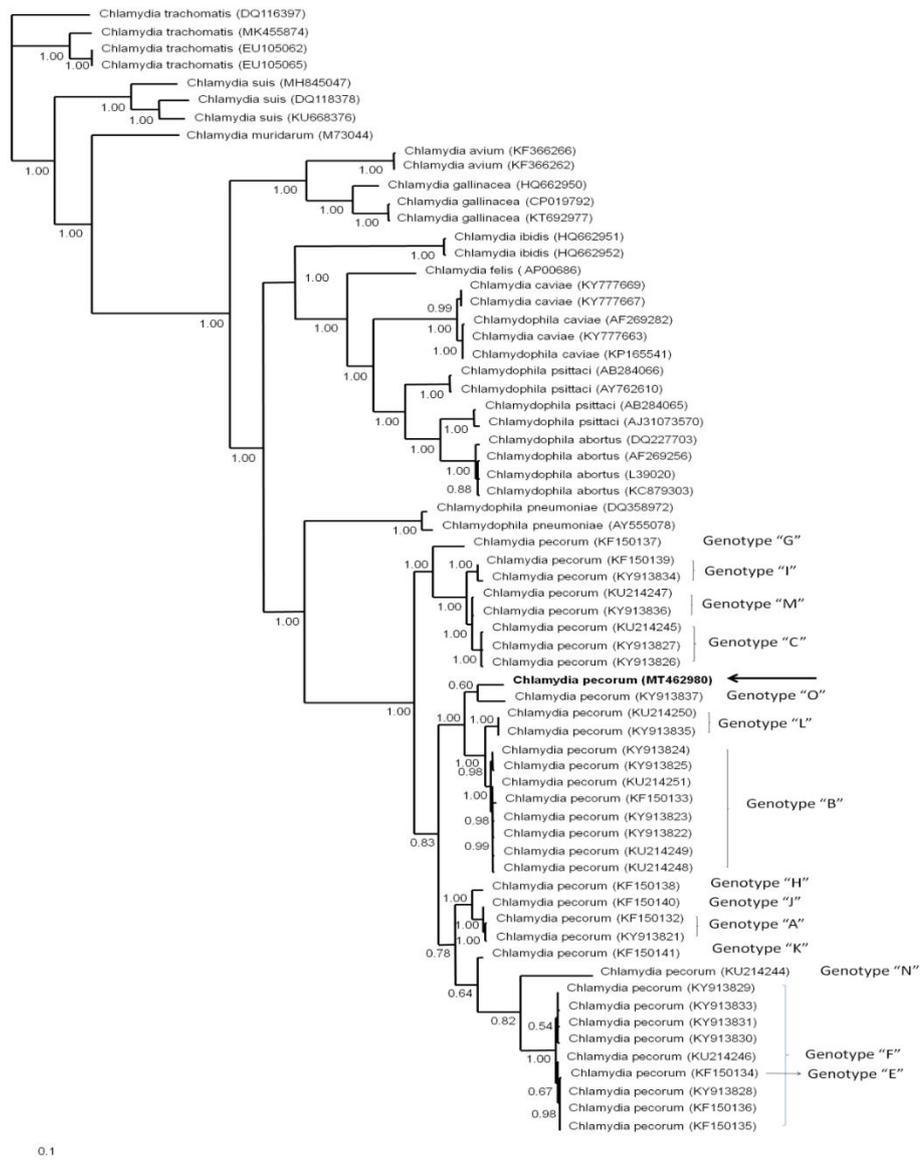


Figura 13. Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana usando las secuencias *ompA* de diferentes especies de *Chlamydia*. El número junto a los nodos indica la probabilidad posterior para el análisis bayesiano.

Para determinar y asociar las secuencias presentes en México con los diversos haplotipos presentes en el mundo, se realizó un árbol de redes de haplotipos (figura 14), y para determinar la estructura poblacional se realizó un análisis de STRUCTUR (figura 15). En el árbol de redes, observamos una alta asociación de las secuencias obtenidas en el presente estudio a partir de las borregas que presentaron abortos con el genotipo "O" obtenido de secuencias de ovejas sanas de Francia, adicionalmente en este árbol también podemos observar la fuente de aislamiento, el genotipo y el país de origen de las cepas de todas las secuencias de *C. pecorum* reportadas en el GenBank.

Los análisis de la estructura de la población realizados en el software STRUCTURE, mostraron quince poblaciones genéticas o clusters dependientes de valores Delta K (figura 15). Los genotipos "C" y "F" fueron los más frecuentes 17,67 % (35/198) y 19,2 % (39/198) respectivamente. Nuestras secuencias se observan en una estructura genética particular correspondiente al genotipo "O" donde las muestras EU684924-5 y KY913837 también están incluidas, esta última aislada a partir de koala en Australia. Finalmente, se observaron algunas muestras con más de un color en los análisis de estructura en las diferentes secuencias analizadas, sugiriendo una posible hibridación (figura 15).

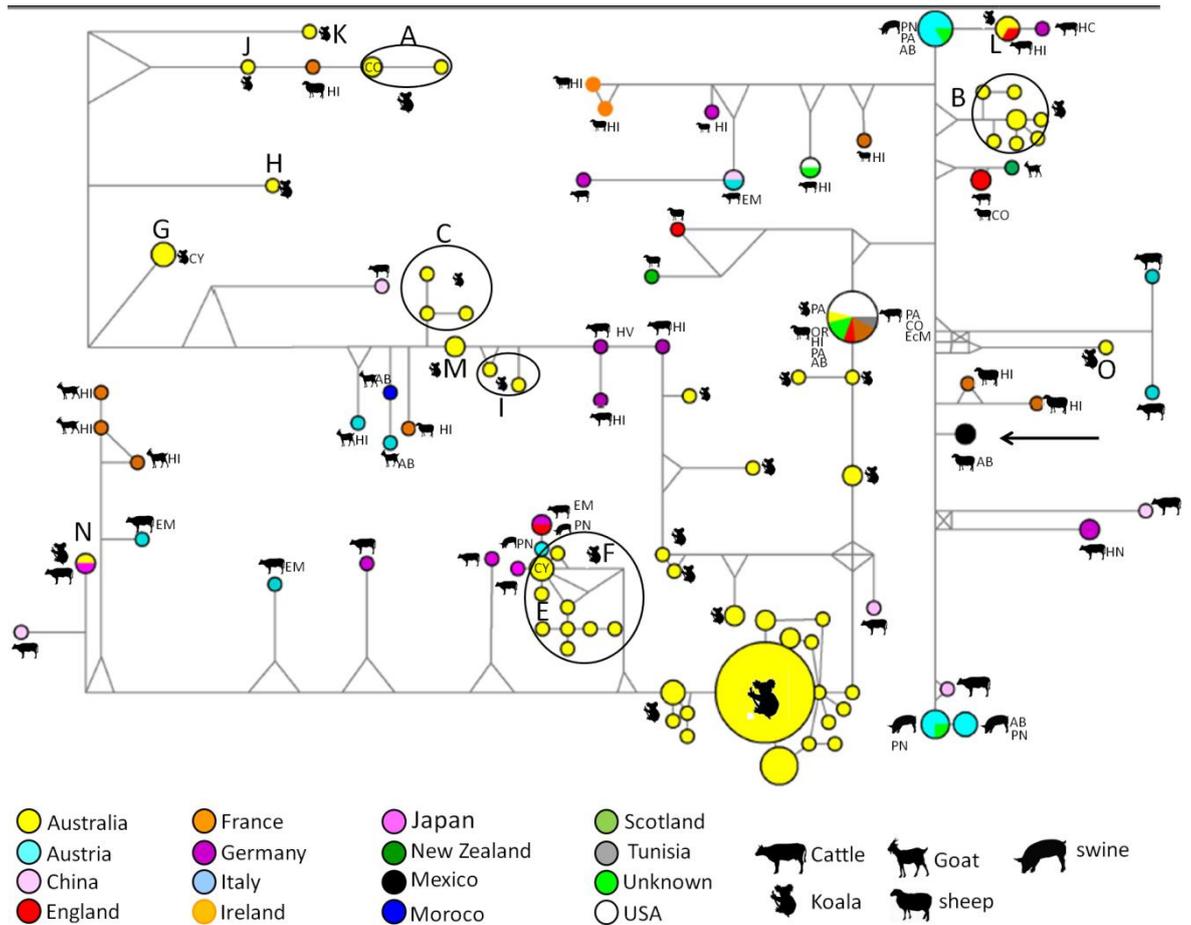


Figura 14. Redes de haplotipos de diferentes secuencias de *Chlamydia pecorum*. El color de los círculos indica la población geográfica de *Chlamydia pecorum* analizada = Círculos blancos = datos faltantes. Aborto = AB, Cistitis = CY, Conjuntivitis = CO, Encefalomielitis = ECM, Endometritis = EM, Conjuntiva sana = HC, Intestino sano = HI, Vagina sana = HV, Orquitis = OR, Poliartritis = PO y Neumonía = NP. La flecha negra indica las secuencias obtenidas en el presente estudio.

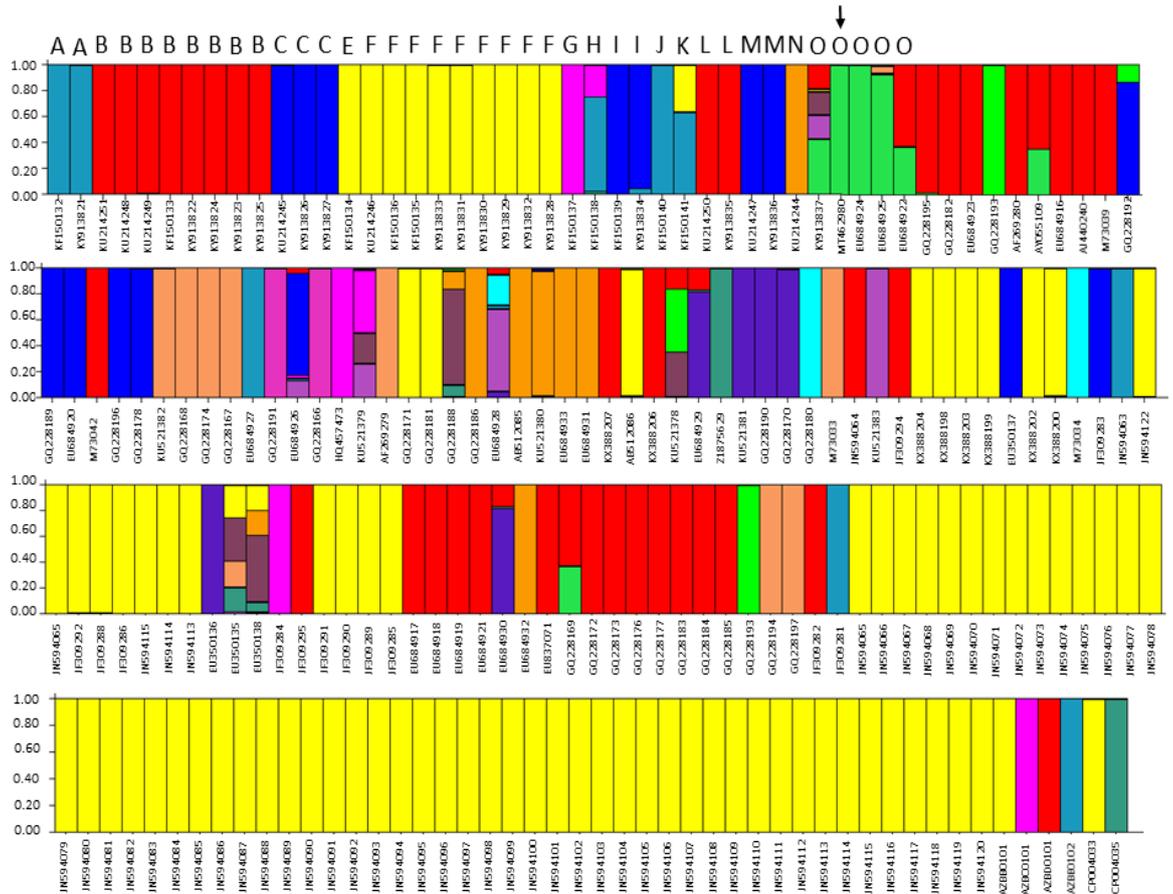


Figura 15. Distribución de quince grupos genéticos (indicados por colores) de la población de *Chlamydia pecorum*, según la simulación de MCMC bayesiana. Cada secuencia de *C. pecorum* está representada por una delgada línea vertical dividida en segmentos coloreados que indican uno de los grupos genéticos K=15. La flecha negra indica las secuencias obtenidas en el presente estudio.

7. Discusión y conclusiones

En este estudio se detectó a la bacteria *Chlamydia* en el 25.2 % de las hembras que presentaron aborto, tanto por aislamiento en cultivo celular como mediante la PCR-tr. En todos los rebaños a excepción de un rebaño de ovinos de Chiapas y uno de bovinos de Guanajuato, se encontró por lo menos un animal positivo (cuadros 5, 6 y 7), el cual sera portador y diseminara a la bacteria de manera permanente durante subsecuentes estros y gestaciones (Longbottom y Coulter, 2003). Es importante destacar que se encontraron borregas positivas a clamidiasis, en algunos de los principales Estados productores de borregos del país, como son el Estado de Mexico con una producción de 9, 289 toneladas, Hidalgo con 6, 776 toneladas y Puebla con 4, 401 toneladas) (Pospischil, 2006; SIAP. 2020), lo cual enfatiza la importancia de la realización de estudios que demuestren la presencia de la clamidiasis, ya que según lo reportado por Longbottom y Coulter (2003), esta enfermedad repercute en pérdidas económicas en la industria ovina, siendo la causa más importante de pérdida de corderos en algunas regiones de Europa, América del Norte y África

En México, los estudios realizados anteriormente no tenían como objetivo la identificación de otras especies de *Chlamydia*, enfocando su investigación solo a *C. abortus*, por ser la principal especie relacionada con abortos en pequeños rumiantes; en este trabajo se analizaron además otras especies de *Chlamydia* de las que existen reportes (Rodolakis y col. 1998; Aitken y Longbottom 2007; Berri y col.2009; Rodolakis y col. 2015) de estar involucradas en la presencia de aborto en rumiantes, encontrando a *C. pecorum* en el 13.4 % de las muestras analizadas.

Del total de muestras positivas tanto para aislamiento como para la PCR-tr 23S ARNr de familia, el 70 % pertenecían a la especie *C. abortus*. En reportes realizados con anterioridad en el año 2015, se encontró mediante PCR a la bacteria *C. abortus* a partir de muestras de cabras con aborto en seis hatos del Estado de Guanajuato (Mora y col.2015); mientras que, Sánchez en 2014, identifico mediante aislamiento, PCR y secuenciación a *C. abortus* en los Estados de Coahuila, Veracruz, Jalisco y Querétaro. Con respecto a borregas (Jiménez-Estrada y col. 2008; Soriano Vargas y col. 2011) han reportado la presencia de *C. abortus* en hembras que presentaron aborto en el Estado de Mexico; en este mismo lugar se habían encontrado animales seropositivos a *C. abortus*,

en un estudio serológico realizado por Palomares y col. (2020), donde además se encontraron animales seropositivos en Querétaro e Hidalgo, muestras de ambos Estados también fueron positivas en nuestro estudio. Sin embargo, aunque existían estos reportes sobre la presencia de *Chlamydia* en borregos del país; en cada estudio se involucraron diversos elementos, como son criterios de inclusión y métodos de diagnóstico utilizados, lo que complica la comparación de los estudios entre sí; pero, en conjunto demuestran la distribución e importancia de esta bacteria en México.

Aunque en general no existe disponibilidad de datos de la propagación y la distribución de las infecciones por *Chlamydia* spp. en el ganado bovino, en algunos países donde se han realizado estudios, se han encontrado altas tasas de seroprevalencia, lo que ha permitido suponer que la clamidiosis bovina es casi omnipresente, lo cual ha sido respaldado por altas tasas de detección de la bacteria mediante PCR en vacas, como fueron los resultados mostrados en investigaciones previas (DeGraves y col. 2003; Jee y col. 2004; Longbottom, 2004; Reinhold y col. 2008).

En un estudio serológico utilizando la técnica de ELISA, sobre clamidiosis bovina en México, se analizaron hatos bovinos lecheros con antecedentes de aborto de ocho Estados de la República Mexicana, encontrándose una frecuencia de animales positivos a *C. abortus* de 10.27 % en animales con problemas reproductivos, los resultados de este trabajo muestran un porcentaje de animales positivos a *C. abortus* mayor (25.40 %). En el Estado de Guanajuato se reportó un 7.8 % (17/216) de animales que presentaron aborto seropositivos, mientras que en este estudio no se encontró ningún animal positivo en este Estado mediante aislamiento (Limón, 2012).

Hasta la fecha, la cría de búfalos de agua en México es incipiente y limitada; el Departamento de Agricultura y Ganadería reconoció al búfalo de agua como una especie doméstica para la producción de alimentos hasta 2018. Por lo tanto, aún no se ha incluido en ninguna campaña de salud. La mayoría de las manadas de búfalos de agua comparten potreros e instalaciones con otros bovinos, lo que los hace vulnerables a infecciones provenientes de otros bóvidos y viceversa. Estas infecciones también representan un peligro potencial para la salud pública (Aguilar-Domínguez y col. 2018).

Se ha reportado que las infecciones por *C. psittaci* y *C. abortus* provocan abortos en búfalos de agua (Greco y col. 2007; Roncoroni y col. 2007; Osman y col. 2012). Se han detectado coinfecciones por *C. abortus* y *C. pecorum* mediante PCR anidada en

muestras de frotis vaginales tomadas de búfalos que presentaron abortos, así como en fetos abortados, que estaban en una manada de búfalos con una tasa de aborto del 36.8 % (Greco y col. 2008). Esto difiere de los resultados obtenidos en este estudio en los que los búfalos de agua detectados con una coinfección por *C. abortus* y *C. pecorum* no presentaron trastornos reproductivos ni abortos.

En un estudio comparativo que consideró búfalos de agua y vacas con y sin trastornos reproductivos, incluido el aborto, *C. psittaci* y *C. abortus* fueron aislados e identificados por RFLP-PCR en aproximadamente 72% de los animales (Osman y col. 2012), sin embargo en este trabajo no se encontraron muestras positivas a *C. psittaci*.

Infecciones mixtas de *Chlamydia* spp. se han notificado en rumiantes. Por ejemplo, en un estudio de rebaños de borregas en Alemania, se detectaron infecciones simultáneas de *C. abortus*, *C. pecorum* y *C. psittaci* en rebaños con menos del 1 % de abortos (Lenzko y col. 2011). También se han reportado infecciones mixtas en hembras con abortos recientes en granjas de borregas y cabras de Argelia, donde se encontró infección simultánea de *C. abortus* y *C. pecorum* en las muestras de exudados vaginales de tres animales (Merdiá y col. 2015). De manera similar, *C. psittaci* y *C. abortus* se han aislado simultáneamente en exudados vaginales de borregas y cabras (Berri y col. 2009). En cerdos se han encontrado infecciones mixtas de *C. abortus* y *C. suis*; de *C. abortus* y *C. psittaci*; así como también de *C. suis* y *C. pecorum* (Pantchev y col. 2010). Esto es similar a los hallazgos encontrados en este trabajo, en los cuales reportamos coinfecciones de *C. abortus* y *C. pecorum* en búfalos de agua y cabras en los estados de Chiapas y Baja California Sur.

Con respecto a la caracterización de *C. abortus*, estudios que utilizan diferentes fenotipos y enfoques moleculares, como son, la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales, los patrones de restricción del gen *ompA* y el análisis filogenético de los genes ARNr, han sugerido que la heterogeneidad genética entre cepas de *C. abortus* es baja, mostrando poca o nula evidencia de diversidad genética con respecto al hospedero, la enfermedad asociada o el origen geográfico de las cepas (Denamur y col. 1991; Everett y col. 1999; Vretou y col. 2007; Siarkou y col. 2015); sin embargo, el esquema MLST basado en el análisis de secuencias de una serie de genes conservados, ha permitido la comparación entre cepas de *C. abortus*, estableciéndose distintos genotipos (ST) relacionados con el hospedero, enfermedad y fuentes de origen de dichas cepas

(Vázquez y Sonsoles, 2004; Pannekoek y col. 2010). Según los datos publicados hasta el momento, se reconocen seis ST diferentes de *C. abortus* ST19, ST25, ST29, ST30, ST86 y ST 87 (Pannekoek y col. 2010; Siarkou y col. 2015). En el presente estudio, el esquema MLST se utilizó para evaluar diferentes cepas de campo de *C. abortus* procedentes de pequeños rumiantes que presentaron aborto en el país, para lo cual se seleccionó una muestra positiva a *C. abortus* por estado. Las muestras seleccionadas positivas a *C. abortus* mostraron un perfil alélico MLST correspondiente a la ST19, lo cual revela que las poblaciones circulantes de *C. abortus* en el país, muestran una alta homología genética. Además, corroboran la especificidad geográfica en la distribución de *C. abortus* reportada por Siarkou en el año 2015 en Argelia.

El análisis MLST puede además proporcionar información sobre los orígenes de las poblaciones circulantes de *C. abortus* en México; la ST 19 identificada en este estudio se ha reportado previamente en cepas aisladas de ovinos, cabras y vacas que presentaron aborto, teniendo principalmente un origen europeo, en Dinamarca, Grecia, Italia y Reino Unido, y similar a algunas cepas de los EUA (Pannekoek y col. 2010; Siarkou y col. 2015). La presencia de estas cepas de *C. abortus* en México, podrían deberse a las importaciones de ovinos en pie, siendo los principales países Estados Unidos de América, Australia, Nueva Zelanda y Chile, de los cuales se importan a México principalmente ovinos adultos de desecho (De Lucas y Arbiza, 2006; Bobadilla y col. 2017), lo cual podría indicar que la falta de un diagnóstico rutinario previo a la movilización de los animales, ha permitido la introducción de animales portadores del genotipo de *C. abortus* desde estos países a México.

Existen reportes que sugieren que la infección por *C. pecorum* es endémica en el ganado ovino a nivel mundial, particularmente se encuentra en el aparato digestivo. En Australia se ha estimado que *C. pecorum* está presente en aproximadamente el 30 % de los rebaños de ovinos del país (Walker y col. 2015). En EUA, Alemania, Francia, Túnez y Marruecos se ha identificado *C. pecorum* de casos de aborto en borregos y cabras (Berri y col. 2009; Lenzko y col. 2011; Giannitti y col. 2016; Walker y col. 2015). En este trabajo se encontró que del total de muestras positivas a *Chlamydia* spp., el 7.9 % pertenecían a la especie *C. pecorum*, datos que coinciden con los mencionados anteriormente donde ha sido posible detectar a *C. pecorum* a partir de casos de abortos en pequeños rumiantes. En un estudio reportado en Argelia, donde también se

comprobó la presencia de *C. pecorum* en muestras de hisopos vaginales de pequeños rumiantes que presentaron o no aborto, destacando que identificaron *C. pecorum* en un menor porcentaje (20 %) con respecto a *C. abortus* (43.3 %) (Merdja y col. 2004), datos similares a los descritos en este estudio.

Aún se desconoce si los abortos donde se ha logrado detectar *C. pecorum* es causado solamente por esta bacteria o se debe a un desarrollo de su patogenia mediado por la coinfección con *C. abortus*; los resultados de este estudio mostraron dos cabras con coinfección entre estas especies de *Chlamydia*, datos similares habían sido reportados con anterioridad por Merdja y col. (2004) en muestras de pequeños rumiantes con problemas de abortos y en búfalos de agua por Barati y col. (2017). Aun así, existen otros factores relacionados a la presentación del aborto en animales positivos a *C. pecorum*, como son coinfecciones con otras especies bacterianas, falta de nutrientes, invasiones parasitarias, deficiente higiene ambiental (Kemmerling y col. 2009, Walker, 2015, Barati y col. 2017) y la introducción de animales de reemplazo portadores de la bacteria que bajo condiciones de estrés pueden desarrollar enfermedades clínicas como podría ser el aborto (Shewen, 1980; Giannitti y col. 2016). condiciones que se presentan con frecuencia en los rebaños muestreados en este estudio (Hernandez, 2000; Martínez-Partida y col. 2011; Pugh, 2002).

Es necesario abordar el caso de los abortos que se presentaron un número considerable de borregas de Nueva Zelanda que fueron importadas a nuestro país a municipios del Estado de Mexico, se debe considerar que sufrieron serias condiciones de estrés, relacionadas con el transporte, el alojamiento y la nutrición, desde su salida de Nueva Zelanda hasta su llegada a los diferentes rebaños del Estado de Mexico. Esta introducción de animales podría ser una de las causas de la identificación de *C. pecorum* solo en los rebaños ovinos del municipio de Coatepec de las harinas del Estado de México que recibieron a borregas gestantes procedentes de Nueva Zelanda. Sin embargo, esta posible asociación entre el hallazgo de esta bacteria, en borregas procedentes de este país, no es posible de confirmarse, al no existir datos o estudios previos en Mexico sobre la presencia de *C. pecorum* sumado a que, aunque existen reportes de la presencia de *C. pecorum* en rumiantes de Nueva Zelanda (Mackereth y col. 2002; Bingham y col. 2012; Hunt y col. 2016), no hay secuencias disponibles

derivadas de estos estudios que permitan la comparación con nuestras secuencias obtenidas.

En la reconstrucción filogenética y el análisis de la secuencia de la subunidad 16S ARNr (MT453711) obtenida a partir de estas muestras positivas a *C. pecorum* de ovinos del Estado de México, se observaron identidades genéticas superiores al 99% y valores de probabilidad posterior altos, formando el mismo clado con la cepa PV3056 / 3 aislada de un hisopo cervical de un bovino con metritis (Sait y col. 2014), cepa E58 (Mohamad y col. 2008; Mojica y col. 2011), cepas B0-1485, B0-Yokohama y B0-Maeda, aisladas en Japón de ganado con neumonía, con muestras de Nueva Zelanda con signos nerviosos, cepa Bo / Shizuoka aislada en Japón de bovinos con encefalomiелitis (Pudjiatmoko y col. 1997; Takahashi y col. 1997), y también con las cepas SPV789 y la cepa iB1 aislada de borregas sin enfermedad aparente (Takahashi y col. 1997; Mohamad y col. 2008), que muestra una alta heterogeneidad de *C. pecorum* como patógeno. Con lo cual se puede observar que las cepas con las que se encontró homología no han sido identificadas en casos de abortos en borregas, como mencionamos anteriormente, aún existe poco conocimiento sobre el verdadero papel que juega *C. pecorum* como causante de abortos y su relación con otros factores. *C. pecorum* ha sido comúnmente detectada en el tracto digestivo y genital de rumiantes sanos (Giannitti y col. 2016); además se ha mencionado que cepas de *C. pecorum* pueden propagarse desde el intestino a través de la circulación sanguínea y llegar a la placenta, donde provocan el aborto debido a situaciones fisiopatológicas no identificadas aun (Berri y col. 2009; Giannitti y col. 2016).

Diferentes estudios han intentado vincular características genéticas, manifestaciones clínicas y clasificación serológica utilizando varios genes, incluido el gen *ompA*. El gen *ompA* es uno de los genes conservados más polimórficos dentro del género *Chlamydia* y se utiliza con frecuencia como sustituto para aproximar la evolución general de los genomas de *Chlamydia*, proponiendo clasificar las cepas de *C. pecorum* en baja y alta virulencia (Mohamad y col. 2014).

Para determinar la relación genética de la secuencia del gen *ompA* (MT462980) de las muestras procedentes de ovinos positivas a *C. pecorum*, se construyó un árbol filogenético con las secuencias de los diversos genotipos existentes de *C. pecorum* disponibles en GenBank. El análisis indica que la secuencia MT462980 forma parte de

un grupo que incluye los genotipos B, L y O de *C. pecorum*, estando más relacionado con el genotipo O, representado por la secuencia KY913837. Las similitudes entre las cepas de *C. pecorum* aisladas de rumiantes con cepas de Koala, borregas (iB3, iB4) y cabras (M14) en Europa se agruparon junto con nuestras cepas de *C. pecorum* (Kaltenboeck y col. 2009; Kollipara y col. 2013).

Para contribuir a la clasificación y asociación de *C. pecorum* con características genéticas y clínicas, se realizó un árbol de redes de haplotipos y análisis de la estructura de la población (figura 14 y 15). Nuestras muestras se ubicaron en el genotipo “O” junto con muestras de borregas y vacas sanas de Francia y Alemania, respectivamente. En este árbol, se observó una distribución heterogénea de animales sanos y enfermos y, curiosamente, se observaron afecciones graves en los cerdos independientemente de su distribución geográfica. También se observó una alta distribución de haplotipos australianos en el mundo; siendo el genotipo “F” uno de los más frecuentes.

Los análisis de estructura de la población mostraron 15 poblaciones o grupos genéticos (figura 15). Los genotipos “C” y “F” fueron los más frecuentes (17,67 % (35/198) y 19,2 % (39/198), respectivamente). Nuestras secuencias se observaron en una estructura genética particular correspondiente al genotipo “O”, donde se incluyeron las muestras EU684924-5 y KY913837. Finalmente, algunas muestras se observaron como “genotipos” aún no descritos (secuencias de un solo color) y otras como híbridos genéticos (secuencias con más de un color), lo que sugiere la necesidad de una evaluación genética de los “genotipos” de *C. pecorum* en el mundo.

Este estudio confirma la presencia de *Chlamydia* spp., en casos de abortos en rumiantes del país.

C. abortus fue la principal especie encontrada en rumiantes del país, mostrando, además, una alta homología entre las poblaciones circulantes de *C. abortus* en rebaños ovinos y caprinos. La presencia de *C. abortus* representa un riesgo para la población por el potencial zoonótico de la bacteria. Esto resalta la necesidad de adquirir medidas sanitarias preventivas para reducir el riesgo de infección.

También pone en evidencia por primera vez, la presencia de *C. pecorum* aislada a partir de borregas, cabras y búfalas en rebaños de diferentes Estados de México.

Este estudio aporta información de las especies y de la diversidad genética de los aislamientos de *Chlamydia* spp. presentes en el país, con lo cual se podrán establecer

medidas de control y prevención contra la infección, encaminadas en la futura aplicación de vacunas y la implementación de las pruebas diagnósticas usadas en este estudio para la identificación de la bacteria.

8. Referencias

1. Aguilar-Domínguez M, Romero-Salas D, Sánchez-Montes S, Barradas-Piña F, Rosas-Saito G, Cruz-Romero A, Ibarra-Priego N, Becker I, Lohmeyer KH, Pérez de León A. (2018). Occurrence of *Amblyomma mixtum* on the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Mexico. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 23;7(3):405-408. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.005>
2. Aitken ID, Longbottom D. (2007). Chlamydial abortion. In: Aitken ID, editor. *Diseases of sheep* 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing 05-112.
3. Ann-Charlotte Karlsson, Alenius S, Björkman C, Persson Y, Englund S. (2010). Investigation of *Chlamydiaceae* in semen and cauda epididymitis and seroprevalence of *Chlamydomphila abortus* in breeding bulls. *Act Vet Scand* 52:2. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-2>
4. Barati S, Moori-Bakhtiari N, Najafabadi MG, Momtaz H, Shokuhizadeh L. (2017). The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion. *Iran J Microbiol* 9(5):288-294.
5. Berri M, Rekiki A, Boumedine KS, Rodolakis A. (2009). Simultaneous differential detection of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol* 9:130. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-130>
6. Biesenkamp-Uhe C, Yihang Li, Hehnen H, Sachse K, Kaltenboeck B. (2007). Therapeutic *Chlamydomphila abortus* and *C. pecorum* Vaccination Transiently Reduces Bovine Mastitis Associated with *Chlamydomphila* Infection. *Infect Immun* 75(2): 870-877. <https://doi.org/10.1128/IAI.00691-06>
7. Bingham P. (2012). Quarterly report of investigations of suspected exotic diseases Jan–March. *Surveillance Publishing Australasian e-Library of Veterinary and Animal Science* 39(2):27–31. <http://www.sciquest.org.nz/node/77409>
8. Bobadilla-Soto, Encarnación Ernesto, Flores-Padilla, Juan Pablo, Perea-Peña, Mauricio. (2017). Comercio exterior del sector ovino mexicano antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte. *Economía y Sociedad XXI* (37):35-49. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=51054506003>
9. Borel N, Thoma R, Spaeni P, Weilenmann R, Teankum K, Brugnera E, Zimmermann DR, Vaughan L, Pospischil A. (2006). *Chlamydia*-related abortions in

Cattle from Graubünden, Switzerland. *Vet Pathol* 43(5): 702-708. <https://doi.org/10.1354/vp.43-5-702>

10. Borel N, Greub G. International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) Subcommittee on the taxonomy of Chlamydiae, minutes of the closed meeting, 10 September 2020, via Zoom. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021 Feb;71(2). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004620>

11. Bush R, Everett K. (2001): Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Internat J System Evolution Microbiol* 51:203-220. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-203>

12. Campos-Hernández E, Vázquez-Chagoyán JC, Salem AZ, Saltijeral-Oaxaca JA, Escalante-Ochoa C, López-Heydeck SM, de Oca-Jiménez RM. (2014). Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Trop Anim Health Prod* 46(6):919–924. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0585-6>

13. Carcenado E y Cantón R. (2012). Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. España. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

14. Cebrián L, Ferrer E, Barberán M. (2011). Actuación del veterinario ante un problema de aborto. Fecha de consulta: 16/10/15. <http://www.gtvzaragoza.com>

15. Chen H, Wen Y, Li Z. (2019). Clear Victory for Chlamydia: The Subversion of Host Innate Immunity. *Front Microbiol* 3;10:1412. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01412>

16. De Lucas, T.J. y Arbiza, A.S. (2006). Situación y perspectivas de la producción de carne ovina en México. *Bayvet* 21:22-28.

17. De Graves, F.J., D. Gao, H.R. Hehnen, T. Schlapp and B. Kaltenboeck. (2003). Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J Clin Microbiol* 41:1726-1729. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1726-1729.2003>

18. Denamur E, Sayada C, Souriau A, Orfila J, Rodolakis A, Elion J. (1991). Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol* 137(11):2525–2530. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-11-2525>

19. Diario oficial de la federación, DOF. (2018). Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Fecha de consulta 29 de octubre de 2020. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018
20. Dugan D, Rockey D, Jones A. (2004). Andersen Arthur. Tetracycline Resistance in *Chlamydia suis* Mediated by Genomic Islands Inserted into the Chlamydial inv-Like Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10): 3989-3995.
21. Edgar RC. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5):1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
22. Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes* 20:60–63. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
23. Escalante-Ochoa C, Díaz-Aparicio E, Segundo-Zaragoza C, Suárez-Güemes F. (1997). Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: First report. *Rev Latinoam Microbiol* 39(3–4):117–121
24. Essig A and Longbottom D. *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Curr Clin Micro Rpt* 2. 2015; 22–34 (2015). <https://doi.org/10.1007/s40588-015-0014-2>
25. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14(8):2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
26. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of *Parachlamydiae* fam. Nov. and *Simkaniaceae* fam. Nov., each containing one monotype genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus, and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49(2):415–440. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-415>
27. Giannitti F, Anderson M, Miller M, Rowe J, Sverlow K, Vasquez M, Cantón G. (2016). *Chlamydia pecorum*: fetal and placental lesions in sporadic caprine abortion. *J Vet Diagn Invest* 28(2):184-189. <https://doi.org/10.1177/1040638715625729>

28. Godin AC, Björkman C, Englund S, Johansson KE, Niskanen R, Stefan A. (2008). Investigation of *Chlamydophila* spp. in dairy cows with reproductive disorders. *Acta Vet Scand.*, 50 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-39>
29. Greco G, D'Abramo M, Campanile G, Di Palo R, Corrente M, Buonavoglia D. (2007). Reproductive disorders induced by *Chlamydophila* spp. infections in an Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*) herd. *Ital J Anim Sci* 6 (2): 877–880. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.877>
30. Greco G, Corrente M, Buonavoglia D, Campanile G, Di Palo R, Martella V, Bellacicco AL, D'Abramo M, Buonavoglia D. (2008). Epizootic abortion related to infections by *Chlamydophila abortus* and *Chlamydophila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 69, 1061–1069. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.018>
31. Hernández ZJS (2000) La caprinocultura en el marco de la ganadería poblana (México): contribución de la especie caprina y sistemas de producción. *Arch. Zootec.* 49: 341-352. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4199.pdf>
32. Hunt H, Orbell GMB, Buckle KN, Ha HJ, Lawrence KE, Fairley RA, Munday JS. (2016). First report and histological features of *Chlamydia pecorum* encephalitis in calves in New Zealand. *Veterinary Journal* 64(6): 364–368. <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1208781>
33. Ikryannikova LN, Shkarupeta MM, Shitikov EA, Ilina EN, Govorun VM. (2010). Comparative evaluation of new Typing schemes for urogenital *Chlamydia trachomatis* isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:188-196. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00678.x>
34. Jackson M, Giffard P, Timms P. (1997). Outer membrane protein A gene sequencing demonstrates the polyphyletic nature of koala *Chlamydia pecorum* isolates. *Syst Appl Microbiol* 20:187–200. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80065-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80065-3)
35. Jiménez-Estrada JM, Escobedo-Guerra MR, Arteaga-Troncoso G, López-Hurtado M, Haro-Cruz MJ, Montes de Oca Jiménez RMO, Guerra-Infante FM. (2008). Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *Am J Anim Vet Sci* 3:91–95. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2008.91.95>

36. Kalender H, Kilic A, Eroksuz H, Muz A, Kilinc U, Tasdemir B. (2013). Identification of *Chlamydophila abortus* infection in aborting ewes and goats in Eastern Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire* 164(6):295-301.
37. Kaltenboeck B, Heinen E, Schneider R, Wittenbrink MM, Schmeer N. (2009). *OmpA* and antigenic diversity of bovine *Chlamydophila pecorum* strains. *Vet Microbiol* 135(1-2): 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.036>
38. Kauffold J, Henning K, Bachmanna R, Hotzel H, Melzer F. (2007). The prevalence of *Chlamydia* of bulls from six bull studs in Germany. *Animal Reproduction Sci* 102:111–121. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.013>
39. Kemmerling K, Müller U, Mielenz M, Sauerwein H. (2009). *Chlamydophila* species in dairy farms: Polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany. *J Dairy Sci* 92: 4347–4354. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2051>
40. Kollipara A, Polkinghorne A, Wan C, Kanyoka P, Hanger J, Loader J, Callaghan J, Bell A. (2013). Genetic diversity of *Chlamydia pecorum* strains in wild koala locations across Australia and the implications for a recombinant *C. pecorum* major outer membrane protein based vaccine. *Vet Microbiol* 167(3–4):513–522. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.009>
41. Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
42. Laroucau K, Vorimore F, Bertin C, Mohamad KY, Thierry S, Hermann W, Maingourd C, Pourcel C, Longbottom D, Magnino S, Sachse K, Vretou E, Rodolakis A. (2009). Genotyping of *Chlamydophila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Vet Microbiol* 137:335–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.029>
43. Laroucau K, de Crémoux R, Rodolakis A. (2014). Rôle des *chlamydiae* dans les avortements des ruminants. Mots-clés: Avortements infectieux *Chlamydiae* Epidémiologie Ruminants. Bulletin des GTV 2014 - Hors-Série “Numéro spécial Avortements Tome 2: page 23 – 32.
44. Laroucau K, Ortega N, Vorimore F, Aaziz R, Mitura A, Szymańska-Czerwińska M, Cicerol M, Salinas J, Sachse K, Caro MR. (2020). Detection of a novel *Chlamydia* species in captive spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) in southeastern Spain and

proposal of *Candidatus Chlamydia testudinis*. Systematic and applied microbiology 126071 <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126071>

45. Legione AR, Patterson JLS, Whiteley PL, Amery-Gale J, Lynch M, Haynes L, Gilkerson JR, Polkinghorne A, Devlin JM, Sansom FM. (2016). Identification of unusual *Chlamydia pecorum* genotypes in Victorian koalas (*Phascolarctos cinereus*) and clinical variables associated with infection. J Med Microbiol 65(5):420-428. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000241>

46. Lenzko H, Moog U, Henning K, Lederbach R, Diller R, Menge C, Sachse K, Sprague LD. (2011). High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. BMC Vet Res 7:29. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-29>

47. Limon Gonzalez, MM. (2012). Prevalencia de leucosis y clamidofilosis en bovinos lecheros de Aguascalientes y Guanajuato. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de Mexico, México.

48. Longbottom D, Coulter LJ. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol 128(4):217-244. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>

49. Longbottom D. (2004). Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. The Vet Journal 168:9-11. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00106-0](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00106-0)

50. Mackereth G, Stanislawek W. (2002). First isolation of *Chlamydophila pecorum* in New Zealand. Surveillance 29(3): 17-8. Fecha de consulta 7 de enero de 2021. <http://www.sciquest.org.nz/node/47245>

51. Markey B, Bassett B, Sheehy N, Gleeson M, Clements L. (1996). Chlamydial abortion in an Irish sheep flock. Ir Vet J 49:282-286.

52. Marsh J, Kollipara A, Timms P, Polkinghorne A. Novel molecular markers of *Chlamydia pecorum*. genetic diversity in the koala (*Phascolarctos cinereus*) BMC Microbiol 2011; 11:77.

53. Martin WB, Aitken ID. (2002). Enfermedades de la oveja. 2a ed. Zaragoza España. Acribia.

54. Martínez-Partida JA, Jiménez-Sánchez L, Herrera-Haro JG, Valtierra-Pacheco E, Sánchez-López E, López-Reyna MC. (2011). Ganadería ovino - caprina en el marco

del programa de desarrollo rural en Baja California. Universidad y ciencia, 27(3). <https://doi.org/10.19136/era.a27n3.113>

55.Merdja SE, Hamza KH, Aaziz R, Vorimore F, Bertin C, Dahmani A, Bouyoucef A, Laroucau K. (2015). Detection and genotyping of *Chlamydia* species responsible for reproductive disorders in Algerian small ruminants. Trop Anim Health Prod 47:437–443. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0743-x>

56.Mohamad KY, Rekiki A, Myers G, Bavoil P, Rodolakis A. (2008). Identification and characterization of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydomphila pecorum*. Vet Res 39(6). <https://doi.org/10.1051/vetres:2008032>

57.Mohamad KY, Rodolakis A. (2010). Recent advances in the understanding of *Chlamydomphila pecorum* infections, sixteen years after it was named as the fourth species of the *Chlamydiaceae* family. Vet Res 41(3): 27. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009075>

58.Mohamad KY, Kaltenboeck B, Rahman KhS, Magnino S, Sachse K, Rodolakis A. (2014). Host adaptation of *Chlamydia pecorum* towards low virulence evident in co-evolution of the *ompA*, *incA*, and ORF663 loci. Plos one 9(8): e103615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103615>

59.Mojica S, Huot Creasy H, Daugherty S, Read TD, Kim T, Kaltenboeck B, Bavoil P, Myers GS. (2011). Genome sequence of the obligate intracellular animal pathogen *Chlamydia pecorum* E58. J Bacteriol 193(14):3690. <https://doi.org/10.1128/JB.00454-11>

60.Mora-Díaz JC, Díaz-Aparicio E, Herrera-López E, Suárez-Güemez F, Escalante-Ochoa C, Jaimes-Villareal S, Arellano-Reynoso B. (2015). Isolation of *Chlamydia abortus* in dairy goat herds and its relation to abortion in Guanajuato, Mexico. Vet Mex OA 2:1

61.Navarro JA, García de la Fuente JN, Sánchez J, Martínez CM, Buendía AJ, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Ferri EF, Ortega N, Salinas J. (2004). Kinetics of Infection and Effects on the Placenta of *Clamydomphila abortus* in Experimentally Infected Pregnant Ewes. Vet Pathol 41: 498. <https://doi.org/10.1354/vp.41-5-498>

62.Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. (2018). Aborto Enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina). Manual de la Organización Internacional de epizootias sobre animales terrestres. Fecha de consulta: noviembre 2020.

https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.07.05_Aborto_enz_oveja_s.pdf

63. Osman KM, Ali HA, ElJakee JA, Galal HM. (2012). *Chlamydiaceae* in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) and cows (*Bos taurus*) in Egypt with and without signs of reproductive disease, NZVJ 60(4):228-233.

<https://doi.org/10.1080/00480169.2012.668123>

64. Palomarers REG, Mejia SP, Aguilar RF, De la Cruz CL, Jimenez SH, Leyva CJC, Morales PMI, Diaz AE. (2020). Frecuencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Chlamydia abortus*, en rebaños ovinos en México. Rev Mex Cienc Pecu 11(3):783-794. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5269>.

65. Pannekoek Y, Morelli G, Kusecek B, Morré S, Ossewaarde J, Langerak A, van der Ende A. (2008). Multi locus sequence typing of Chlamydiales: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*. BMC Microbiol 8:42.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-42>

66. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DSA, Jolley KA, Keijzers WC, Vretou E, Maiden MC, Vanrompay D, van der Ende A. (2010). Multi Locus Sequence Typing of *Chlamydia* Reveals an Association between *Chlamydia psittaci* Genotypes and Host Species. PLoS ONE 5(12): e14179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014179>

67. Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyezka J, Sachse K. (2010). Detection of all *Chlamydomphila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 33(6):473–484.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.08.002>

68. Papp R, Shewen E. (1996). Localization of Chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. JID 174: 1296-1302.

<https://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1296>

69. Petit T, Spersger J, Aurich J, Rosengarten R. (2008). Prevalence of *Chlamydiaceae* and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. Vet Microb 127:325–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.022>

70. Pospischil A. (2006). Enzootic abortion in ewes: a review of recent developments in diagnostics. Small Ruminant Res 62:113-115.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.08.005>

71. Praga A, Montes de Oca J, Fernández R, Valladares C. Low seroprevalence of *Chlamydia abortus* in dairy cows of hot environment in southern of Mexico. Memorias de XXXII Congreso Nacional de Buiatría; 2011 agosto 11-13; León, Guanajuato. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2011.
72. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945–959
73. Pudjiatmoko, Fukushi H, Ochiai Y, Yamaguchi T, Hirai K. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16s rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 47(2):425–431. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-425>
74. Pugh D.G. (2002) *Sheep and Goat Medicine*. W.B. Saunders Company, Elsevier Science.
75. Reinhold P, Konrad Sachse K, Kaltenboeck B. (2011). *Chlamydiaceae* in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J* 189:257–267. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.09.003>
76. Rodolakis A, Salinas J, Papp J. (1998). Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. 677 Res.* 29, 275-288.
77. Rodolakis A. (2001). Recent advances in goat diseases. Chlamydiosis in goats. Tempesta M. (Ed.) *International Veterinary Information Service* Fecha de consulta: 4/01/21. <https://www.ivis.org/library/recent-advances-goat-diseases/caprine-chlamydiosis>
78. Rodolakis A, Mohamad YK. (2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Vet Microb* 140:382–391. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.014>
79. Rodolakis A, Laroucau K. (2015). Chlamydiaceae and chlamydial infections in sheep or goats. *Vet Microbiol* 14;181(1-2):107-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.010>
80. Rojas M, Fort M, Betterman S, Entrocassi C, Costamagna S, Sachse K, Rodriguez M. (2018). Detection of *Chlamydia abortus* in bovine reproductive losses in the province of La Pampa, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 50(3): 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.002>
81. Roncoroni C, Barile VL, Allegrini S, Grifoni G, Pettrossi N, Fagiolo A. (2007). Serological survey and reproductive performances in buffaloes under fixed time

artificial insemination. Ital J Animl Sci 6(2):828–831.
<https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.828>

82. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol 61(3):539–542.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

83. Rota TR, Nichols RL. (1973). *Chlamydia trachomatis* in Cell Culture. I. Comparison of Efficiencies of Infection in Several Chemically Defined Media, at various pH and Temperature Values, and After Exposure to Diethylaminoethyl-Dextran. Appl Microbiol 26(4):560-565.

84. Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehricht R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydophila spp. Mol. Cell. Probes, 19, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.09.005>

85. Sachse k, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiol 135:2–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>

86. Sachse K, Laroucau K, Riegec K, Wehner S, Dilcher M, Huot CH, Weidmann G, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruettger A, Bavoil PM, Hufert FT, Rosselló-Móra R, Marz M. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. Syst Appl Microbiol 37:79–88.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.004>

87. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens RS, Kuo CC, Rosello- Mora R, Horn M. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae* proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. Syst Appl Microbiol 38(2):99-103. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.004>

88. Sait M, Livingstone M, Clark EM, Wheelhouse N, Spalding L, Markey B, Magnino S, Lainson FA, Myers GS, Longbottom D. (2014). Genome sequencing and comparative analysis of three *Chlamydia pecorum* strains associated with different pathogenic outcomes. BMC Genomics 15(1):23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-23>

- 89.Sánchez RL. (2014). Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de Mexico, México.
- 90.Santiago BC. Sánchez RL. (2019). Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de Mexico, México.
- 91.Shewen PE. (1980). Chlamydial infection in animals: a review. *Can Vet J* 21:2–11.
- 92.Siarkou V, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Rodolakis A, Pannekoek Y, Sachse K, Longbottom D, Laroucau K. (2015). Diversification and Distribution of Ruminant *Chlamydia abortus* Clones Assessed by MLST and MLVA. *PloS one* 10(5), e0126433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126433>
- 93.Soriano VE, Jiménez EA, Salgado MC, López M, Marcos C, Escobedo GR, Guerra IF. (2011). Identificación de *Chlamydia abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *REDVET* 12(11):1-6. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622049007>
- 94.Staub E, Marti H, Biondi R, Levi A, Donati M, Leonard C, Ley SD, Pillonel T, Greub G, Seth-Smith HMB, Borel N. (2018). Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature-sensitive and exhibited decreased susceptibility to azithromycin. *Sci Rep* 8:5660. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23897-z>
- 95.Takahashi T, Masuda M, Tsuruno T, Mori Y, Takashima I, Hiramune T, Kikuchi N. (1997). Phylogenetic analyses of *Chlamydia psittaci* strains from birds based on 16S rRNA gene sequence. *J Clin Microbiol* 35(11):2908–2914. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.11.2908-2914.1997>
- 96.Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipisky A, Kumar A. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis versión 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- 97.Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

98. Vílchez G, Alonso G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *RSVM* 29:6-12
99. Vretou E, Radouani F, Psarrou E, Kritikos I, Xylouri E, Mangana O. (2007). Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydia abortus* antibodies. *Vet Microbiol* 123:153–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.023>
100. Walker E, Lee JE, Timms P, Polkinghorne A. (2015). *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: A common and under-recognized infectious disease with significant impact on animal health. *Vet J* 206:252–260. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.022>

9. Anexos

Anexo 1. Aislamiento e identificación de *Chlamydia* spp. por inmunofluorescencia

Materiales de protección personal y desinfección

- Bata
- Guantes desechables estériles
- Cubrebocas
- Etanol 70%
- Hipoclorito de sodio al 2 % diluido con agua corriente
- Papel toalla absorbente
-

Material de laboratorio

- Vaso de precipitado de 30 o 50 ml.
- Gradillas de plástico para tubos cónicos de 15 ml y tubos de microcentrífuga.
- Micropipetas automáticas de 200 μ l y 1000 μ l.
- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml.
- Jeringas desechables estériles de 3 ml, 5 ml y 10 ml.
- Marcador indeleble.
- Botellas desechables estériles para cultivo celular con filtros de 25 cm² o 75 cm².
- Tubos de microcentrífuga de 0.6 ml.
- Portaobjetos tipo “Chamber slide” con una cámara extraíble de poliestireno dividida en 8 pozos adherida a un portaobjetos (Nunc® Lab-tek®, USA).
- Cámara de Neubauer.
- Tubos cónicos de polipropileno (tipo Falcon) estériles de 15 ml y 50 ml.
- Criotubos de 1.5 ml con tapa de rosca.
- Raspadores de células (Scraper) Nunc™ en caso de que no se use tripsina para despegar las células.

Equipo de laboratorio

- Microscopio óptico con objetivos 20x 40x y 100x
- Microscopio de luz invertida con objetivos de 10x, 20x y 40x.

- Incubadora de 37 °C con inyección de CO₂.
- Campana de flujo laminar vertical clase II.
- Refrigerador.
- Congelador a -20 °C.
- Ultracongelador -70 °C.

Material biológico

- Muestras para diagnóstico.
- Control positivo (cepas de referencia).
- Línea celular L929 de fibroblastos de ratón o línea celular Mc Coy.

Medios de cultivo y reactivos

- Medio Eagle modificado Dulbecco (1X) (DMEM) (Invitrogen, EE. UU) 4.5 gramos de glucosa por litro con L-Glutamina, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio.
- Suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, EE. UU.)
- Tripsina-EDTA (0.5%), sin rojo de fenol Gibco™
- Antibióticos: gentamicina 50 mg/ml (Invitrogen, EE. UU.) y vancomicina 50 mg/ml (Invitrogen, EE.UU.).
- Antimicótico: anfotericina B 250 µg/ml (GIBCO, EE. UU.).
- Prueba comercial IMAGEN™ Chlamydia test (Oxoid, UK).
- Medio de transporte SPG para preparar 1L (sacarosa 74.6g, KH₂PO₄ 0.512g y K₂HPO₄ 1.273g).
- Solución Salina de Fosfatos (PBS).
- Metanol absoluto.
-

Procedimiento

Para el aislamiento se utilizan cultivos celulares de fibroblastos de ratón L929, o la línea celular McCoy, los cuales se cultivan en DMEM-C (Medio Mínimo Esencial de Eagle suplementado con 10 % de SFB, 1 % de aminoácidos no esenciales). Se incuba a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO₂.

1. De las botellas de cultivo celular que tengan entre el 80 al 90% confluencia, eliminar el DMEM-C y adicionar con jeringa 1 ml de tripsina e incubar durante cinco minutos, transcurrido ese tiempo sacarlas de la estufa y para desprenderlas darle un ligero

golpe con la palma de la mano en el lado de la botella, donde está asentado el cultivo celular o despegarlas utilizando el scrapper.

2. Preparar en un tubo cónico DMEM-C de acuerdo al número de las muestras a trabajar. Tomando en cuenta que para cada pozo de la placa de Lab-tek® se necesitan 300 µl de DMEM-C. En una placa Lab-tek® es posible trabajar seis muestras, además de dos controles, un positivo y un negativo; por lo tanto, será necesario 2,400 µl de DMEM-C.
3. Realizar el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer.
4. Agregar 300 µl de DMEM-C con células (1.5×10^5 células/ml) en cada división de la placa Lab-tek® e incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas.
5. Trascurrido este tiempo, eliminar el DMEM-C por decantación de cada división de la placa Lab-tek®

Preparación de muestras clínicas para infectar las células

La preparación del inóculo dependerá del tipo de muestra.

- En el caso de muestras de exudado vaginal (tubo cónico de 15 ml que contiene 2 ml de medio de transporte SPG y un hisopo con la muestra), agitarlo, utilizando el vortex para asegurar el desprendimiento del exudado del hisopo vaginal y la disolución en el medio SPG. Con ayuda de una micropipeta colocar 50 µl en cada división de la placa Lab-tek®.
- En el caso de las muestras de órganos, se maceran 5 gramos en 5 ml de medio SPG, con ayuda de la micropipeta, inocular 50 µl de la muestra en cada división de la placa Lab-tek®

Nota: En cada ocasión que se realice el diagnóstico, será necesario colocar en la placa Lab-tek®, controles positivo y negativo, éste último serán las células sin inocular con la muestra.

6. Colocar la placa Lab-tek® dentro de un recipiente de plástico en una incubadora orbital durante 15 minutos a 37°C / 50 rpm. Posteriormente centrifugar las placas Lab-tek® a 353 g durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo incubar la placa Lab-tek® durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂.
7. Durante el tiempo de la incubación de la placa Lab-tek®, preparar nuevamente el DMEM-C (Paso 2), adicionado con antibióticos:

8. En el caso de muestras de órganos, será necesario agregar al DMEM-C con antibióticos (gentamicina 10 µg/ml, vancomicina 10 µg/ml y anfotericina B 10 µg/ml). Para las muestras de hisopo vaginal es posible colocar el DMEM-C sin antibióticos, esto dependerá del grado de contaminación de la muestra, en algunas ocasiones las muestras tienen residuos de heces o sangre, en este caso es necesario colocar antibióticos para evitar la contaminación del cultivo celular.

9. Transcurrido el tiempo de incubación colocar con la micropipeta, 300 µl de DMEM-C adicionado con antibióticos en cada pozo de la placa Lab-tek®.

10. Las placas Lab-tek® se dejan incubando a 37°C con un 5% de CO₂ durante 65-72 horas.

Nota. Después de trabajar con cepas de referencia o muestras sospechosas de Chlamydia spp. es necesario dejar remojando los materiales para desinfectarlos con hipoclorito de sodio al 2 %, antes de lavarlos con agua y jabón. Posteriormente realizar la limpieza y desinfección de las áreas y equipo utilizado con Etanol al 70% usando toallas absorbentes desechables.

Fijación

11. Sacar las placas de la incubación y en un vaso de precipitado estéril eliminar el DMEM-C por decantación.

12. Realizar un lavado con 100 µL por pozo con PBS

13. Despegar los portaobjetos de la placa Lab-tek® usando el dispositivo compuesto de los dos partes (Figura 10, lado derecho) para despegar las divisiones del portaobjetos. Los pozos de la placa Labtek se desechan, previamente colocándolos en hipoclorito de sodio al 5%.

14. Posteriormente fijar los portaobjetos con metanol puro a -20°C en una caja coplin vertical durante 15 minutos.

Inmunofluorescencia directa

15. Se toman los portaobjetos previamente fijados en metanol.

16. Realizar dos lavados en cada pozo, con 100 µl de PBS, dejar secar a temperatura ambiente.

17. En un microtubo de 2 ml hacer una dilución de 20% del reactivo marcado como “Reagent” (anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína) y

80% de PBS (1:5), el volumen final dependerá de las muestras que se trabajarán. Se utilizan 20 µl por cada muestra.

18. En cada división del portaobjetos agregar con la micropipeta, 20 µl de la dilución e incubar durante 15 minutos a 37°C en cámara húmeda. No dejar que el reactivo se seque, ya que esto provocaría la aparición de tinción no específica.

19. Transcurrido este tiempo se realizan dos lavados con 200 µl de PBS, decantar y dejar secar los portaobjetos al aire, a temperatura ambiente.

20. Añadir a cada división del portaobjetos una gota de líquido de montaje proporcionado por el kit, al centro de cada pozo y colocar un cubreobjetos sobre el líquido de montaje y la muestra, asegurándose que no se quede atrapada ninguna burbuja de aire.

21. Sellar todas las orillas de los portaobjetos, con barniz de uñas y dejar secar.

22. Observar los portaobjetos en el microscopio de fluorescencia.

Anexo 2. Propagación de *Chlamydia*

La propagación se realiza en el cultivo celular a muestras que previamente fueron identificadas como positivas a la bacteria en este caso *Chlamydia* spp. con la finalidad de aumentar la cantidad de éstas reproduciendo la infección en las células.

Preparación del inóculo

El inóculo para la infección se prepara en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml estéril, en el que se agregan:

- a. 10 ml de DMEM
- b. 150 µl de Dietil-Amino-Etil-Dextrano (DEAE) en una concentración de 100 µg/ml
- c. 150 µl de la cepa de referencia de *C. abortus*

Procedimiento

1. En un cultivo de células L929 o Mc Coy, de 24 h de crecimiento, con un 80% de confluencia, se elimina mediante decantación o por aspiración con pipeta o jeringa el medio DMEM- C cuidando de no tocar el tapete celular.

2. Con una pipeta serológica añadir 5 ml de inóculo por botella, centrifugar usando el rotor de placas a 353 g durante 30 minutos. Colocando el cuello de la botella hacia afuera.
3. Incubar 15 minutos a 37 °C en agitación constante (50 rpm).
4. Incubar durante una hora y media a 37°C con 5% de CO₂, transcurrido este tiempo decantar el inóculo en un vaso de precipitado.
5. Realizar un lavado con 10 ml de PBS estéril y posteriormente eliminarlo en un vaso de precipitado estéril.
6. Colocar 10 ml de medio DMEM- C nuevo en cada botella e incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante siete días; durante las primeras 48 h, se deberán revisar las botellas para comprobar que las células presentan el 100 % de confluencia, si esto se cumple, se debe detener la división celular, agregando 150 µl de cicloheximida preparada a una concentración de 2 µg/ml, en cada botella. En caso de que a las 48 horas no se llegue a esta confluencia, colocar la cicloheximida cuando se alcance la confluencia del 100% sin exceder los 7 días de incubación.
7. Continuar la incubación hasta completar los siete días a 37 °C con 5% de CO₂.

Nota: Debemos tener presente que, durante este proceso, Chlamydia spp. es viable, por lo que todos los desechos resultantes de los lavados, cambios de medio, etc, deben disponerse en un recipiente con solución de hipoclorito de sodio al 5% o bien en un recipiente autoclaveable y esterilizar posterior a la manipulación.

Purificación de *Chlamydia*

1. Transcurridos los 7 días de incubación de las botellas de cultivo celular con el inóculo de *Chlamydia*, se realiza el desprendimiento del tapete de células infectadas de la botella mediante el proceso de congelación y descongelación. El procedimiento se realiza congelando la botella a -20°C y descongelando a temperatura ambiente, repitiendo el tratamiento hasta observar que se desprende el tapete celular y las células se han roto, para comprobarlo se toma una muestra para hacer un frotis, que será teñido con tinción de Stamp, mismo que deberá observarse al microscopio ocular a 100 X, lo cual permitirá tanto observar si las células se han roto como la presencia de las bacterias.

Nota: Si se cuenta con un sonicador, se podrán desprender las células con tripsina o con un raspador de células, el medio con las células desprendidas se transfiere a un tubo de 50 ml y

posteriormente se sónica en frío, con una amplitud del 80%, 15 s 10 pulsaciones y 15 segundos de descanso. El sonicador debe estar dentro de la campana de flujo para evitar contacto con los aerosoles que se producen.

2. Colectar todo el medio en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml (si queda espuma, agregar DMEM o PBS estéril para recuperarla).
3. Centrifugar durante 10 minutos a 170 Xg (1000 rpm) a 20 °C.
4. Mientras se centrifuga, hay que preparar amidotrizoato de sodio Ioditrast (Dimeyra, México) al 35%: 15.5 ml de Ioditrast® + 32.5 ml de amortiguador TRIS-KCL (Tris (20 mM) 2.12 gr + KCl (0.15 M) 11.2 g cbp 1 litro de H2O destilada, ajustar pH a 7.5 y esterilizar en autoclave) en un volumen total de 50 ml.
5. Colocar 8 ml de Ioditrast® al 35%, en cada tubo de ultracentrífuga.
6. Colocar lentamente el sobrenadante de los tubos centrifugados (Paso 3), en los tubos de ultracentrífuga con Ioditrast® al 35% (depositar lentamente para evitar romper el gradiente y que este se mezcle con la sustancia química).
7. Tomar muestras del sobrenadante y del precipitado, para realizar un frotis**.
8. Ultracentrifugar a 50,000 Xg por 1 hora a 4°C.
9. Retirar el sobrenadante mediante aspiración usando una jeringa de 3ml o con micropipeta de 1 ml.
10. Realizar un lavado a la pastilla resuspendiéndola en 2 ml de tampón TRIS-KCL estéril.
11. Ultracentrifugar a 50,000 Xg por 1 hora, a 4°C
12. Retirar el sobrenadante mediante aspiración usando una jeringa de 3ml o con micropipeta de 1 ml.
13. Resuspender la pastilla en PBS adicionado con sacarosa al 5%, o en el medio SPG.
14. Tomar una muestra de la suspensión para realizar un frotis**.

**Los frotis se tiñen con la técnica de Stamp; también puede hacerse inmunofluorescencia directa. Los frotis se realizan para verificar la presencia de las bacterias durante el procedimiento.