

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Diagnóstico Serológico de *Chlamydophila abortus* en
cabras de la Comarca Lagunera**

POR:

ANA ISABEL FERNÁNDEZ TORRES

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

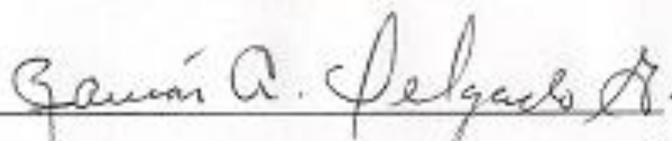
Octubre 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

"Diagnóstico serológico de *Chlamydophila abortus* en cabras de la Comarca Lagunera "

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



MVZ. RODRIGO I. SIMON ALONSO

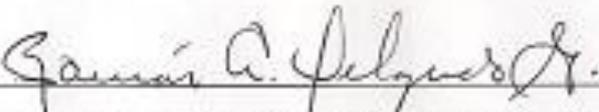


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

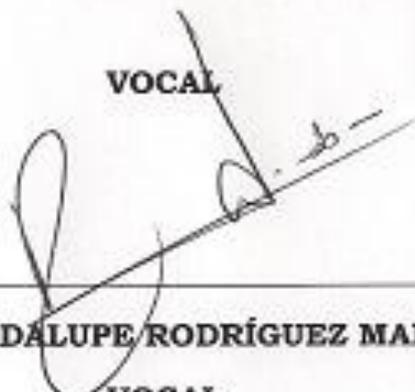
TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

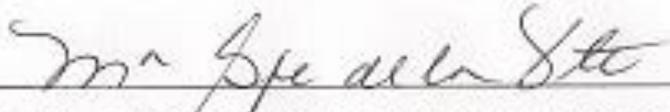
PRESIDENTE:



MC. RAMON ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL


MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL



DR. Ma. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE



MVZ. EZEQUIEL CASTILLO ROMERO

INDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Historia	2
2.2. Estudios de <i>Chlamydomphila abortus</i> en México	3
2.3. Etiología	3
2.4. Patogenia	6
2.5. Transmisión	6
2.6. Signos clínicos	7
2.7. Lesiones	8
2.8. Diagnóstico	8
2.8.1. Pruebas utilizadas para el diagnóstico de <i>C. abortus</i>	9
2.9. Situación sanitaria en México	10
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. HIPÓTESIS	12
V. OBJETIVOS	12
5.1. Objetivo General	12
5.2. Objetivo Especifico	12
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1. Marco de Referencia	13
6.2. Origen y características de las muestras	14
6.3. Toma de muestras	14
6.4. Procesamiento de muestras	14
6.4.1. Procedimiento	15
VII. RESULTADOS	19
7.1. Detección de anticuerpos contra <i>Chlamydomphila abortus</i> mediante ELISA	19
VIII. DISCUSIÓN	21

IX. CONCLUSIÓN Y SUGERENCIAS	22
X. LITERATURA CITADA	23

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Familia <i>Chlamydiaceae</i>	3

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estados donde se ha encontrado <i>C. abortus</i> .	4
Figura 2. Ciclo de Desarrollo	5
Figura 3. Potencial zoonótico de los agentes patógenos de origen animal.	7
Figura 4. Comarca Lagunera conformada por 11 municipios del Estado de Durango y 5 del estado de Coahuila	13
Figura 5. Comarca Lagunera	14
Figura 6. Placa con 96 pocillos en incubación, 1 hora a 37 °C.	15
Figura 7. Lavado de la placa después de la primer incubación	16
Figura 8. Depósito de conjugado	16
Figura 9. Depósito de solución reveladora	17
Figura 10. Muestras positivas color amarillo	17
Figura 11. Lector de ELISA	18
Figura 12. Seroprevalencia por cabra de <i>C. abortus</i> en la Comarca Lagunera	19
Figura 13. Seroprevalencia por rebaño de <i>C. abortus</i> en la Comarca Lagunera	19
Figura 14. Seroprevalencia de <i>C. abortus</i> por municipio en la Comarca Lagunera	20
Figura 15. Seroprevalencia de <i>C. abortus</i> por municipio	20

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios

Por permitirme llegar a esta meta tan importante en mi vida y por haberme dado la fortaleza y sabiduría para poder alcanzar este triunfo.

A mis Padres

Por darme la vida, porque sin ustedes no estaría aquí cumpliendo este proyecto.

A mi Tío Juventino

Por su ayuda y consejos que me ha brindado para salir adelante y sobre todo por depositar su confianza en mí. Tío este momento de mi vida es gracias a su apoyo que sin obligación alguna me dio incondicionalmente sin nada a cambio.

A mi Hermana

Gracias por tu Amor de Hermana, Madre y Mejor Amiga. Por siempre estar a mi lado dándome fuerzas para seguir cumpliendo mis sueños y por siempre tenerme en tus oraciones para que mi camino no sea difícil. Kary este logro no es sólo mío, también es tuyo por aquella promesa que un día hicimos, simplemente lo logramos.

A mi Mejor Amiga Selene

Por tu amistad incondicional, paciencia, ayuda, confianza y por todos los momentos de estudio que disfrutamos y logramos juntas. Gracias por tu cariño, eres más que mi amiga eres mi hermana.

Al patólogo Ramón Alfredo Delgado González

Por sus enseñanzas y apoyo de todo tipo, en clases, necropsias, diagnóstico, Tesis. Y claro también por sus lecciones de vida, consejos, pláticas, reflexiones, etc., que me ayudan a tener confianza en mí misma, crecer y creer que lo que quiero lo puedo lograr.

A Oscar Pérez y Noé García

A ustedes por el tiempo y dedicación que se dieron para realizar el muestreo de las cabras con las cuales fue posible mi trabajo experimental de tesis. Gracias

A mis sinodales y maestros Ezequiel Castillo, Guadalupe Rodríguez y Ma. Guadalupe de la Fuente

A los 3 por ser parte de esto que será historia, ocupando ustedes una parte de ella en este momento que es muy importante. Gracias Medico Ezequiel por adoptarnos como sus hijas y por su cariño que a lo largo de la carrera nos brindo.

Al Dr. Efrén Díaz y a la Dra. Gaby Palomares

Muchas gracias por su paciencia, tiempo y comprensión que me dedicaron para aprender pruebas, técnicas y demás en el INIFAP. Y también gracias por asignarme tema y material de trabajo experimental para mi Tesis, y por último gracias por su buen trato tanto en el laboratorio como fuera del él y hacer del trabajo un ambiente agradable.

DEDICATORIA

A MI PADRE

Que siempre ha estado a mi lado alentando mis fuerzas y ganas de seguir luchando por el verdadero propósito de la vida que es cumplir mis sueños, siendo él, mi más grande motivación.

Papá gracias por ser mi Ángel que desde el cielo me cuida y guía mi camino, que tú presencia me rodee siempre hasta que se cumpla mi destino. Con cariño y admiración a ti **Martin Fernández**

RESUMEN

El aborto enzootico de los pequeños rumiantes (AEPR), producido por *Chlamydophila abortus*, es considerado en México una enfermedad exótica. El objetivo de éste estudio fue demostrar mediante la Técnica de Inmunoabsorción Ligada a Enzimas (ELISA) la presencia de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* en sueros de cabras lecheras mayores de 2 años de edad de la Comarca Lagunera. Se recolectaron 439 muestras serológicas de 55 rebaños lecheros de explotaciones extensivas sin estudios previos de *Chlamydophila abortus* en los municipios de Gómez Palacio en el Estado de Durango, Torreón, Matamoros, Francisco. I. Madero, San Pedro y Viesca en el Estado de Coahuila. El diagnóstico se determinó mediante el uso de paquetes comerciales para el diagnóstico de *Chlamydophila abortus*, del Instituto Pourquier (Francia). Los resultados encontrados arrojaron una seropositividad de un total de 19/54 (35%) rebaños lecheros para *Chlamydophila abortus*, y 32/439 (7.28%) cabras muestreadas. Se concluye en esta investigación que se demuestra la existencia de anticuerpos contra a *Chamydophila abortus*, la cual puede ser una posible causa de abortos en rebaños de cabras lecheras de la Comarca Lagunera.

Palabras clave: *Chamydophila abortus*, aborto caprino, Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), Comarca Lagunera.

I. INTRODUCCIÓN

México es el primer productor caprino de América Latina con más de 9 millones de cabezas, seguido de Brasil. Se estima que aproximadamente 150.000 productores a nivel nacional dependen total o parcialmente de esta especie. El fenotipo predominante en la zona es el criollo que proviene del cruzamiento de los animales criollos con las razas Anglo-Nubia y Alpina (Medrano, 2000).

El Aborto Enzootico de los Pequeños Rumiantes (AEPR) es una enfermedad infecciosa que afecta a ovinos y caprinos, producida por *Chlamydophila abortus* (Everett y col., 1999; Longbottom y Coulter, 2003), causa el aborto en el último tercio de gestación (Entrican y col., 2001) y el nacimiento prematuro de crías débiles y de bajo peso, que generalmente mueren durante los primeros días de vida (Everett y col., 1999).

Se considera exótica en México (NOM-046-ZOO-1995), y es de importancia zoonótica por causar riesgo en la salud de mujeres embarazadas (Longbottom y Coulter., 2003; Caro y col., 2008), después del contacto con ovejas y cabras paridas, lo que da una enfermedad febril grave en el embarazo y la pérdida del feto (Everett y col., 1999; Longbottom y Coulter, 2003; Papp y Shewen, 1996; Caro y col., 2008).

Estudios recientes demuestran por pruebas patológicas, serológicas y moleculares, que *Chlamydophila psitacci* y *Chlamydophila abortus* son especies distintas. *C. psitacci* causa enfermedad sistémica aviar y *C. abortus* causa el aborto (Van Loock y col., 2003).

La infección por esta enfermedad causa pérdidas económicas. El aborto caprino es frecuente en nuestro país, pero no hay trabajos que establezcan su prevalencia sobre su etiología, además son escasos los reportes sobre AEPR en México y en la Comarca Lagunera no hay estudios al respecto, por tal motivo, la finalidad de la presente investigación es buscar anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* en hatos caprinos lecheros, de esta región.

II. ANTECEDENTES

2.1. Historia

El primer reporte de infección de *Chlamydophila* fue en 1936 en un rebaño de ovinos en Escocia, el cual sugería que los abortos eran el resultado de factores ambientales, tales como deficiencias nutricionales (Greig y col., 1936). A esta enfermedad se le llamó Aborto Enzootico de los Ovinos (AEO), y en 1950 se demostró que era una enfermedad infecciosa causada por un microorganismo del grupo linfogranuloma venéreo psitacoso (LGV) (Stamp y col., 1950; Entrican y col., 2001).

Con el advenimiento de la microscopía electrónica y técnicas de cultivo en tejidos en la década de los 60s, se hizo evidente que las clamidias no eran virus. En 1966 se demostró que *Chlamydiae* era una bacteria por que poseía ADN y ARN y un ciclo de desarrollo diferente al de un virus, su pared celular es similar a las bacterias Gram negativas y posee ribosomas con susceptibilidad a antibióticos, un rasgo característico de las procariontes (Moulder, 1966). Para 1966 solo se conocían dos especies *C. psittaci* y *C. trichomatis* hasta que en la década de los 80s, Everett amplió un análisis de la secuencia de ADN llevado para reevaluar la relación genética en el orden *Chlamydiales* y proponer la nueva taxonomía (Everett y col., 1999). En el año 1999 se reclasificó la familia *Chlamydiaceae*, del orden *Chlamydiales*: *Chlamydia* y *Chlamydophila*, con un total de nueve especies, basado en las secuencias de ADN de los genes 16S y 23S rRNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Everett y col., 1999). El apoyo a esta reclasificación fue también gracias al análisis filogenético de las principales proteínas de la membrana externa y lipoproteínas ricas en cisteína (Bush y Everett, 2001).

En México se considera que la infección por esta bacteria es exótica, se han realizado diversos estudios de la enfermedad en pequeños rumiantes, en 1996 se realizó el aislamiento de la bacteria en rebaños ovinos de cinco estados del país (Escalante y col., 1996), en

1997 se hizo el primer reporte de la bacteria en caprinos (Escalante y col., 1997).

Cuadro 1. Familia *Chlamydiaceae* (Everett y col., 1999).

<i>Chlamydiaceae</i>	Especie	Huésped
	<i>C. abortus</i>	Ovejas, Cabras
	<i>C. psittaci</i>	Aves
<i>Chlamydophila</i>	<i>C. felis</i>	Gatos
	<i>C. caviae</i>	Cuyos
	<i>C. pecorum</i>	Mamíferos
	<i>C. pneumoniae</i>	Humanos
<i>Chlamydia</i>	<i>C. trichomatis</i>	Humanos
	<i>C. suis</i>	Cerdos
	<i>C. muridarum</i>	Ratones

2.2. Estudios de *Chlamydophila abortus* en México

En 2001, se demostró la participación *Chlamydophila* spp en un proceso zoonótico en México a partir de ganado caprino infectado con este agente (Escalante y col., 2001), en el 2005, se demostró la presencia de la bacteria en el estado de Michoacán en donde se logró el aislamiento de la bacteria en heces (Lazcano, 2006). En el 2008 se hizo un estudio serológico en rebaños caprinos lecheros de seis estados del país, encontrando anticuerpos contra la bacteria (Mora y col., 2008). Y en el 2011 se hizo un estudio de aislamiento y serología en Guanajuato de *C. abortus* encontrándose su presencia (Mora 2011) (Cuadro 1).

2.3. Etiología

Chlamydophila abortus, la cual es una bacteria Gram negativa intracelular obligada de células eucariotas cuyo principal órgano diana es la placenta (Everett y col., 1999; Longbottom y Coulter, 2003), (antes llamada *Chlamydia psittaci* tipo 1)

Los miembros de la familia *Chlamydiaceae* se consideran bacterias Gram negativas, intracelulares obligadas de células eucariotas (Everett y col., 1999; Longbottom y Coulter, 2003). Viven en lo que ha

sido referido como un medio ambiente extremo teniendo que desarrollar propiedades únicas de supervivencia y volviéndose dependientes de la célula que infectan, lo cual involucra un ciclo de desarrollo único donde participan 2 fases del microorganismo.

1. La infecciosa extracelular; Cuerpo Elemental (CE) el cual mide de 0.2 a 0.3 μm de diámetro, su función es infectar células susceptibles.
2. La no infecciosa; Microorganismos activos metabólicamente, Cuerpo Reticular (CR) el cual presenta un diámetro de 0.5 a 1.6 μm , su función es la multiplicación bacteriana (Caro y col., 2008; Everson y col., 2002).



Figura 1. Estados donde se ha encontrado *C. abortus*. UNAM-FMVZ-Microbiología-*Chlamydiae* SAGARPA-INIFAP-CENID MICROBIOLOGÍA-Palo Alto.

El ciclo único de desarrollo de *Chlamydiaceae* puede dividirse en las siguientes fases (Figura 2):

1. Adhesión a la célula hospedadora susceptible: La penetración a la célula eucariota ocurre por endocitosis mediada por receptores.
2. Internalización: El CE entra por inclusión intracitoplasmática y es ahí mismo donde permanece durante el ciclo completo.
3. Conversión de cuerpo elemental (CE) a cuerpo reticular (CR): Después de un proceso de reorganización estructural dentro de la inclusión intracitoplasmática se da la conversión del CE en CR de

- 6 a 10 horas. Durante este proceso evita ser destruida por parte de la célula.
4. Multiplicación del CR: El CR se multiplica mediante una fisión binaria de 10 a 18 horas, esto lo realiza utilizando los componentes celulares. A medida que los cuerpos reticulares se van multiplicando la inclusión intracitoplasmática rápidamente se llena y aumenta su tamaño de 18 a 24 horas (Hackstadt y col., 1999; Longbottom y Coutler, 2003).
 5. Reorganización de CR a CE: Dentro de 24 a 48 horas el CR se transforma de nuevo en el infeccioso y metabólicamente inactivo CE.
 6. Liberación de la nueva progenie: En las 48 a 72 horas la célula se lisa liberando la nueva progenie de CE las cuales van a infectar células susceptibles vecinas. También se liberan CR y cuerpos intermedios (Hackstadt y col., 1999; Longbottom y Coutler, 2003).

En 1990 se realizó una vacuna única de CEs, de *Chlamydia psittaci* para utilizarla en ovejas preñadas con una dosis única de administración subcutánea, dando protección a la madre y se relaciona la supervivencia del cordero (Tan y col., 1990).

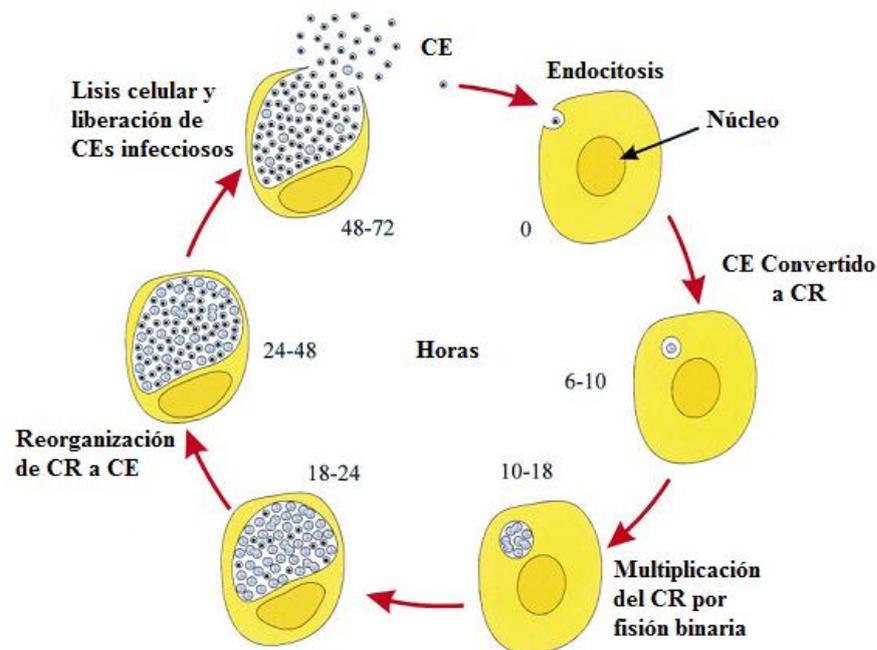


Figura 2. Ciclo de Desarrollo (Longbottom y Coutler, 2003).

2.4. Patogenia

Los grandes cambios patológicos se han observado en la placenta cuatro semanas después de la infección y antes del aborto (Navarro y col., 2001). En rebaños infectados los animales se contagian de cuerpos elementales que contienen fetos abortados, placenta, y descargas vaginales de hembras abortadas (Papp y Shewen, 1996), estas formas infecciosas se diseminan primero por sangre (clamidemia), en 1 a 5 días por diferentes órganos incluyendo lifonódulos mesentéricos e intestino. Se produce un periodo de latencia hasta el día 45-60 de gestación que resulta indetectable. A partir de ese momento se produce una segunda clamidemia que llega cerca de la placenta y tras el 60 día de gestación aproximadamente, la bacteria coloniza las células epiteliales de la placenta produciendo hemorragias en el estroma de las carúnculas del corion. A los 90 días de gestación se producen daños en la placenta (placentitis necrótica), que altera el paso de nutrientes al feto y una infección sistémica de éste causando un aborto por muerte y expulsión fetal en el último tercio de la gestación (Longhbottom y Coutler., 2003; Navarro y col., 2004).

2.5. Transmisión

Después del aborto o del parto la cabra excreta una gran cantidad del microorganismo en descargas uterinas, en la placenta, y en la piel de los cabritos abortados, siendo éstas fuente de infección y contaminación más importantes en el medio ambiente para el hato durante meses, así como también se infectan por pastos contaminados por infección de membranas fetales y descargas (Caro y col., 2008). Algunos animales pueden también excretar el microorganismo en su siguiente estro y parto. Después de 7-14 días no hay riesgo de reproducirse estos microorganismos. Una vez que la cabra aborta a consecuencia de esta enfermedad no vuelve a abortar (Papp y Shewen, 1996). Animales adultos se infectan como consecuencia de la contaminación de corrales de parto o de los pastos por las membranas fetales (Longhbottom y col., 2003) Los anticuerpos siguen presentes

por 2 años o más. El aborto siempre aparece en las últimas semanas de gestación independientemente del momento de la infección (Entrican y col., 2001; Navarro y col., 2004; Longhbottom y col., 2003).

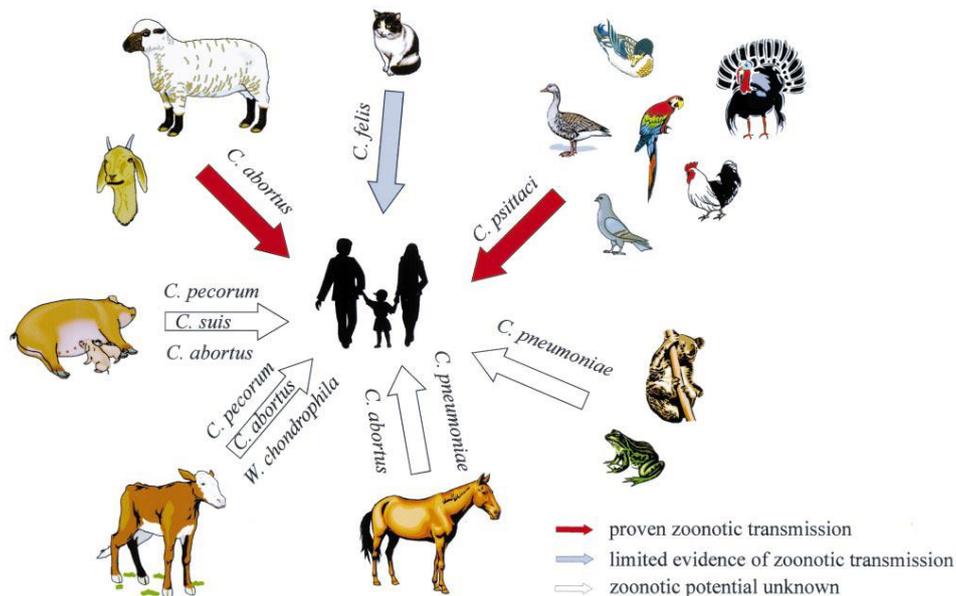


Figura 3. Potencial zoonótico de los agentes patógenos de origen animal.

También se puede dar por contacto con cabras externas que han abortado, por lo tanto el vínculo de mujeres embarazadas con las hembras y corderos al momento del parto es una fuente de infección (Entrican y col, 2001; Caro y col., 2008). Pueden infectarse a cualquier edad o época del año, pero el mayor periodo de riesgo es en Primavera, en temperaturas menores o cerca a cero grados, es probable que se prolongue por días o por meses ((Longhbottom y col., 2003). El papel transmisor de los machos no está claramente definido, se han aislado *C. abortus* de semen, testículos, y glándulas accesorias de carneros de 12 meses de edad de carneros experimentalmente infectados, no se han demostrado todavía su capacidad infectante (Longhbottom y col., 2003).

2.6. Signos clínicos

Cuando el AEPR se encuentra en un hato se observan pocos o ningún signo en los animales previos al parto y en hembras no preñadas no se encuentra ningún signo clínico hasta el subsiguiente

embarazo (Entrican y col., 2001). Se pueden presentar cambios de comportamiento o descargas vaginales 48 horas antes del parto y en hembras después del aborto pueden presentar una descarga uterina purulenta de color marrón durante 7 a 10 días (Longbottom y col., 2003). Los cabritos abortados pueden parecer normales o mostrar un cierto grado de edema subcutáneo, las membranas de la placenta pueden tener un color amarillo rojizo (Longbottom y col., 2003). También se ha informado de que algunos cabritos pueden nacer sanos y sobreviven a la infección, aunque pueden abortar durante su primer embarazo (Entrican y col., 2001). Los signos que se presentan pueden también manifestarse de diferentes formas como neumonía leve y transitoria y una hepatitis (Navarro y col., 2004).

2.7. Lesiones

Los animales abortados muestran edema subcutáneo o difuso y presencia de líquido seroso sanguinolento (ascitis, hidropericardio, hidrotórax) y el desarrollo de una placentitis donde la mayoría de los cotiledones aparecen con un aspecto arenoso debido a la necrosis (Longbottom y col., 2003; Buendía col., 1999). Generalmente no se observan lesiones macroscópicas, aunque pueden observarse petequias en la lengua. Histológicamente afecta el abomaso, hígado, bazo y pulmón (Navarro y col. 2004). Se puede observar neumonitis extensiva y alvéolos afectados con exudado fibrinoso y seroso (Longbottom y Coutler., 2003). En el hígado, los cambios patológicos consisten principalmente en áreas de necrosis, también pequeños focos de necrosis pueden ser encontrado en el pulmón, el bazo y, en menor frecuencia en el encéfalo y los linfonódulos (Longbottom y col., 2003).

2.8. Diagnóstico

Después del historial clínico dado en abortos, es necesaria una confirmación en un laboratorio diagnóstico para descartar otros procesos que también cursan con abortos (Berri y col., 2009). El diagnóstico debe ser diferencial con otros procesos abortivos como

Brucelosis, Leptospirosis, *Coxiella burnetti*, Campilobacteriosis, Listeriosis, Toxoplasmosis, Salmonelosis o abortos no infecciosos por traumatismos o nutricionales.

Para el diagnóstico de infecciones por *Chlamydomphila abortus* hay dos enfoques principales. La primera consiste en la detección directa del agente en el tejido o muestras de hisopos del útero, piel de cabritos, mientras que el segundo implica serología de muestras de sangre para la presencia de anticuerpos contra la clamidia (ELISA) (OIE, 2008). Las muestras más adecuadas para analizar un brote de abortos sospechosos de la familia *Chlamidaceae* son el feto completo, placenta, hisopo vaginal y sangre de la madre (OIE, 2008). Como esta bacteria es difícil de aislar se requiere de conocimiento especializado y tener un adecuado almacenamiento y transporte de las muestras biológicas para asegurar la viabilidad de los organismos, y no dar lugar a presentarse contaminación por otras bacterias Gram negativas que puedan reaccionar a falsos positivos. Para este aislamiento se necesita medidas de seguridad por ser una bacteria que produce zoonosis.

El medio de transporte adecuado para las clamidias es a base de sacarosa/fosfato/glutamato o medio SPG complementado con suero fetal bovino, antibióticos y fungicidas (Spencer y Johnson, 1983).

2.8.1. Pruebas utilizadas para el diagnóstico de *C. abortus*

En caso de abortos se debe remitir al laboratorio placentas, fluidos uterinos y vaginales, una muestra de sangre de las hembras que han abortado y el feto entero o sus vísceras con contenido, todo en adecuadas condiciones de conservación, según las instrucciones del laboratorio para realizar las siguientes pruebas:

Bacterioscópica: Improntas de los cotiledones infectados, de la piel de un feto recién abortado y de flujo vaginal de una oveja recién abortada para coloración de Gram y Stamp.

Aislamiento: Cultivo de células McCoy (Kelly y col., 1996), HeLa y Embrión de pollo

- Toma de muestras:

1. Cotiledones de la placenta refrigerados o en medio de transporte para cultivo y en formol 10%, amortiguado con fosfatos, para histopatología.
2. Hígado y pulmón de fetos abortados o el feto entero en su defecto
3. Flujo vaginal de cabra abortada en jeringa e hisopo (OIE, 2008).
4. Bazo (Del Rio y col., 2001).

Serológicas:

- La Técnica de Fijación de Complemento (CFT): Ha sido utilizado durante más de 50 años, su desventaja es que carece de especificidad, debido a su antígeno, que consiste principalmente en el LPS resistentes al calor, que es común en todas las especies de *Chlamydiaceae*.

- Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA): A partir de sueros o frotis de tejidos, puede ser directa o indirecta. En recientes años se ha utilizado ELISA basada en reconocer regiones específicas de la proteína mayor de la membrana externa y fragmentos de proteína recombinante de la familia POMP (Proteína polimórfica de membrana externa), expresa proteína de 80-90 kDa (Lenzko y col., 2011; Vretou y col., 2007).

- Inmunofluorescencia (FAT): En frotis de tejidos que puede ser directa o indirecta, su inconveniente es que no diferencia anticuerpos infecciosos de vacunales.

- Inmunohistoquímica: Esta técnica de diagnóstico directo detecta anticuerpos monoclonales o policlonales sobre el tejido para marcar la *C. abortus* y detectarla.

- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular adecuada para detectar el ADN de agentes patógenos difíciles de cultivar como lo es la *C. abortus* a partir de muestras de placenta o hisopo vaginal proporciona una detección rápida y específica en muestras biológicas sin recurrir a cultivo celular (Lenzko y col., 2011; Berri y col., 2009).

2.9. Situación sanitaria en México

Chlamydomphila abortus se encuentra dentro del grupo 1 de enfermedades exóticas de la ganadería y avicultura nacional de

notificación obligatoria (NOM-046-ZOO-1995). El grupo 1 está compuesto por las enfermedades exóticas que no se encuentran en el territorio nacional y que por su rápida diseminación e impacto económico para la población animal y riesgo para la salud pública son consideradas de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de sanidad animal del país (NOM-046-ZOO-1995).

III. JUSTIFICACIÓN

El aborto en los pequeños rumiantes es un problema de alta incidencia, teniendo como causa principal *Brucella melitensis*, sin embargo no se deben descartar otras enfermedades abortivas, como las infecciones clamidiales. De acuerdo a los antecedentes descritos, considerando que la Comarca Lagunera ocupa el primer lugar en producción de leche caprina a nivel nacional, y por lo tanto una infección debido a *Chlamydophila abortus*, podría causar grandes pérdidas económicas a esta industria y tomando en cuenta que en esta región no existe notificación alguna sobre la presencia de esta bacteria en cabras, la finalidad de la presente investigación es determinar la presencia de *C. abortus* e incluirla como una posible enfermedad abortiva en las cabras de la región y controlar el problema oportunamente.

IV. HIPÓTESIS

Las cabras lecheras de la Comarca Lagunera presentan anticuerpos contra *Chlamydophila abortus*.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Demostrar la presencia de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus* en rebaños caprinos lecheros de la Comarca Lagunera.

5.2. Objetivo Especifico

Determinar la seroprevalencia *Chlamydophila abortus* mediante la prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Marco de Referencia

La Comarca Lagunera, región ubicada en el centro-norte de México, está conformada por parte de los Estados de Durango y Coahuila (Figura 4) y su nombre se debe a los cuerpos de agua que se formaban alimentados por dos ríos: el Nazas y el Aguanaval.



Figura 4. Comarca Lagunera conformada por 11 municipios del Estado de Durango y 5 del estado de Coahuila. Tomado de: <http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php>, online (2009).

La Comarca Lagunera, está integrada por 16 municipios, 11 del Estado de Durango: Gómez palacio, Lerdo, Tlahualilo de Zaragoza, Mapimí, San Pedro del Gallo, San Luis del cordero, Rodeo, Nazas, Cuencame de Ceniceros, General Simón Bolívar y San Juan de Guadalupe y 5 del Estado de Coahuila: Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Matamoros y Viesca (Figura 5). Esta población se encuentra con una altitud de 1,120 metros (3,674 pies), una latitud de 24° 22' Norte, y una longitud 102° 22' Oeste.

(<http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php>. Online 2009).

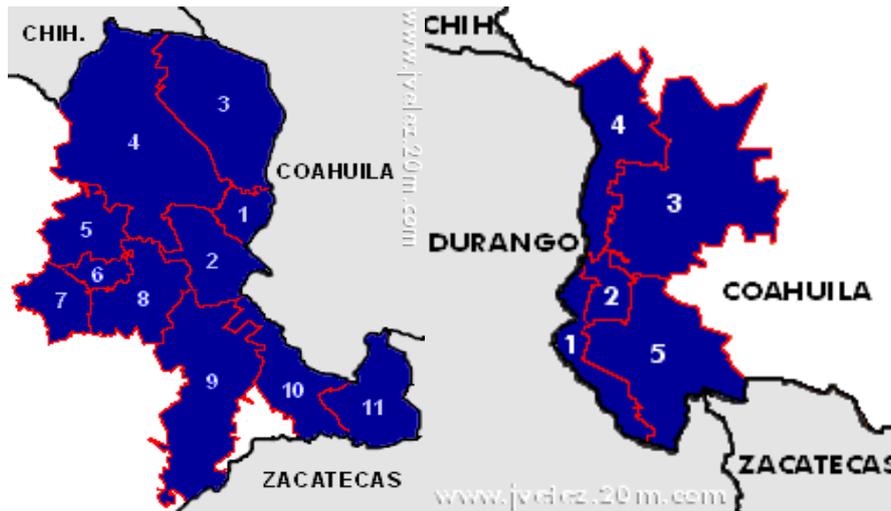


Figura 5. Comarca Lagunera, integrada por 11 municipios del Estado de Durango: 1) Gómez Palacio, 2) Lerdo, 3) Tlahualilo de Zaragoza, 4) Mapimí, 5) San Pedro del Gallo, 6) San Luis del Cordero, 7) Rodeo, 8) Nazas, 9) Cuencame de Ceniceros, 10) General Simón Bolívar y 11) San Juan de Guadalupe y 5 municipios del Estado de Coahuila: 1) Torreón, 2) Matamoros, 3) San Pedro de las Colonias, 4) Francisco I. Madero, y 5) Viesca. Tomado de: <http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php>, Online 2009.

6.2. Origen y características de las muestras

Se tomaron 439 muestras de sangre para la obtención de suero de 51 hatos de cabras lecheras de la Comarca Lagunera con un sistema de explotación extensiva sin estudios previos de *Chlamydophila abortus*. Las cabras muestreadas fueron elegidas mayores de dos años de edad y de acuerdo a su historial clínico de abortos.

6.3. Toma de muestras

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

6.4. Procesamiento de muestras

Las muestras se centrifugaron a 900 rpm durante 10 minutos para la separación del suero, el cual se transfirió a microtubos estériles

(Eppendorf), previamente identificados, posteriormente se mantuvieron en congelación a -20 °C en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID Microbiología, Palo Alto, Cuajimalpa, D.F.) hasta su utilización.

Se realizó un estudio inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra *Chlamydophila abortus*. Se utilizó un paquete comercial (Serological Diagnosis of *Chlamydophila abortus* by ELISA Method. Instituto Pourquier – Francia) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Esta prueba se basó en la detección de un antígeno recombinante el cual es una proteína polimórfica de membrana externa de 80-90 kDa, la cual es específica para *Chlamydophila abortus* y no tiene reacción cruzada con *Chlamydophila pecorum*.

6.4.1. Procedimiento

1. Depósito de controles y suero de estudio en la placa

El suero control y muestras se diluyeron (1/20) utilizando el siguiente método; Se depositaron:

- 190 µl de una solución amortiguada (dilution buffer 4) por pocillo.
- 10 µl de suero control negativo sin diluir en A1 y A2
- 10 µl de suero control positivo sin diluir en B1 – B2, C1 – C1
- 10 µl de suero muestra sin diluir por pocillo en D1 – D2, hasta H11 – H12

Se homogenizó el contenido en los pocillos agitando gentilmente la placa, cubriéndola con papel aluminio e incubándola por 1 hora (\pm 5 minutos) a 37 °C (\pm 3 °C) (Figura 6).



Figura 6. Placa con 96 pocillos en incubación, 1 hora a 37 °C.

2. Preparación de la solución de lavado

- Se diluyeron 100 ml de una solución lavadora concentrada (Wash solution 20X) en 1900 ml de agua destilada

3. Lavado de pocillos

- Se vació el contenido de la placa y se sacudió para eliminar el exceso de líquido.
- Se llenaron los pocillos con 250 a 300 μ l de la solución de lavado y la placa y se sacudió para eliminar el exceso de líquido.
- Se realizaron un total de 3 lavados (Figura 7).



Figura 7. Lavado de la placa después de la primera incubación.

4. Preparación del conjugado

- Se diluyó el conjugado 1:100 con una solución amortiguadora (Dilution Buffer)
- Se depositaron 100 μ l del conjugado diluido en cada pocillo.
- Se cubrió la placa y se incubó 30 minutos (\pm 3 min) a 37 °C (\pm 5 °C) (Figura 8).



Figura 8. Depósito de conjugado.

5. Lavado de pocillos

- Se vació el contenido de la placa y se sacudió para eliminar el exceso de líquido.

- Se llenaron los pocillos con 250 a 300 μ l de la solución de lavado y la placa y se sacudió para eliminar el exceso de líquido.
- Se realizaron un total de 3 lavados (Figura 7).

6. Revelado

- Se depositaron 100 μ l de la solución reveladora (Revelation Solution No. 2) lista para usarse en cada pocillo.
- Se incubó la placa a 21 $^{\circ}$ C (\pm 5 $^{\circ}$ C) por 20 minutos alejado de la luz.
- Se depositaron 100 μ l de una solución paradora (Stop Solution) por pocillo.
- Se agitó gentilmente la placa hasta que la solución se homogenizó (Figura 9).



Figura 9. Depósito de solución reveladora.

7. Lectura

- Se llevó a cabo la lectura inmediatamente después de aplicar la solución paradora a una densidad óptica a 450 nm (OD-450) (Figuras 10 y 11).

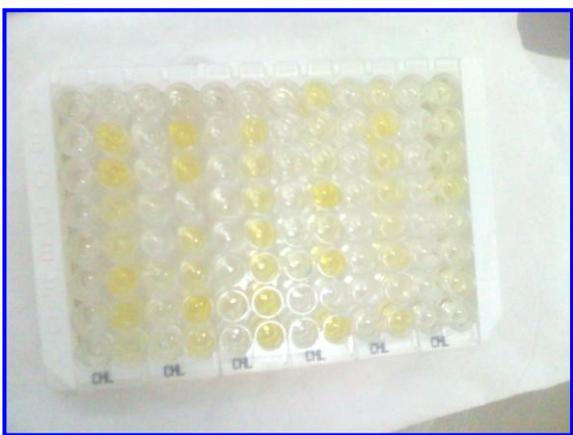


Figura 10. Muestras positivas color amarillo.

8. Uso del lector

- Se conecta el lector a la impresora
- Se coloca papel en la impresora
- Se pulsa el botón de lectura (Read)
- Se le da entrada 2 veces (Enter)
- Se selecciona la DO-450
- Se coloca la placa
- Se pulsa el botón de lectura (Read) y se esperan los resultados.



Figura 11. Lector de ELISA.

7. RESULTADOS

7.1. Detección de anticuerpos contra *Chlamydomphila abortus* mediante ELISA

De los 439 cabras muestreadas 32/439 (7.28%) resultaron positivas, 19/439 (4.32%) sospechosas y 388/439 (88.38%) negativas a *Chlamydomphila abortus* (Figuras 12). De los 54 rebaños lecheros 19/54 (35.18%) resultaron positivos (Figura 13).

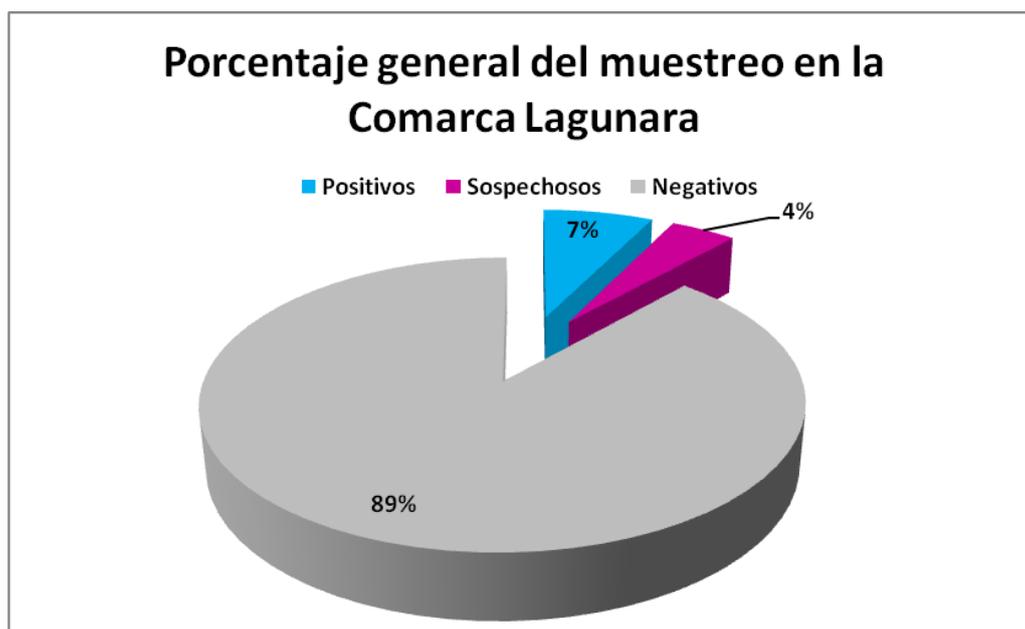


Figura 12. Seroprevalencia por cabra de *C. abortus* en la Comarca Lagunera.

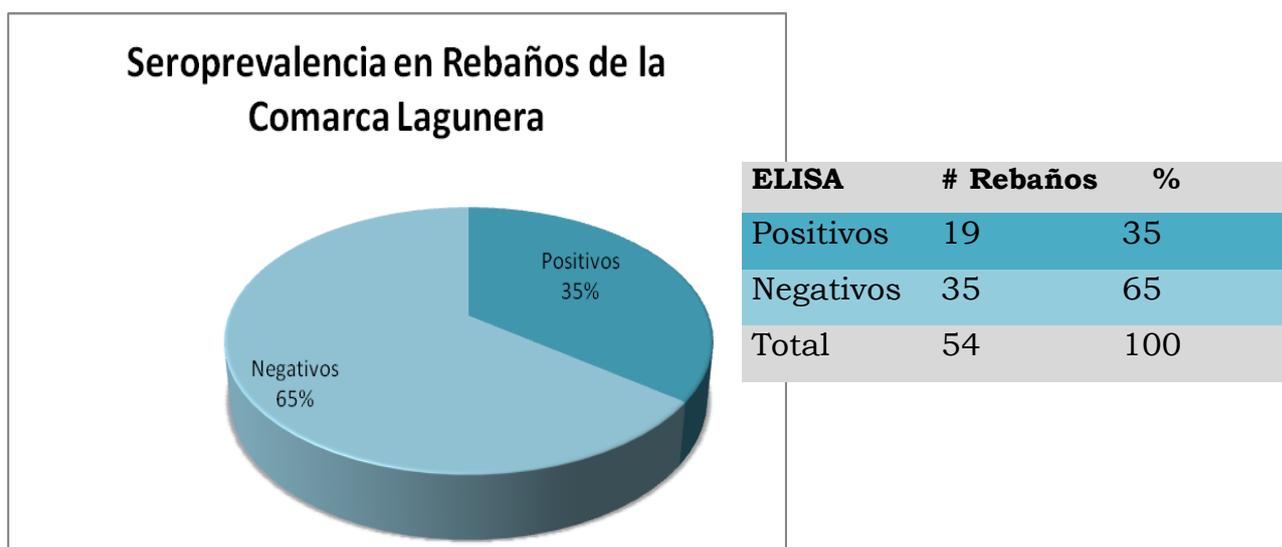


Figura 13. Seroprevalencia por rebaño de *C. abortus* en la Comarca Lagunera.

A continuación se desglosan los resultados de la seroprevalencia de *C. abortus*, en los 6 municipios muestreados (Figuras 14 y 15).

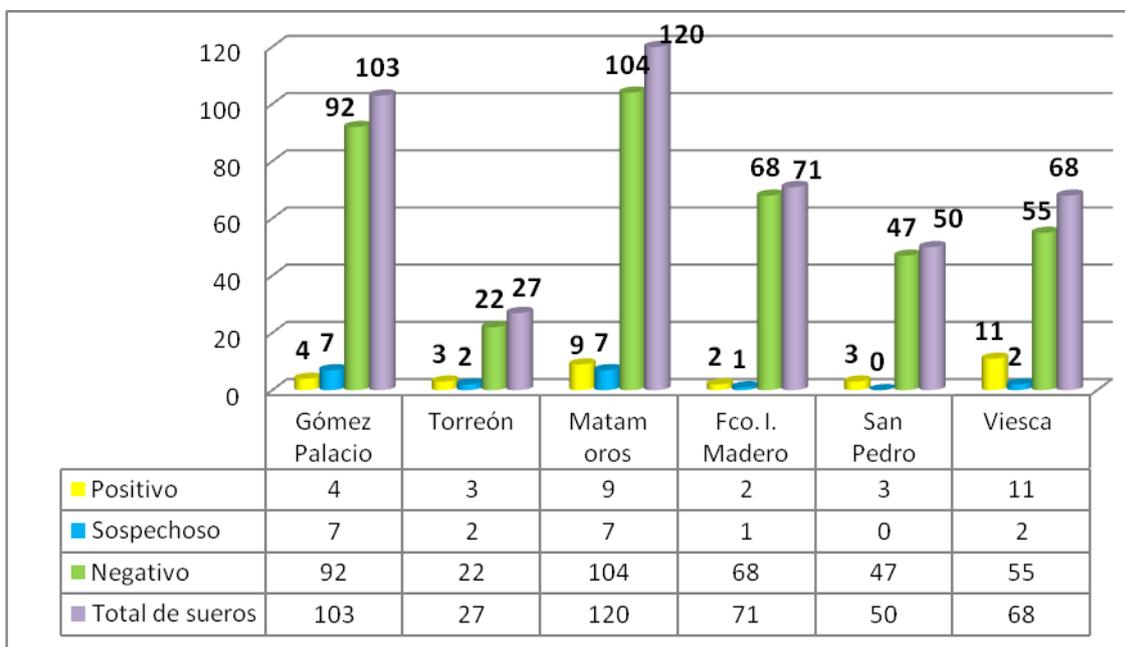


Figura 14. Seroprevalencia de *C. abortus* por municipio en la Comarca Lagunera.

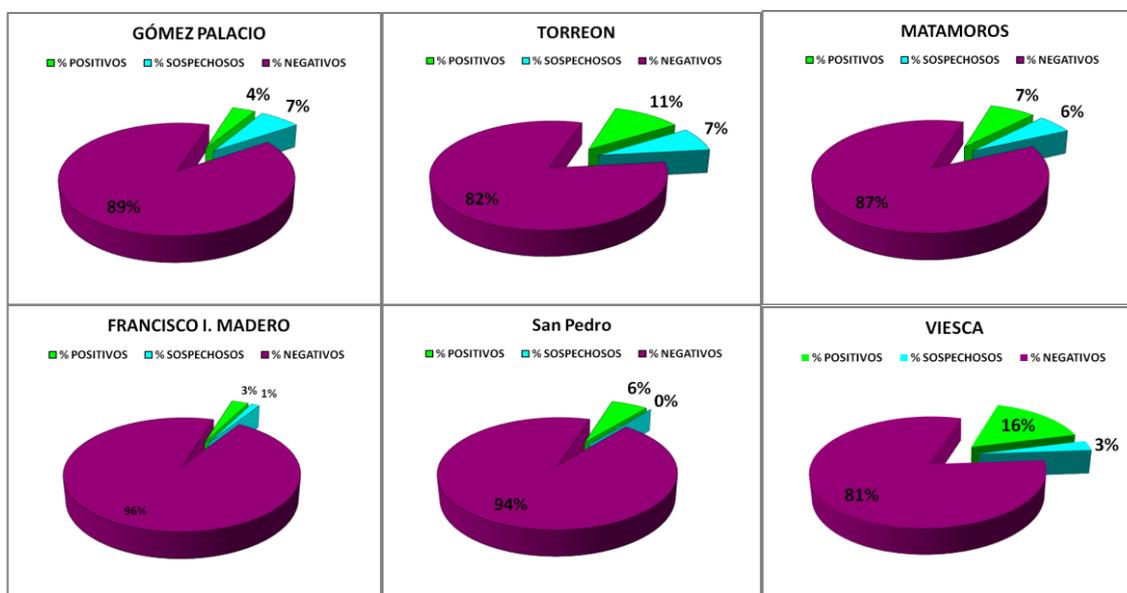


Figura 15. Seroprevalencia de *C. abortus* por municipio a) Gómez Palacio, Dgo. 4% (+), 7% (S), 89% (-); b) Torreón, Coah. 11% (+), 7% (S), 82% (-); c) Matamoras, Coah. 7% (+), 6% (S), 87% (-); d) Francisco I. Madero, Coah. 3% (+), 1% (S), 96% (-); e) San Pedro, Coah. 6% (+), 0% (S), 94% (-); f) Viesca, Coah. 16% (+), 3% (S), 81% (-).

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó la técnica de ELISA (Serological Diagnosis of *Chlamydophila abortus* by ELISA Method. Instituto Pourquier – Francia) con el fin de buscar anticuerpos contra *Chlamydophila abortus*, encontrándose una seroprevalencia por rebaño del 35%.

Estudios previos realizados con ensayos de ELISA demostraron que el paquete comercial Pourquier para el diagnóstico de *Chlamydophila abortus*, es altamente específico ya que no reacciona con ninguno de los sueros de corderos libres de patógenos específicos infectados experimentalmente con varios subtipos de *C. pecorum*. Por lo tanto, no produce ningún resultado falso positivo con sueros de referencia conocidos como libres de aborto enzootico ovino, o con sueros de hatos sospechosos a infección con *C. pecorum*, o con sueros de hatos sin historia clínica de abortos (Vretou y col., 2007; Wilson y col., 2009).

Sin embargo, el paquete comercial Pourquier presenta una baja sensibilidad ya que solo detecta alrededor del 50% de los sueros positivos a *C. abortus*, encontrados positivos por otros métodos de diagnóstico (Vretou y col., 2007; Wilson y col., 2009).

Por otra parte, estudios previos en 4 estados del país, Guanajuato, Guerrero, Baja California Sur, Puebla, Coahuila y Durango, demostraron la presencia anticuerpos contra *Chlamydophila abortus*, similares resultados se obtuvieron en este trabajo realizado en sueros de cabras lecheras mayores de 2 años de edad de la Comarca Lagunera, pudiendo inferir que esta bacteria es una posible causa de abortos en esta región.

En este estudio se encontró una seroprevalencia de 7.28% de anticuerpos contra *C. abortus*. Un estudio realizado en 2010 de *C. abortus* por la técnica de ELISA (Instituto Pouquier) en el estado de Guanajuato arrojó una prevalencia de 9.6% (Mora, 2011). Otros estudios realizados en CENID Microbiología de Baja California Sur (sin

publicar) presentó un 5% (8/180) y en Puebla se encontró un 4% (23/536) de seroprevalencia individual.

Este estudio es parte del proyecto “Estudio Epidemiológico de enfermedades en caprinos de la Comarca Lagunera” ocupando como primer lugar, *Brucella melitensis* con porcentaje de 78% (172/793) de positividad en la Comarca Lagunera y en segundo lugar *Leptospira* con un 60% (412/681) en Coahuila y un 58% (80/149) en Durango.

9. CONCLUSIÓN Y SUGERENCIAS

Se demostraron anticuerpos de *Chlamydophila abortus* en rebaños caprinos lecheros en la Comarca Lagunera, mediante la técnica de ELISA, sin embargo, no existen evidencias de aislamientos de *Chlamydophila abortus* en caprinos en la región.

Se sugiere realizar más estudios para determinar si la bacteria está participando en los abortos en caprinos.

Se debe considerar a *Chlamydophila abortus* dentro de los agentes etiológicos biológicos causantes de aborto caprino junto con *Brucella melitensis* y *Leptospira* spp.

10. LITERATURA CITADA

- 1. Berri, M., Rekiki, A., Boumedine, K.S. y Rodolakis, A. (2009).** Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol.* 9:130.
- 2. Buendía, J.A., Montes de Oca, R., Navarro, S.J., Cuello, F., y Salinas, J. (1999).** Role of Polymorphonuclear Neutrophils in a Murine Model of *Chlamydophila psittaci*-Induced Abortion. *Infec. Immun.* 67(5):2110-2116.
- 3. Bush, R.M. y Everett, K.D.E. (2001).** Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Internat. J. System. Evolution. Microbiol.* 51:203–220.
- 4. Caro, M.R., Buendía, A.J., Del Rio, L., Ortega, N., Gallego, M.C., Cuello, F., Navarro, J.A., Sánchez, J. y Salinas, J. (2009).** *Chlamydophila abortus* infection in the mouse: A useful model of the ovine disease. *Vet. Microbiol.* 135(1-2):103-111.
- 5. Del Rio, L., Buendía, J. A., Sánchez, J., Gallego, C.M., Caro R. M., Nieves, O., Seva, J., Pallare, J.F., Cuello, F y Salinas J. (2001).** Endogenous Interleukin-12 Is Not Required for Resolution of *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotype 1) Infection in Mice. *Infect. Immun* 69(8):4808–4815.
- 6. Entrican, G., Buxton, D. y Longbottom, D. (2001).** *Chlamydial* infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *J. R. Soc. Med.* 94:273-277.
- 7. Escalante-Ochoa, C., Rivera-Flores, A., Trigo-Tavera, F. y Romero-Martínez, J. (1996).** Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep trough cell culture isolation. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 38(1):17-23.
- 8. Escalante-Ochoa, C., Díaz-Aparicio, E., Segundo-Zaragoza, C. Suarez-Güemes, F. (1997).** Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: First report. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 39(3-4):117-121.

- 9. Escalante-Ochoa, C., Ducatelle, R. y Haesebrouck, F. (1998).** The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? *FEMS Microbiology Review*. 22(2):65-78.
- 10. Escalante-Ochoa, C., Lazcano, C. y Oberón, A. (2001).** *Chlamydophila* spp. como agente zoonótico en México. En: XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pag. 41.
- 11. Everett, K.D., Bush, R.M. y Andersen, A.A. (1999).** Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International J. Systematic Bacteriol.* 49:415–440
- 12. Greig, J. R. (1936).** Enzootic abortion in ewes: a preliminary note. *Vet. Rec.* 48, 1225-1227.
- 13. Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, I.E y Fischer R.E. (1999).** The *Chlamydia trachomatis* Inca protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cellular Microbiol.* 1(2):119-30.
- 14. Kelly, K.A., Robinson, A.E., y Rank G.R. (1996).** Initial Route of Antigen Administration Alters the T-Cell Cytokine Profile Produced in Response to the Mouse Pneumonitis Biovar of *Chlamydia trachomatis* following Genital Infection. *American. Infect. Immun.* 64(12):4976–4983.
- 15. Lazcano, A.C. (2006).** Detección de *Chlamydophila* spp en rebaños caprinos del estado de Michoacán mediante técnica inmunodiagnóstica ELISA y aislamiento bacteriológico (Tesis de Licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México D.F.
- 16. Lenzko, H., Moog, U., Henning, K., Lederbach, R., Diller, R., Menge, C., Sachse, K. y Sprague, L.D. (2011).** High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *Vet. Res.* 7:29.
- 17. Longbottom, D. y Coulter, L.J. (2003).** Animal *Chlamydioses* and zoonotic implications. *J. Comp. Path.* 128:217-244.

- 18. Medrano, J.A. (2000).** Recursos animales locales del centro de México. *Arch. Zootec.* 49:385-390.
- 19. Moulder, J.W. (1966).** The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annual Rev. Microbiol.* 20:107-130.
- 20. Mora, D.J.C., Escalante, O.C., Díaz, A.E., James, V.M.S., Martínez, G. y Trujillo, G.B. (2008).** Determinación serológica de *Chlamydomphila abortus* en ganado caprino lechero en México. En: XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Guadalajara (Jalisco) México.
- 21. Mora, D.J.C. (2011).** Determinación de *Chlamydomphila abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiasis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México; Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, CENID Microbiología. Pag. 44.
- 22. Navarro, J.A., García de la Fuente, J.N., Sánchez, J., Martínez, C.M., Buendía, A.J., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Ferri, E.F, Ortega, N. y Salinas, J. (2004).** Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydomphila abortus* in experimentally infected pregnant ewes. *Vet. Pathol.* 41:498.
- 23. Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995. (1997).** Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Publicada el 19 de Febrero de 1997.
- 24. OIE. 2008.** Aborto enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina). Manual de la Organización Internacional de Epizootias sobre animales terrestres. Pag. 1013-1020.
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.4.07_Aborto_enzootico_de_las_ovejas.pdf
- 25. Papp, J.R. y Shewen, P.E. (1996).** Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infect. Immun.* 64(4):1116-1125.

- 26. Spencer, W. y Jonson, F. (1983).** Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.* 113(23):535–536.
- 27. Stamp, J.T., McEwen, A.D., Watt, J.A.A. y Nisbet, D.I. (1950).** Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec.* 62:251-254.
- 28. Tan, T.W., Herring, A.J., Anderson, I.E. y Jones, G.E. (1990).** Protection of sheep against *Chlamydia psittaci* infection with a subcellular vaccine containing the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 58(9):3101-3108.
- 29. Van Loock, M., Vanrompay, D., Herrmann, B., Vander-Stappen, J., Volckaert, G., Goddeeris, B.M. y Everett, K.D.E. (2003).** Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. *Internat. J. System. Evolution. Microbiol.* 53:761–770.
- 30. Vretou, E., Radouani, F., Psarrou, E., Kritikos, I., Xylouri, E. y Mangana, O. (2007).** Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydophila abortus* antibodies. *Vet Microbiol.* 123:153-161.
- 31. Wilson, K., Livinstone, M. y Longbottom, D. (2009).** Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. *Vet. Microbiol.* 135:38-45.