
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA

Diagnóstico de *Chlamydia abortus*, mediante cultivo celular y PCR de un rebaño caprino con problemas de abortos en Culiacán, Sinaloa, México.

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Abril Romero Jarillo

Matrícula
2142033870

ASESORES:

Externo:

Dra. Erika Gabriela Palomares Resendiz
Investigadora titular C
Lab. de Enfermedades de los pequeños
rumiantes
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
CENID Salud Animal e Inocuidad
No. Eco. 2345
Vo. Bo.

Interno:

M. en C. Ruth Soto Castor
Lab. De Ecología Microbiana
Depto. El Hombre y su Ambiente
Div. CBS
UAM-Xochimilco
No. Eco. 24789
Vo. Bo.

México, D.F.

Fecha: 8 Enero 2020

RESUMEN

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR), aborto enzoótico ovino (AEO) o aborto clamidial, es una enfermedad infecciosa ocasionada por la bacteria *Chlamydia abortus*, que provoca aborto en el último tercio de gestación del rumiante, por lo que genera grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria a nivel mundial. Sin embargo, los estudios epidemiológicos sobre el AEPR en México son prácticamente inexistentes, no obstante, en los últimos años se han realizado reportes que indican su implicación en abortos de cabras dentro de la República Mexicana. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *C. abortus* en un rebaño caprino con problemas de abortos, en Culiacán, Sinaloa, México. Para ello, se tomaron muestras de exudado vaginal de 127 cabras, de las cuales 7 presentaron aborto. Se realizó el aislamiento bacteriano a partir de la infección de dos líneas celulares L929 y McCoy con las muestras clínicas y utilizando la cepa AB7 de *Chlamydia abortus* como cepa de referencia. En seguida, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de *Chlamydia* spp; además, se realizó la PCR punto final, para amplificar un fragmento de 912 pb del gen de POMP 90-91B. Los resultados del aislamiento bacteriano arrojaron un 60.62% de muestras positivas a inclusiones clamidiales y 7.08% de hembras positivas a *C. abortus*, mediante la PCR. Estos resultados sugieren la presencia de otras especies causantes de los abortos dentro del rebaño; asimismo, se confirma la presencia de *C. abortus* en un hato de Culiacán, Sinaloa, México mediante aislamiento bacteriano y PCR, sumándose a los casos ya existentes en el país.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Agente causal	4
2.1.1. Taxonomía	4
2.1.2. Morfología y ciclo de desarrollo	4
2.1.3. Patogenia	6
2.1.4. Signología y Lesiones	7
2.1.5. Vía de transmisión	7
2.1.6. Diagnóstico.....	8
2.1.7. Epidemiología.....	9
3. OBJETIVOS	10
4. METODOLOGÍA	10
4.1. Sitio de muestreo.....	10
4.2. Muestreo	10
4.3. Análisis de muestras	11
4.3.1. Aislamiento e identificación de <i>Chlamydia</i> spp. en cultivo celular.....	11
4.3.1.1. Infección	11
4.3.1.2. Inmunofluorescencia directa	12
4.3.2. Propagación de <i>Chlamydia</i> spp.....	12
4.3.3. Extracción de ADN	13
4.3.3.1. Cuantificación	14
4.3.4. Determinación por PCR	14
4.3.4.1. Cebadores	14
4.3.4.2. Condiciones de PCR	14
4.3.4.3. Visualización del amplificado	14
5. RESULTADOS	15
5.1. Diagnóstico de <i>Chlamydia</i> spp. por inmunofluorescencia directa.....	15
5.2. Diagnóstico de <i>Chlamydia abortus</i> por PCR.....	16
6. DISCUSIÓN	17
7. CONCLUSIÓN	18
8. BIBLIOGRAFÍA	19
9. ANEXOS	23

1. INTRODUCCIÓN

El Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiantes (AEPR), aborto Enzoótico ovino (AEO) o aborto clamidial, es una enfermedad infecto-contagiosa y zoonótica, provocada por bacterias intracelulares obligadas del género *Chlamydia* spp., cuyas principales especies causantes de abortos y pérdidas neonatales son *C. pecorum* y *C. abortus*; ésta última, representa la principal causa de abortos en ovejas y cabras a nivel global, ya que induce abortos durante el tercer trimestre de embarazo de la cabra debido a una infección placentaria, mientras que *C. pecorum* causa principalmente, artritis, conjuntivitis, enteritis e infertilidad, sin descartar la posibilidad de que provoque abortos (Aitken y Longbottom, 2007).

La principal vía de transmisión de *C. abortus*, es la oro-nasal, que se da principalmente entre animales, durante el parto o el aborto, debido a la gran cantidad de bacterias que se excretan con las descargas vaginales, la placenta y la piel de los fetos abortados (Longbottom y Coulter, 2003; Rodolakis, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2011).

Actualmente en México, el AEPR se encuentra en el grupo 3 de enfermedades endémicas de notificación mensual obligatoria (DOF, 2016). Sin embargo, el que se haya considerado una especie exótica hasta el 2016, hace que en los últimos años haya resultado complicado contar con los reactivos, anticuerpos y técnicas diagnósticas que permitan la rápida identificación de casos con presencia de *C. abortus*, lo cual ha favorecido la diseminación de la clamidiasis en el territorio nacional.

Por estos motivos, el objetivo del presente estudio es determinar la presencia de *C. abortus*, mediante aislamiento bacteriológico y PCR, en un rebaño caprino lechero de Culiacán, Sinaloa, con problemas de abortos, sugerentes al AEPR.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Agente causal

2.1.1. Taxonomía

Chlamydia abortus, es el agente etiológico del Aborto Enzoótico de los Pequeños Rumiante (AEPR) y es una bacteria que pertenece a la familia *Chlamydiaceae* (Figura 1). Esta familia es representada por un sólo género (*Chlamydia*) que cuenta con un total de 13 especies confirmadas (*C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. avium*, *C. gallinacea*, *C. psittaci*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. serpentis*, *C. poikilothermis* y *C. abortus*) y especies candidatas (*C. ibidis*, *C. sanzinia*, *C. corallus*), las cuales son patógenas para humanos y/o animales (Bergey, 2011; Vorimore *et al.*, 2013; Bachmann *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2015; Barati *et al.*, 2017; Bayramova *et al.*, 2017; Staub *et al.*, 2018).

Phylum: *Chlamydiae*
Clase: *Chlamydia*
Orden: *Chlamydiales*
Familia: *Chlamydiaceae*
Género: *Chlamydia*
Especie: *Chlamydia abortus*

Figura 1. Taxonomía de *Chlamydia abortus* (Everett y Andersen, 1999; Rodalakis y Youser, 2010).

2.1.2. Morfología y ciclo de desarrollo

Las bacterias que pertenecen a la familia *Chlamydiaceae* son bacterias Gram-negativas que dependen de un hospedero y sus metabolitos para poder desarrollarse, debido al reducido genoma que presentan, el cual provoca la carencia de muchas de las enzimas metabólicas (Elwell *et al.*, 2016).

Estas bacterias presentan una membrana externa formada principalmente por dos componentes antigénicos, el lipopolisacárido (LPS) y la proteína MOMP (Major Outer Membrane Protein), la cual se expone en la superficie y se extiende al espacio periplásmico cumpliendo su función de porina, además es crucial para la patogenicidad, adhesión e invasión de la célula huésped.

A diferencia de las bacterias Gram-negativas, *Chlamydiaceae* no posee una capa de peptidoglicano clásica, sino que ésta se reemplaza funcionalmente por el COMC (Outer Membrane Complex), el cual está formado por el entrecruzamiento de dos proteínas ricas en cisteína (OmcB y OmcA) y la MOMP, que funcionan como un soporte estructural de la bacteria (Liechti *et al.*, 2016; Bayramova *et al.*, 2017).

Este patógeno cuenta con un ciclo de desarrollo bifásico, donde se pueden observar diferencias morfológicas y fisiológicas; estas dos formas alternantes son el Cuerpo Elemental (CE) y Cuerpo Reticular (CR). El CE tiene un tamaño aproximado de 0.3-0.35 μm y representa la fase infecciosa capaz de sobrevivir en un ambiente extracelular, ya que su pared está formada por el COMC, que le da resistencia ante el estrés osmótico y físico. El CR va a presentar un tamaño de 0.5-1 μm , se especializa en la replicación y adquisición de nutrientes, es incapaz de infectar a otra célula y es osmóticamente frágil, por lo que se encuentra solamente en vacuolas en las que su osmolaridad está controlada (Villegas *et al.*, 2008; Elwell *et al.*, 2016; Liechti *et al.*, 2016; Bayramova *et al.*, 2017).

La invasión de la célula comienza cuando el CE establece la formación de un puente entre adhesinas bacterianas, receptores del huésped y protoglicanos heparan sulfato. El CE es endocitado para después formar una vesícula rodeada de una membrana protectora, llamada Cuerpo de Inclusión. Dentro de la inclusión, los CE se diferencian en CR (6-8 horas después de la infección) e inician una replicación exponencial por fisión binaria (8-16 horas post-infección), debido al incremento de la actividad metabólica por la penetración de metabolitos como fosfatos, aminoácidos y demás nutrientes que adquieren las proteínas de la membrana de inclusión, muchos de los cuales son redirigidos de vesículas exocíticas que van del aparato de Golgi a la membrana plasmática de la célula.

Pasadas las 48-72 horas post-infección, dependiendo de la especie de *Chlamydia* spp., los CR vuelven de forma asincrónica a CE, que posteriormente se liberarán al entorno extracelular mediante la lisis de la célula huésped o extrusión (Essig y Longbottom, 2015).

La muerte celular programada es importante para los patógenos intracelulares, porque una muerte prematura del huésped limita la replicación, por lo que *Chlamydia* spp. activa vías pro-supervivencia y bloquea mecanismos apoptóticos (Elwell *et al.*, 2016); sin embargo, cuando la célula huésped no puede mantener las exigencias nutritivas de *Chlamydia* spp., induce la lisis, cuyo proceso se da por

la disgregación de la membrana de inclusión y la membrana plasmática, como resultado de la acción de proteasas. En el caso de la extrusión, se da la liberación de una pequeña porción de la inclusión por una protuberancia membranosa, lo que previene la liberación de contenidos inflamatorios y protege a los CE de la inmunidad del huésped, además permite la persistencia de *Chlamydia* spp., ya que algunos CE y CR permanecen en la célula (Hybiske y Stephens, 2007). Después de salir de la célula, los CE pueden comenzar un nuevo ciclo de infección en otras células (Villegas *et al.*, 2008; Elwell *et al.*, 2016; Bayramova *et al.*, 2017; König *et al.*, 2017).

El ciclo de desarrollo de *Chlamydia* spp. puede detenerse de manera reversible debido a factores ambientales y condiciones de estrés como la privación de nutrientes (aminoácidos, hierro o glucosa), la exposición a citoquinas del huésped y/o antibióticos (β -lactámicos o fosfomicina) que se dirigen a la síntesis de la pared celular; así, los CR pasan a formas persistentes o Cuerpos Aberrantes, que presentan una replicación continua de ADN sin división celular (Elwell *et al.*, 2016; Bayramova *et al.*, 2017).

2.1.3. Patogenia

Cuando *Chlamydia* spp. entra al huésped por la vía primaria (la oronasal), ésta se establece en las amígdalas del rumiante, de las cuales se diseminará por la sangre y la linfa a otros órganos (hígado, bazo y pulmón) donde permanecerá en un estado latente, cuyo periodo está mediado por citocinas proinflamatorias (interferon- γ), que restringen el crecimiento de la bacteria a través de la inducción de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa y la degradación del aminoácido esencial triptófano (Brown y Entrican, 1996; Entrican *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001). Cuando la hembra entra en estado gestante, *Chlamydia* spp. sale de su estado de latencia, provocando el aborto generalmente sin signos previos durante las dos o tres últimas semanas de gestación; 24-48 horas previas al aborto pueden presentarse cambios de comportamiento y descargas vaginales que contienen un gran número de cuerpos elementales (Rodolakis *et al.* 1998; Entrican *et al.* 2001; Longbottom, 2003; Gutierrez *et al.* 2011; Entrican *et al.* 2012; Longbottom *et al.* 2013).

La infección placentaria se inicia en el hilio del placentoma. Alrededor del día 60 de gestación se desarrollan hematomas en las bases de las vellosidades coriónicas fetales, los cuales surgen por la fuga de sangre de los capilares periféricos en las puntas septales maternas en el hilio del placentoma del rumiante; ésta es la posible ruta por la que *Chlamydia* spp. accede a las células

epiteliales trofoblásticas que recubren las vellosidades coriónicas fetales, donde se replican y causan daño epitelial, inflamación y edema, afectando los placentomas, los cuales son responsables del intercambio de nutrientes y oxígeno entre la madre y el feto, así como el equilibrio hormonal (Mora, 2011; Longbottom *et al.*, 2013; Essig y Longbottom, 2015).

2.1.4. Signología y Lesiones

Los animales infectados generalmente no muestran signos de enfermedad hasta 48 horas antes del parto, donde se presentan descargas vaginales o un ligero aumento de la temperatura corporal (Díaz *et al.*, 2005).

Cuando se produce el aborto, las membranas placentarias aparecen engrosadas y con un tono amarillento-rojizo, puede observarse exudado vaginal infeccioso de color rosa durante otros siete a diez días (Entrican *et al.*, 2001).

Los animales abortados pueden tener una apariencia normal o mostrar un grado de edema subcutáneo; no hay lesiones macroscópicas específicas y el rumiante puede estar cubierto de un material de color café. Además del edema difuso, se observan fluidos sanguinolentos en la cavidad abdominal y pleural, así como petequias en la lengua, cavidad bucal y en las pezuñas.

En las cabras y en los bovinos se observa con frecuencia una mayor retención placentaria, endometritis y vaginitis, aunque esto no siempre ocurre (Entrican *et al.* 2001; Longbottom 2003; Essig y Longbottom, 2015).

El papel del macho en la transmisión de la enfermedad no es muy claro, pero los machos nacidos de hembras infectadas, excretan el organismo en semen que suele ser de baja calidad, también pueden desarrollar epididimitis, vesiculitis seminal e infecciones en los testículos y glándulas accesorias, lo que conduce a la esterilidad e infertilidad (Rodolakis y Laroucau, 2015).

2.1.5. Vía de transmisión

Después del parto o aborto, la cabra excreta una gran cantidad de CE por medio de descargas uterinas, membranas placentarias y fluidos vaginales, siendo el contacto directo, la ingesta o inhalación de alguno de estos elementos, la principal vía de transmisión. Asimismo, la infección puede continuar debido a la excreción de organismos infecciosos durante el estro (DeGraves *et al.*, 2004; Livingstone *et al.*, 2005; Mora, 2011).

La susceptibilidad ante el AEPR es mayor en cabras antes de los 100 días de gestación, pero cuando una hembra es infectada después de este periodo o no está gestante, se desarrollará una infección que permanecerá latente hasta la siguiente temporada de partos (Rodolakis *et al.*, 1998).

El aborto enzoótico de los pequeños rumiantes es también una zoonosis que afecta principalmente a mujeres embarazadas, las cuales están en contacto con cabras y borregos infectados durante la temporada de partos (Rodolakis *et al.*, 2010). Al igual que en los pequeños rumiantes, *C. abortus* tiene la habilidad de colonizar la placenta ocasionando la muerte fetal. Los principales síntomas en mujeres gestantes son fiebre, dolor de cabeza, náuseas y vómito, si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo se presentan abortos espontáneos y si la infección ocurre después, causa labor prematura y muerte del recién nacido. Aunado a esto, si la infección en mujeres no es diagnosticada y tratada, puede provocar falla renal, disfunción hepática, coagulación intravascular diseminada e incluso la muerte. La transmisión de la enfermedad se ha reportado en el Reino Unido, Francia, Estados Unidos, Holanda, Italia y Suiza (Entrincan *et al.*, 2001; Longbottom y Coulter, 2003; Essig y Longbottom, 2015).

2.1.6. Diagnóstico

Debido a que la principal signología del AEPR es el aborto y que además existen otros microorganismos (*Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Coxiella burnetii*, *Camphylobacter fetus*, *Toxoplasma gondii*, etc.) que tienden a provocar los mismos (Bedotti y Rossanigo; 2011), es necesario el exacto y temprano diagnóstico. Por ello, en la detección de *Chlamydia* spp., se han realizado diversas técnicas, como el diagnóstico por microscopía directa, el cultivo en embrión de pollo o en cultivos celulares (las células McCoy, HeLa, L929 y células de riñón de hámster neonato (BHK) son las más utilizadas), exámenes serológicos para la detección de proteínas (prueba de fijación del complemento, CFT), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), inmunohistoquímica, inmunofluorescencia directa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Especialmente, la técnica de PCR ha mostrado rapidez, sensibilidad (mayor al 95%) y especificidad (95%) en muestras biológicas sin recurrir al cultivo celular, además es una técnica que no se ve afectada por la falta de viabilidad del microorganismo buscado (López, 2009; Barati *et al.*, 2017). En el caso específico de *C. abortus*, esta técnica se ha empleado para la amplificación de regiones

conservadas de los genes de la proteína de membrana externa *omp A*, *omp 1* y *omp 2*, el gen POMP y/o el espacio intergénico del gen rRNA 16S y 23S (Everett *et al.*, 2000; Barati *et al.*, 2017).

2.1.7. Epidemiología

Los estudios epidemiológicos del AEPR son pocos, y los datos que se tienen son obtenidos a partir de las investigaciones realizadas por los grupos del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), la Universidad Autónoma del Estado de México y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México), mediante pruebas serológicas, aislamiento bacteriano y PCR.

En México, el primer reporte de aislamiento del género *Chlamydia*, a partir de un aborto en caprinos, se presentó en 1997 (Escalante *et al.*, 1997), y para el 2005, en el estado de Michoacán, se logró el aislamiento de este patógeno a partir de muestras de heces, fetos abortados y caprinos neonatos (Lazcano *et al.*, 2005). En el 2008 se identificó el ADN de la bacteria en muestras de exudados vaginales ovinos del Estado de México con historia de aborto, así como del feto de uno de éstos (Jiménez *et al.*, 2008). En ese mismo año se realizó un estudio serológico en rebaños caprinos lecheros de 6 estados del país, encontrando anticuerpos específicos contra la bacteria (Mora *et al.*, 2008). A partir del 2010, se ha dado a la tarea de continuar investigando la seroprevalencia, complementando con el aislamiento bacteriano y además se ha logrado implementar la técnica de PCR como alternativa en el diagnóstico.

Durante los años 2012 y 2013 se obtuvieron 186 muestras procedentes de 49 rebaños de los estados de Coahuila, Jalisco, Puebla, Veracruz y Querétaro. Se logró el aislamiento bacteriano de 23.1% de las muestras y a nivel molecular por PCR se detectó un 9.6% de muestras con resultado positivo (Sánchez, 2014).

Si bien estos estudios muestran la prevalencia de este agente patógeno y el impacto que ha tenido en México, es necesario continuar con el reporte epidemiológico del AEPR, mediante técnicas que favorezcan su correcto y pronto diagnóstico, para así establecer el control de la enfermedad que tanto ha afectado a la industria caprina (Entrincan *et al.*, 2001; Longbottom, *et al.*, 2013). Por ello, el enfoque de este estudio se da al diagnóstico de *C. abortus* en un rebaño caprino con problemas de abortos, donde además, se busca la mejora de las técnicas aplicadas.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Detectar la presencia de *Chlamydia abortus* en un rebaño caprino con problemas de abortos, en Culiacán, Sinaloa, México.

Objetivos específicos:

1. Diagnóstico de *Chlamydia* spp. por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa.
2. Determinar la presencia de *C. abortus* por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, mediante la amplificación del segmento de gen de la proteína de membrana externa polimórfica, POMP 90-91-B.

4. METODOLOGÍA

4.1. Sitio de muestreo

El muestreo se realizó en el rancho “El Papache”, ubicado en el poblado Mojolo de Culiacán, Sinaloa, México (24° 48'31'' N -107° 23'37''W). La región de Culiacán se caracteriza por tener un clima predominantemente cálido subhúmedo con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 25.9 °C y precipitaciones promedio de 695.2 mm (INEGI, 2017). Este municipio cuenta con una población de 858,638 personas (INEGI, 2010) y su producción anual caprina es de 8.440 ton de ganado en pie (SIAP, 2017).

4.2. Muestreo

Para los diagnósticos, se colectaron muestras de exudado vaginal de 127 cabras, de las cuales 7 presentaron aborto y 120 fueron de hembras que tuvieron un parto normal. Adicionalmente, se muestrearon 10 machos, de los que se obtuvieron 3 muestras de semen y 7 de hisopado prepucial.

Los exudados vaginales y prepuciales se tomaron con hisopos estériles y se transportaron en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml, adicionado con 2 ml de medio SPG (sacarosa–fosfato /glutamato), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) GIBCO y Gentamicina a una temperatura de

4°C. El semen colectado se obtuvo con ayuda de una vagina artificial y se les adicionó medio SPG. Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta que se procesaron.

4.3. Análisis de muestras

El análisis de muestras se realizó en el Laboratorio de Enfermedades de los Pequeños Rumiantes, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Salud Animal e Inocuidad, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en la Ciudad de México.

4.3.1. Aislamiento e identificación de *Chlamydia* spp. en cultivo celular

Para el aislamiento de *Chlamydia* spp., se realizó el cultivo *in vitro* de dos líneas celulares de fibroblastos de ratón (L929 y McCoy). Para ello, se propagaron monocapas celulares en botellas de poliestireno de 25 cm² NUNC™, con Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle *In vitro*, suplementado con 10% de SFB, 1% de Aminoácidos No Esenciales (ANE) *In vitro* y 1% de L-Glutaminida; manteniéndolos en una incubadora NAIRE, UN-4750 por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Seguido de esto, se utilizaron placas Lab-Tek estériles con 8 pozos, en las cuales se realizaron pases con concentraciones de 1.5 x 10⁵ células por pozo, adicionadas con 300 µl de MEM, ANE, 1% de L-Glutamina y 10% de SFB. Estas fueron incubadas 24 horas hasta obtener una confluencia del 70 al 80%.

4.3.1.1. Infección

Una vez obtenida la confluencia celular deseada, se les retiró el medio líquido y se inocularon con 100 µl de muestra. Las muestras de semen y lavado prepucial se centrifugaron (centrifuga: *Hermle Labortchnik Z206A*) a 5 000 rpm por 5 minutos para inocular con el sobrenadante. Posteriormente se incubaron por 5 minutos en una incubadora con agitación orbital *Thermo Scientific MAXQ 4450*; enseguida se centrifugaron a 2 500 rpm durante 15 minutos, para después ser incubadas 1 hora a 37 °C.

Seguido de esto, se procedió a retirar el inoculo y añadir 300 µl de MEM, adicionado con 10% de SFB, Gentamicina 50 µg/ml, Anfotericina B 250 µg/ml *GIBCO* y Vancomicina suplementada *Fluka*, siendo así incubadas por 62 horas a 37°C con 5% de CO₂. Cada proceso de infección contó con un control negativo y un control positivo; para este último, se hizo uso de la cepa de referencia AB7 de *Chlamydia abortus*.

4.3.1.2. Inmunofluorescencia directa

La detección de *Chlamydia* spp. se realizó con la técnica de inmunofluorescencia directa, empleando el kit comercial *IMAGEN Chlamydia* test (OXOID, UK), el cual detecta cuerpos elementales de todas las especies, a través de un anticuerpo monoclonal conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

Para realizar la inmunofluorescencia, se retiró el sobrenadante de todos los pozos, se realizó un lavado con PBS y se fijaron todas las laminillas con formaldehído al 1% durante 15 minutos a 4 °C. Enseguida, se hizo un lavado y se dejaron secar brevemente a temperatura ambiente, para después retirar la celda de división de las laminillas.

A cada cuadrícula se le adicionaron 20 µl de mezcla de Reagent y PBS a una concentración de 1:25, e inmediatamente se incubaron en atmósfera húmeda por 15 minutos a 37 °C y 5% de CO₂; transcurrido el periodo de incubación, se les realizó un lavado y se dejaron secar a temperatura ambiente, para adicionarles una gota de aceite de inmersión como medio de montaje y colocar a cada laminilla un cubreobjetos.

Para la observación de las laminillas bajo microscopio, se hizo uso del Olympus IX71 de Leica DM1000 de epifluorescencia, con el objetivo 40X, y el programa IF: LAS V4.9.Ink.

Se determinó como muestra positiva aquella que presentará más de tres pequeños cuerpos de inclusión de un color verde manzana.

Las muestras que arrojaron resultados positivos fueron propagadas para su posterior diagnóstico de *C. abortus* mediante la técnica de PCR.

En cinco de las muestras de hisopado vaginal no fue posible realizar el diagnóstico por inmunofluorescencia directa, debido a que éstas presentaban contaminantes que no permitieron el crecimiento de la monocapa celular, por lo que se les realizó la prueba de PCR para *C. abortus* directo de la muestra.

4.3.2. Propagación de *Chlamydia* spp

Para la propagación de las muestras positivas a género, se prepararon monoestratos celulares de fibroblastos de ratón L929 y McCoy en placas de 24 pozos con MEM de Eagle, suplementado con 10% de SFB, 1% de ANE y 1% de L-Glutamina; se incubaron bajo 37 °C y 5% de CO₂.

Una vez alcanzado el 100% de confluencia celular, se realizó la propagación del inóculo a partir del sobrenadante de las muestras ya aisladas, con el proceso de infección mencionado anteriormente.

Pasado el periodo de 72 horas de infección, se provocó la lisis celular por la formación de cristales a partir del proceso de congelación y descongelación, con el fin de facilitar la posterior obtención del material genético de *C. abortus*. El sobrenadante y el monoestrato celular de cada pozo fueron recuperados y almacenados en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml a -70 °C hasta su posterior procesamiento.

4.3.3. Extracción de ADN

Para la extracción del material genético de *C. abortus*, se utilizó un kit comercial *Qiagen DNeasy Blood and Tissue*, realizando modificaciones del protocolo. Para ello, se hicieron alícuotas de 400 µl de muestra propagada, a la cual se le adicionaron 20 µl de Proteinasa K, se homogeneizó la muestra y se incubó en baño María a una temperatura de 56 °C durante 24 horas. Pasado el periodo de incubación, se agregaron 200 µl de buffer de lisis AL y se incubó por 10 minutos a 70 °C (incubadora: *Dry Bath DAIGGER*). Después se agregaron 200 µl de etanol absoluto grado biología molecular a la muestra y se homogeneizó, enseguida se colocó en una columna con filtro y un tubo colector de 2 ml, para posteriormente centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto.

Una vez centrifugada la muestra se pasó la columna a un nuevo tubo colector, donde se agregaron 500 µl de buffer de lavado AW1 y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto. Posteriormente se realizó un nuevo cambio de columna y se agregaron 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó a 13 500 rpm durante 4 minutos; adicionalmente se centrifugó a 8 000 rpm / 1 minuto para retirar el exceso de etanol.

Para llevar a cabo la elución de ADN, la columna se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se le adicionaron 100 µl de Buffer AE, después se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 minuto. El ADN fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

4.3.3.1. Cuantificación

La calidad de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), a 70 Volts por 15 minutos; además se cuantificó con un Nanodrop *Nano-100 Micro-Spectrophotometer 2.0* para obtener la cantidad (ng/uL) y la calidad del ADN extraído,

considerando para esta última la absorbancia a 260 nm/280 nm, con una proporción de 1.8 para ser aceptada como ADN puro (Velázquez *et al.*, 2012).

4.3.4. Identificación de *C. abortus* por PCR

4.3.4.1. Cebadores

Se utilizaron los oligos CpaX-1: 5'ACGGTCACTTGGAAACAAGG-3' y CpaX-2: 5'-AGCAGAGGTTGGGCTCACTA-3', los cuales hibridizan en la región 1541 a la 2452, que amplifican un fragmento de 912 pb del segmento de gen de proteína de membrana externa polimórfica (POMP 90-91B) (Jiménez *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2014).

4.3.4.2. PCR

La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía 0.4 µM de primers forward y reverse, 0.15 mM de MgCl₂ *invitrogen*, 0.1 mM de dNTPs *Thermo Scientific*, 10X de Buffer con KCl *Thermo Scientific*, 5U/µL de enzima polimerasa *Taq Pol Thermo Scientific* y agua libre de nucleasas *Thermo Scientific*. Se realizó una estandarización de concentración de templado, la cual fue de 2.42 ng/uL a 112.8 ng/uL por reacción.

La amplificación se realizó en el termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cycle TC9610/TC9610-230, versión 1.0*, con las siguientes condiciones: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto, 72°C por 1.30 minutos y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

4.3.4.3. Visualización del amplificado

Los productos de amplificación fueron observados en un gel de agarosa al 1.5% (Thermo scientific EE.UU) teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Para visualizar las bandas se utilizó un fotodocumentador. El producto de amplificación esperado es de 912 pb (Ver figura 4).

5. RESULTADOS

5.1. Diagnóstico de *Chlamydia* spp. por inmunofluorescencia directa

Los resultados presentados por la inmunofluorescencia directa, arrojaron que de las 127 muestras de hisopo vaginal, 77 (60.62%) dieron positivo a *Chlamydia* spp.; mientras que, de las 10 muestras de machos, sólo una muestra de semen fue positiva y dos para el caso de los hisopados prepuciales (Ver Tabla 1) (Ver Anexo 3).

El criterio que se utilizó para asignar un resultado positivo de las muestras fue el siguiente: se buscaron inclusiones redondas fluorescentes de color “verde manzana” en el citoplasma de las células L929 y McCoy, tras su identificación, la observación del mismo campo se realizó bajo luz azul para determinar que la estructura se encontrara dentro de la célula y no sobre ésta. Se presentaron casos en los que se observó puntillero fluorescente en zonas determinadas con estructuras poco evidentes, estas muestras se tomaron como negativas y la fluorescencia se asoció a ruido de fondo (Figura 2 y 3).

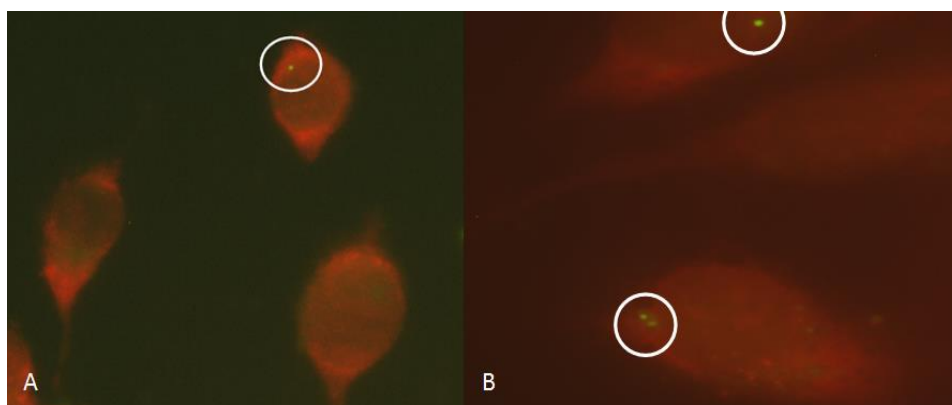


Figura 2. Aislamiento positivo de exudado vaginal caprino. (A) Imagen a objetivo 40X; (B) Imagen a objetivo 100X. Los círculos blancos señalan las inclusiones de *Chlamydia* spp.

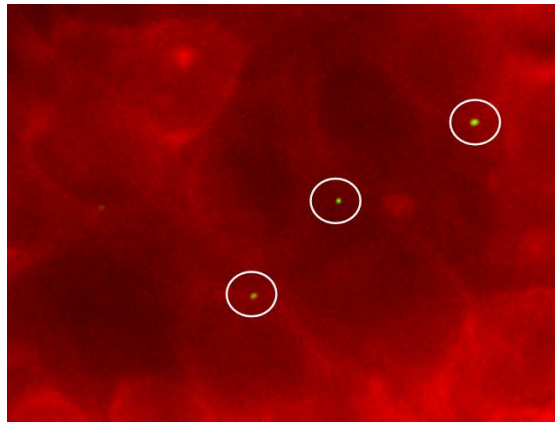


Figura 3. Aislamiento positivo de hisopado prepucial caprino, mediante inmunofluorescencia directa. Los círculos blancos señalan inclusiones de *Chlamydia* spp. a 40X.

5.2. Diagnóstico de *Chlamydia abortus* por PCR

Los resultados de la PCR en las 77 muestras de hisopado vaginal, que fueron positivas al diagnóstico de *Chlamydia* spp. por inmunofluorescencia directa, arrojaron un total de 9 muestras positivas (7.08%) para *C. abortus*; mientras que las muestras de hisopado prepucial y semen, no se presentó algún resultado positivo (Ver Tabla 1) (Ver Anexo 3).

Tabla 1. Diagnósticos positivos a *Chlamydia* spp. y *C. abortus*, mediante inmunofluorescencia directa y PCR de hisopados vaginales, prepuciales y muestras de semen.

Tipo de muestras	No. de abortos	Diagnósticos positivos a <i>Chlamydia</i> spp.	Diagnósticos positivos a <i>C. abortus</i>
Hisopado vaginal	7 (5.83%)	77 (60.62%)	9 (7.08%)
Lavado prepucial	*	2	0
Semen	*	1	0

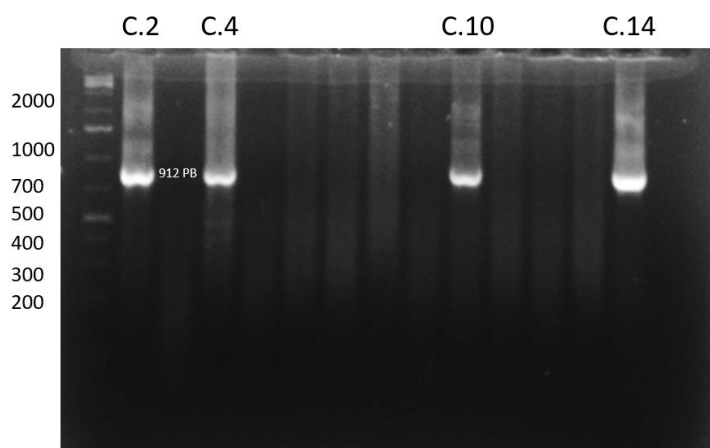


Figura 4. Amplificación por electroforesis del segmento de gen POMP-90-91B de *Chlamydia abortus*.

Marcador de peso molecular 1kb. El segundo carril (C.2) muestra el control positivo (AB7) y el cuarto carril (C.2), decimo (C.10) y decimocuarto (C.14), indican muestras positivas (banda de 912 pb).

6. DISCUSIÓN

Aunque el porcentaje de cabras reportadas con abortos en el rebaño de esta investigación fue bajo (5.83%), se debe resaltar que las infecciones por *Chlamydia* spp. ocurren con frecuencia con baja tasa de abortos, tal como lo reportan Lenzko *et al.*, en el 2011, donde obtuvieron 78% de casos de *Chlamydia* spp. en rebaños con tasas menores al 1% en abortos.

Además, se debe tomar en cuenta el alto porcentaje de hembras diagnosticadas con *Chlamydia* spp. (60.62%) en este estudio por medio del aislamiento en cultivo celular, y el hecho que sólo un 7.08% de éstas haya resultado positivas a *C. abortus*, pues sugiere la presencia de otras especies como *C. psittaci* y *C. pecorum*, las cuales también se encuentran en rebaños caprinos con problemas de abortos (Panthev *et al.*, 2010; Barati *et al.*, 2017), por lo que podrían estar involucradas en los abortos que se presentaron dentro del rebaño, que además dieron resultados positivo al género; sin embargo, se debe dar seguimiento de éstas y realizar el debido diagnóstico.

Lo mismo ocurre con las hembras que no presentaron abortos pero resultaron positivas a *Chlamydia* spp. y *C. abortus*, ya que la presencia de éstas no implica que la bacteria encontrada esté provocando una respuesta infecciosa en las cabras (Oseikria *et al.*, 2016), por lo que es necesario evaluar aspectos como la Multiplicidad de Infección, cuyo factor puede ser lo que explique por qué sólo una hembra, de las nueve hembras positivas a *C. abortus*, fue registrada con aborto; de igual forma, se debe tomar en cuenta el historial clínico de éstas, pues de haber presentado anteriormente

un cuadro infeccioso por *C. abortus*, tales resultados pueden atribuirse a una resistencia adquirida del sistema inmune ante la bacteria (Gerber *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2011), o a lo reportado por Longbottom *et al.* (2013), quienes en su estudio mostraron que una dosis alta de *C. abortus* en ovejas no gestantes, estimula la protección inmune, lo que resulta en una tasa de abortos más baja. Asimismo, Barati *et al.* (2017) han señalado que el porcentaje de abortos en un rebaño es bajo el primer año, sin embargo éste puede alcanzar del 10 al 30% en el segundo y tercer año.

No obstante, la prevalencia obtenida nos confirma la presencia del patógeno en un hato de Culiacán, Sinaloa, sumándose a los casos ya existentes en el país reportados en la última década, pues en el 2014, Campos *et al.*, reportaron una prevalencia de 4.87% en cabras de ordeño del estado de Guanajuato; mientras que para el mismo estado, Mora *et al.*, (2015) informaron de una positividad del 23.8% para *C. abortus* por medio de PCR y aislamiento por cultivo celular. Mismos reportes se han presentado para los estados de Veracruz, Jalisco, Coahuila, Puebla, Querétaro y Durango (Fernández, 2011; Sánchez, 2014); al igual que en el 2011, Soriano *et al.*, identificaron a *C. abortus* como el agente causal de un caso de aborto ovino en el Estado de México.

En cuanto a los machos que resultaron positivos a *Chlamydia* spp., se recomienda un seguimiento de esto, ya que poco se sabe sobre el papel de *Chlamydia* spp. en machos, sin embargo, se ha detectado este patógeno en varias especies animales, cuyas infecciones pueden causar uretritis, prostatitis e incluso problemas de fertilidad (Eckert *et al.*, 2019).

Así, con los diagnósticos realizados en esta investigación y los casos ya reportados, se puede observar la efectividad de la PCR como una buena técnica para evidenciar la presencia de *C. abortus* en rebaños caprinos (Mora *et al.*, 2015).

Los esfuerzos para detectar *C. abortus* en México han ido en aumento, debido a su reciente incorporación a la lista de enfermedades endémicas (DOF, 2016), y sin duda, el reporte de este caso en el estado de Sinaloa, se suma a los ya existentes sobre la propagación del AEPR, así como el mejoramiento en las técnicas de su diagnóstico.

7. CONCLUSIONES

Con base en lo anterior se puede concluir que:

Los diagnósticos obtenidos en esta investigación, confirman la presencia de *Chlamydia* spp. y *Chlamydia abortus* en un rebaño caprino de Culiacán, Sinaloa, México.

Existen otras especies pertenecientes al género *Chlamydia* que podrían estar causando los problemas de aborto dentro del rebaño.

La técnica de cultivo celular, junto a la confirmación por PCR, para diagnosticar *Chlamydia abortus*, son técnicas de alta sensibilidad y especificidad.

8. REFERENCIAS

- Aitken, I., & Longbottom, D. (2007). Chlamydial Abortion. En I. Aitken, *Diseases of sheep* (pág. 626). Edimburgo: Blackwell Publishing.
- Bachmann, N. L., Polkinghorne, A., & Timms, P. (2014). Culture-Independent Genome Sequencing of Clinical Samples Reveals an Unexpected Heterogeneity of Infections by *Chlamydia pecorum*. *Trends in Microbiology*, 22(8), 464-472.
- Barati, S., Moori-Bakhtiari, N., Ghorbanpoor Najafabadi, M., Momtaz, H., & Shokuhizadeh, L. (2017). The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion. *Irianian Journal of Microbiology*, 9(5), 288-294.
- Bayramova, F., Jacquier, N., & Greub, G. (2017). Insight in the biology of *Chlamydia*-related bacteria. *Microbes and Infection*, 20(7-8), 432-440.
- Bedotti, D. O., & Rossanigo, C. E. (2011). *Manual de reconocimiento de enfermedades del caprino*. La Pampa, Argentina: EDICIONES INTA.
- Bergey. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed.). (N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, & N. L. Ward, Edits.) New York: Springer.
- Brown, J., & Entrican, G. (1996). Interferon- γ mediates long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection In vitro. *Journal of Comparative Pathology*, 115(4), 373-383.
- Brown, J., Howie, S. E., & Entrican, G. (2001). A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 8(1-2), 107-119.
- Campos Hernández, E., Vázquez Chagoyán, J. C., Salem, A. Z., Saltijeral Oaxaca, J. A., Escalante Ochoa, C., López Heydeck, S. M., & Montes de Oca-Jiménez, R. (2014). Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 46, 919-924.
- DeGraves, F. J., Kim, T. Y., Jee, J., Schlapp, T., Hehnen, H. R., & Kaltenboeck, B. (2004). Reinfection with *Chlamydia abortus* by Uterine and Indirect Cohort Routes Fertility in Cattle Preexposed to *Chlamydia*. *Infection and Immunity*, 72(5).
- Díaz Aparicio, E., Aguilar Romero, F., & Vázquez Navarrete, J. (2005). *Manual para el diagnóstico de enfermedades en ovinos y caprinos en México*. México: Comité de salud y producción avina y caprina .

- DOF. (4 de mayo de 2016). *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 yy acuáticos*. Diario Oficial de la Federación .
- Eckert, T., Goericke-Pesch, S., Heydel, C., Bergmann, M., Kauffold, J., Failing, K., & Wehrend, A. (2019). Interaction of different *Chlamydiae* species with bovine spermatozoa. *BMC Microbiology*, *19*(23).
- Elwell, C., Mirrashidi, K., & Engel, J. (2016). *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Microbiology* , *14*(1), 385-400.
- Entrincan, G., Brown, J., & Graham, S. (1998). Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *21*(1), 15-26.
- Entrincan, G., Buxton, D., & Longbottom, D. (2001). Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *Journal of the royal society of medicine*, *94*(6), 273-277.
- Entrincan, G., Wheelhouse, S., Wattegedera, & Longbottom, D. (2012). New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *35*(3), 271-276.
- 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. Latinoamericana de Microbiología* , *39*(3-4), 117-121.
- Essig, A., & Longbottom, D. (2015). Chlamydia abortus: New aspects of infectious abortion in sheep and potential risk por pregnant women. *2*(22), 22-34.
- Everett, K. D. (2000). *Chlamydia* and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.*, *75*(2), 109-126.
- Everett, K. D., Bush, R. M., & Andersen, A. A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of *Parachlamydiaceae* 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 . *International J. Systematic Bacteriol*, *49*, 415-440.
- Fernández Torres, A. I. (2011). *Diagnóstico Serológico de Chlamydia abortus en cabras de la Comarca Lagunera*. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro .
- Gerber, A., Thoma, R., Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, C., Pospischil, A., & Borel, N. (2007). Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over two year period . *BioMed Central*, *3*(24).
- Gutierrez, J., Williams, E. J., O'Donovan, J., Brady, C., Proctor, A. F., Marques, P. X., . . . Markey, B. K. (2011). Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydia abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Veterinary Microbiology*, *147*(1-2), 119-126.
- Hybiske, K., & Stephens, R. (2007). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(104), 11430-11435.

- INEGI. (2010). *INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA*. Recuperado el 04 de Junio de 2019, de <https://www.inegi.org.mx/app/buscador/default.html?q=culiac%C3%A1n>
- INEGI. (2017). *Anuario estadístico y geográfico de Sinaloa 2017*. Aguascalientes: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Jiménez Estrada, J. M., Escobedo Guerra, M. R., Arteaga Troncoso, G., López Hurtado, M., Haro Cruz, M. D., Montes de Oca Jiménez, R., & Guerra Infante, F. M. (2008). Detection of *Chlamydophila abortus* in Sheep (*Ovis aries*) in México. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3(4), 91-95.
- König, L., Siegl, A., Penz, T., Haider, S., Wentrup, C., Polzin, J., . . . Domman, D. (Mayo/Junio de 2017). Biphasic Metabolism and Host Interection of a Chlamydial Symbiont . *m.Systems*, 2(3), 202-216.
- Lazcano, A. C., Escalante, O., Ducöing, W., & Trejo, A. (2005). *Inmunodetección de Chlamyidiphila abortus en caprinos de Ecuandureo, Michoacán, México, mediante prueba de ELISA*. INIFAP, SAGARPA . Cuernavaca, Moerelos, México : XLI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 14-18 Noviembre.
- Lenzko, H., Moog, U., Henning, K., Lederbach, R., Diller, R., Menge, C., . . . Sprague, L. D. (2011). High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Veterinary Research*, 7(29).
- Liechti, G., Kuru, E., Packiam, M., Hsu, Y.-P., Tekkam, S., Hall, E., . . . Maurelli, A. T. (2016). Pathogenic *Chlamydia* lack a classical sacculus but synthesize a narrow, mid-cell peptidoglycan ring, regulated by MreB, for cell division. *pLoS Pathog*, 12(5), p. e1005590. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005590>
- Livingstone, M., Entrican, G., Wattedegera, S., Buxton, D., McKendrick, I. J., & Lonngbottom, D. (2005). Antibody Responses to Recombinant Protein Fragments of the Major Outer Membrane Protein and Polymorphic Outer Membrane Protein POMP90 in *Chlamydophila abortus*-Infected Pregnant Sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , 12(6), 770-777.
- Longbottom, D. (2003). Chlamydial vaccine development . *Journal of Medical Microbiology*, 537-540.
- Longbottom, D., & Coulter, L. J. (2003). Animal Chlamydioses an Zoonotic Implications. *Elsevier Science* , 128, 217-244.
- Longbottom, D., Livingstone, M., Maley, S., Zon, A. v., Rocchi, M., Wilson, K., . . . Buxton, D. (2013). Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *PLOS ONE*, 8(2), e57950. doi:10.1371/journal.pone.0057950.
- López Villegas, E. O. (2009). Estudio de las características del ciclo de desarrollo de *Chlamydia trachomatis* relacionadas a la presencia del plásmido 7.5 kb. México: Instituto Politécnico Nacional.

- Mora Díaz, J. C. (2011). *Determinación de Chlamydophila abortus en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mora Díaz, J. C., Díaz Aparicio, E., Herrera López, E., Suárez Gúemes, F., Escalante Ochoa, C., Jaimes Villarreal, S., & Arellano Reynoso, B. (2015). Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Veterinaria México*, 2(1), 1-11.
- Mora Díaz, J., Escalante Ochoa, C., Díaz Aparicio, E., Jaimes, M., Martínez, G., & Trujillo, A. (2008). *Detección serológica de Chlamydophila abortus en ganado caprino lechero en México*. Guadalajara, Jalisco, México: XXX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.
- Osekria, M., Pellerin, J. L., Rodolakis, A., Vorimore, F., Laroucau, K., Bruyas, J. F., . . . Fieni, F. (2016). Can *Chlamydia abortus* be transmitted by embryo transfer in goats? *Theriogenology*, 86(6), 1482-1488.
- Panthev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., & Sachse, K. (2010). Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6), 473-484.
- Rodolakis, A. (2001). *Caprine Chlamydioses In: Tempestra M. (editor)*. Recuperado el 05 de 08 de 2018, de http://www.ivis.org/advances/Disease_Tempesta/rodolakis_chlamydiosis/IVIS.pdf
- Rodolakis, A., & Laroucau, K. (2015). *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Vet. Microbiol.*, 181(1-2), 107-118.
- Rodolakis, A., & Yousef, M. K. (2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*. 140(3-4), 382-91.
- Rodolakis, A., Salinas, J., & Papp, J. (1998). Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet Res*, 29(3-4), 275-288.
- Sánchez Rocha, L. (2014). *Presencia de Chlamydia abortus en cabras de México*. México : Universidad Nacional Autónoma de México .
- SIAP. (31 de Marzo de 2017). *SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA*. Recuperado el 04 de Junio de 2019, de https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/
- Soriano Vargas, E., Jiménez Estrada, J. M., Salgado Miranda, C., López Hurtado, M., Escobedo Guerra, M. R., & Guerra Infante, F. M. (2011). Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juaréz, México. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12(11).
- Staub, E., Marti, H., Biondi, R., Levi, A., Donati, M., Leonard, C. A., . . . Seth-Smith, H. M. (2018). Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature-sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. *Scientific Reports*, 8, 1-14.
- Taylor Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2015). Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *FEMS Pathogens and Disease*, 73(1), 1-15.

Velázquez, P., Aragón Martínez, M. D., & Cornejo Romero, A. (2012). Extracción y purificación de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. México.

Villegas, E., Sorlózano, A., Camacho, A., & Gutiérrez, J. (2008). *Chlamydomydia pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enfermedades Infecciosas Microbiología*, 26(10), 627-635.

Vorimore, F., Hsia, R.-h., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., . . . Laroucau, K. (2013). Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLOS ONE*, 8(9), e74823. Obtenido de doi:10.1371/journal.pone.0074823

9. ANEXOS

Anexo 1. Diagnóstico de *Chlamydia* spp. en muestras de hisopado vaginal, mediante inmunofluorescencia directa.

ID	Diagnóstico	ID	Diagnóstico	ID	Diagnóstico
11*	Positivo	61	Positivo	108	Negativo
12*	Positivo	62	Negativo	109	Negativo
13*	Positivo	63	Positivo	110	Negativo
15	Negativo	64	Positivo	111	Positivo
16	Negativo	65	Negativo	112	Positivo
17	Positivo	66	Negativo	113	Positivo
18	Positivo	67	Positivo	114	Positivo
19	Negativo	68	Positivo	115	Negativo
20	Negativo	69	Negativo	116	Negativo
21	Negativo	71	Positivo	117	Negativo
22	Negativo	72	Positivo	118	Positivo
23	Negativo	75	Negativo	119	Negativo
24	Negativo	76	Positivo	120	Positivo
25	Positivo	77	Positivo	121	Positivo
26	Positivo	78	Negativo	122	Negativo
27	Positivo	79	Negativo	123	Negativo
28	Negativo	80	Negativo	124	Positivo
29	Positivo	81	Positivo	125	Negativo
31	Positivo	82	Negativo	126	Positiva
32	Positivo	83	Positivo	127	Positivo
33	Positivo	84	Positivo	128	Positivo
34	Negativo	85	Positivo	129	Negativo
35	Positivo	86	Positivo	130	Positivo
36	Positivo	87	Negativo	131	Negativo
37	Positivo	88	Positivo	132	Negativo
38	Positivo	89	Positivo	133	Negativo
39	Negativo	90	Positivo	138	Negativo
40	Negativo	91	Positivo	139	Positivo
42	Positivo	92*	Positivo	140	Negativo
43	Negativo	93	Positivo	141	Negativo
44	Negativo	94	Negativo	142	Positivo
46	Negativo	95	Positivo	143*	Positivo

48	Negativo	96	Negativo	144	Negativo
49	Negativo	97	Positivo	147	Positivo
53	Positivo	101	Negativo	148	Positivo
54	Negativo	102	Positivo	150	Positivo
55	Positivo	103	Positivo		
57	Positivo	104	Positivo		
58	Positivo	105	Positivo		
59	Negativo	106	Positivo		
60	Positivo	107	Positivo		

Acotaciones: (*) Cabras que presentaron abortos.

Anexo 2. Diagnóstico de *Chlamydia* spp en muestras de semen e hisopado prepucial, mediante inmunofluorescencia directa.

ID	Tipo de muestra	Diagnóstico
1	Semen	Negativo
2	Semen	Positivo
3	Semen	Negativo
4	Hisopado prepucial	Negativo
5	Hisopado prepucial	Negativo
6	Hisopado prepucial	Negativo
7	Hisopado prepucial	Positivo
8	Hisopado prepucial	Negativo
9	Hisopado prepucial	Negativo
14	Hisopado prepucial	Positivo

Anexo 3. Diagnóstico de *Chlamydia abortus* en cabras, mediante PCR.

ID	PCR	ID	PCR	ID	PCR
2	Negativo	64	Negativo	111	Negativo
7	Negativo	68	Negativo	112	Negativo
11*	Positivo	71	Negativo	113	Negativo
12*	Negativo	73	Positivo	114	Negativo
13*	Negativo	74	Negativo	120	Negativo
14	Negativo	76	Negativo	121	Negativo
17	Negativo	77	Negativo	124	Negativo
18	Negativo	81	Negativo	126	Negativo
26	Negativo	83	Negativo	127	Negativo
29	Negativo	84	Negativo	128	Negativo

30*	Negativo	85	Negativo	130	Positivo
31	Negativo	86	Negativo	134	Negativo
32	Negativo	88	Negativo	135	Negativo
33	Negativo	89	Negativo	136	Negativo
35	Negativo	90	Negativo	137	Negativo
38	Negativo	91	Negativo	139	Negativo
42	Negativo	92*	Negativo	142	Negativo
45	Negativo	93	Negativo	143*	Negativo
51	Negativo	95	Negativo	146	Negativo
52	Negativo	97	Negativo	147	Negativo
53	Positivo	99	Negativo	148	Positivo
55	Negativo	102	Negativo	149	Negativo
57	Positivo	103	Positivo	150	Negativo
58	Positivo	104	Negativo		
60	Negativo	105	Negativo		
61	Negativo	106	Positivo		
63	Negativo	107	Negativo		

Acotaciones: (*) Cabras que presentaron abortos.