

2022-02-10

Detección de *Chlamydia* spp. en leucocitos de sangre periférica de ovinos sin aborto previo

Fernando Martin Guerra-Infante

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional, fguerra_96@yahoo.com

Edgar Oliver López-Villegas

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional, ivoliver@hotmail.com

Susan López-Vargas

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional, lenyeaiko@hotmail.com

Carlos Mata-Vite

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional, cmatavite@hotmail.com

Marcela López Hurtado

Instituto Nacional de Perinatología, diaclaro2000@yahoo.com.mx

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Guerra-Infante FM, López-Villegas EO, López-Vargas S, Mata-Vite C, López Hurtado M, Cancino-Díaz JC, Gutiérrez-Paredes S y de Haro-Cruz Md. Detección de *Chlamydia* spp. en leucocitos de sangre periférica de ovinos sin aborto previo. *Rev Med Vet.* 2022;(44): 61-69. doi: <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss44.8>

This Artículo de investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Detección de *Chlamydia* spp. en leucocitos de sangre periférica de ovinos sin aborto previo

Autor

Fernando Martin Guerra-Infante, Edgar Oliver López-Villegas, Susan López-Vargas, Carlos Mata-Vite, Marcela López Hurtado, Juan Carlos Cancino-Díaz, Sonia Gutiérrez-Paredes, and María de Jesús de Haro-Cruz

Detección de *Chlamydia* spp. en leucocitos de sangre periférica de ovinos sin aborto previo*

Fernando Martin Guerra-Infante¹ / Edgar Oliver López-Villegas² / Susan López-Vargas³ / Carlos Mata-Vite⁴ / Marcela López Hurtado⁵ / Juan Carlos Cancino-Díaz⁶ / Sonia Gutiérrez-Paredes⁷ / María de Jesús de Haro-Cruz⁸

Resumen

El aborto enzootico ovino es una enfermedad causada por *Chlamydia abortus*. Es considerada una zoonosis y una de las principales causas de pérdidas económicas en estas explotaciones. Este trabajo se enfocó en utilizar el cultivo de leucocitos de animales sin signos de abortos y la detección de anticuerpos para determinar la posible presencia de *C. abortus* en explotaciones de traspatio. Se obtuvieron 42 muestras de sangre periférica de ovejas de diferentes poblaciones. La detección de *Chlamydia abortus* se realizó mediante la tinción de Giemsa y la técnica de PCR. La detección de anticuerpos anti-*C. abortus* se dio mediante una técnica de ELISA comercial. Los resultados mostraron 21 muestras positivas mediante la técnica de PCR, de las cuales solo 10 fueron positivas mediante la técnica de Giemsa, mientras que 22 sueros mostraron anticuerpos anti-*C. abortus*. En este estudio el 38,1 % de las muestras fueron positivas a la infección por *C. abortus*, como se confirmó mediante PCR y serología. En conclusión, los leucocitos de sangre periférica pueden ser útiles para detectar una infección por *Chlamydia* spp. en explotaciones sin historial de abortos, con lo que se puede conocer la prevalencia real del aborto enzootico ovino en México.




Palabras clave: aborto, *Chlamydia abortus*, leucocitos, seroprevalencia.

Detection of *Chlamydia* spp. In Peripheral Blood Leukocytes in Ewes without any Previous Abortion

Abstract

The Ewes Enzootic Abortion is a disease caused by *Chlamydia abortus*. It is deemed a zoonosis and one of the leading causes of financial losses in this type of business. This article focuses on using the culture of leukocytes from animals without any abortion symptoms and antibody detection to determine the potential presence of *C. abortus* in backyard exploitations. Forty-two samples of peripheral blood were obtained from ewes in different populations. The detection of *Chlamydia abortus* was carried out by using the Giemsa dye and PCR technique. Anti-*C. Abortus* antibody detection was performed through a commercial ELISA technique. Results showed 21 positive samples using the PCR, and only ten were positive according to the Giemsa dye, while 22 serum samples showed anti-*C. abortus* antibody. In this study, 38.1% of the samples were positive for the *C. abortus* infection, as verified with the PCR and serology. In conclusion, peripheral blood leukocytes can be helpful to detect an infection caused by *Chlamydia* spp. Animal

* Artículo de investigación.

- 1 Químico bacteriólogo parasitólogo, maestro en Ciencias en Inmunología. Doctor en Ciencias. Profesor investigador del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional. Jefe de laboratorio de virología del Instituto Nacional de Perinatología.
✉ fguerra_96@yahoo.com
 <http://orcid.org/0000-0001-8730-0484>
- 2 Químico bacteriólogo parasitólogo, maestro en Ciencias Quimicobiológicas. Doctor en ciencias. Jefe del laboratorio de microscopia electrónica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional. ✉ ivoliver@hotmail.com
 <http://orcid.org/0000-0002-9995-2145>
- 3 Química bacterióloga parasitóloga. Maestra en Ciencias Quimicobiológicas. Investigadora del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional.
✉ lenyeaiko@hotmail.com
 <http://orcid.org/0000-0002-9600-7631>

Cómo citar este artículo: Guerra-Infante FM, López-Villegas EO, López-Vargas S, Mata-Vite C, López Hurtado M, Cancino-Díaz JC, et al. Detección de *Chlamydia* spp. en leucocitos de sangre periférica de ovinos sin aborto previo. Rev Med Vet. 2022;(44): 61-69. Disponible en: <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss44.8>

- 4 Químico bacteriólogo parasitólogo. Alumno investigador del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional.
✉ cmatavite@hotmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4449-1182>
- 5 Licenciada en Biología, maestra en Ciencias. Investigadora del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Perinatología.
✉ diaclaro2000@yahoo.com.mx
ORCID: <http://orcid.org/0000-001-5742-7214>
- 6 Ingeniero Bioquímico. Maestro en Ciencias Químico-biológicas. Doctor en ciencias. Profesor investigador del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional.
✉ jccancinodiaz@hotmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3708-7010>
- 7 Química Bacterióloga Parasitóloga. Maestra en Educación. Profesora investigadora del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional.
✉ sgutiepa@hotmail.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4612-3028>
- 8 Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Maestro en Ciencias Químico-biológicas. Doctor en Biomedicina y Biotecnología Molecular. Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional.
✉ deharoc@yahoo.com.mx
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3258-5608>

exploitation without any previous abortion allows knowing the real prevalence of ewes' enzootic abortion in Mexico.

Keywords: abortion, *Chlamydia abortus*, leukocytes, seroprevalence.

INTRODUCCIÓN

La familia *Chlamydiaceae* corresponde a bacterias Gram negativas intracelulares obligadas que infectan a mamíferos, aves, reptiles y batracios (1). *Chlamydia abortus* (CA) es el agente etiológico de la enfermedad denominada aborto enzootico ovino (AEO) (1). En México, esta enfermedad se consideraba como exótica hasta mayo del 2016. Actualmente, varios estudios seroepidemiológicos han informado de su presencia en diversos estados de la República Mexicana: los más importantes son Tlaxcala, Sonora, Chihuahua, Hidalgo, Chiapas, Querétaro y el Estado de México con una sero-prevalencia de 13,08 %; 12,45 %; 11,56 %; 11,34 %; 10,15 %; 9,69 % y 7,09 %, respectivamente (2-5).

En general, se considera que la vía de la infección primaria es oronasal, seguida de la ingestión de la bacteria (6). Es muy probable que la infección inicial ocurra en las tonsilas, donde probablemente la bacteria se disemina por la sangre y la linfa hacia otros órganos (7). Se ha informado que algunas especies de *Chlamydia* spp. tienen la capacidad de infectar y crecer eficientemente dentro de los macrófagos tanto *in vivo* como en cultivo celular, lo que podría ser el mecanismo de diseminación de la bacteria (7-10). Debido a lo anterior, hay una posibilidad de aislar y detectar esta bacteria mediante cultivo celular y amplificación de ácidos nucleicos.

Cabe señalar que el diagnóstico de AEO presuntivo se puede realizar sobre la base de la historia clínica del rebaño y mediante el examen de las membranas placentarias, si estas se han recuperado (10). Sin embargo, si no han mostrado aborto, es muy difícil saber si los animales están infectados con este patógeno. Para la detección de una infección por *C. abortus* se encuentra disponible una gran variedad de pruebas tanto serológicas, como de detección de antígeno y pruebas moleculares, que pueden confirmar el diagnóstico de aborto debido a la infección por este patógeno (11). Asimismo, la elección de la prueba depende del tipo de muestras que son enviadas al laboratorio de diagnóstico, de la historia clínica del rebaño en cuestión y del tiempo en el que ocurrió el aborto. Esto último puede afectar la viabilidad de la bacteria, por lo que el cultivo celular no podría ser una opción (11).

El análisis serológico ha sido la opción preferida en muchos laboratorios de diagnóstico, en particular la prueba de ELISA (2, 3, 5). Sin embargo, esta prueba tiene baja sensibilidad y especificidad, y tiene la desventaja de indicar una tasa de

exposición, más que una infección activa. Las técnicas de amplificación ácidos nucleicos (TAAN) tienen una sensibilidad y especificidad mayores al 95 % (11, 12). Los protocolos de PCR convencional para la detección de ADN de *C. abortus* se dirigen al ARN ribosomal 16S-23S (12) o a los genes de la proteína polimórfica (pmp) (13). Sin embargo, la detección de este patógeno a partir de muestras vaginales y cervicales, no ha tenido el impacto suficiente en la epidemiología de AEO, debido a la presencia de bajos niveles de ADN de *C. abortus* en ovejas postaborto, durante el aborto o periovulación. También existen reportes en humanos de que la infección por *C. trachomatis* en muchas de las ocasiones se encuentra localizada en las trompas de Falopio, por lo que una prueba de TAAN en muestras vaginales puede llegar a ser negativa (14). Así, el propósito de esta investigación fue estandarizar el cultivo de *C. abortus* en células McCoy, empleando como muestra los leucocitos de sangre periférica y detectando el patógeno mediante PCR o tinción de Giemsa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de ovejas. Las muestras de sangre fueron obtenidas en ovejas de una granja del Estado de Hidalgo, de manejo semiestabulado y con un hato de 54 ovejas. La selección de los animales para la obtención de la sangre se dio de manera aleatoria. Un total de 42 muestras sanguíneas fueron obtenidas de 11 machos y 31 hembras, con más de un año de edad. Aproximadamente, la mitad de las hembras (15) había tenido más de un parto, sin referencia a pérdidas reproductivas. Dentro de la explotación, no se observó arco sanitario. Por el contrario, se mostraba pobre limpieza de los corrales donde habitaban los animales. El único procedimiento médico que se había realizado de manera rutinaria era la desparasitación de los animales cada seis meses.

Muestras de sangre. Se obtuvieron 5 mL de sangre en tubos con EDTA a partir de la vena yugular. Las muestras se transportaron al laboratorio donde se realizó el análisis, en un contenedor frío para evitar la hemólisis. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 Xg, el plasma

fue depositado y dividido en 2 tubos. Un tubo se almacenó a -20°C, y el segundo tubo fue utilizado para el diagnóstico de infección por *C. abortus* mediante la detección de anticuerpos contra este patógeno según el método de ELISA. Por otro lado, los leucocitos fueron recuperados para realizar el cultivo de *Chlamydia abortus* en células McCoy.

Prueba de ELISA. Para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydia abortus* se utilizó la prueba comercial *ELISA ID Screen Chlamydomphila abortus indirect multi-species* (rue Luis Pasteur, Grabels France). Esta prueba utiliza un antígeno sintético procedente de una proteína de la membrana externa (MOMP), que es reconocido por los anticuerpos específicos en la muestra, los cuales son revelados con un conjugado acoplado a HRP. El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocaron 90 µL de diluyente en cada uno de los pozos de la microplaca. Posteriormente, se depositaron 10 µL del control negativo, 10 µL del control positivo y 10 µL de cada una de las muestras por duplicado. La microplaca se incubó a 21°C por 45 minutos. Pasado ese tiempo, se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 300 µL de solución de lavado. Una vez terminados los lavados, a cada pozo se le adicionaron 100 µL de conjugado, y se dejó incubar por 30 minutos a 21°C. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados a cada pozo con la solución de lavado y se adicionaron 100 µL de solución reveladora. La mezcla se incubó a 21°C por 15 minutos y se adicionaron 100 µL de solución de paro para detener la reacción. Finalmente se leyó la microplaca a 450 nm en un lector de ELISA (Elx808, Biotek, Winooski, VT, USA).

Los valores de absorbancia se expresaron como porcentaje. Los valores por encima de 60 % se consideraron positivos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{S}{P} \% = \frac{DO_{muestra}}{DO_{cp}} \times 100$$

Las muestras que presentaron un S/P % se tomaron en cuenta en la siguiente medida:

S/P % \leq 50 % Negativo

50 % < S/P % < 60 % Dudoso

S/P % \geq 60 % Positivas

Cultivo celular. Los leucocitos fueron tratados con una fase de congelación-descongelación, y posteriormente se les adicionó 400 μ l de la solución de PBS y perlas de vidrio para la liberación de las partículas de *Chlamydia*. Para ello, los tubos fueron tratados por agitación en un vortex (MS1 minishaker IKA, Wilmington, USA) durante 2 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante por centrifugación 300 xg. Cincuenta microlitros del sobrenadante fueron depositados en cada pozo por duplicado en una microplaca de 24 pozos que previamente contenía una monocapa confluyente de células McCoy (ATCC CR-1696TM). La microplaca se centrifugó a 500 g por 10 minutos y se incubó a 37° C en atmósfera de CO₂ por 2 horas. Pasado ese tiempo, se eliminó el medio de cultivo y se adicionó 1 ml de medio mínimo esencial suplementado con suero fetal de ternera al 10 %, con antibióticos (estreptomina y gentamicina a una concentración de 1 μ g/ml) y con cicloheximida (1 μ g/ml). La microplaca se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente por 72 h. Finalmente, la monocapa de células McCoy fue obtenida mediante acción mecánica para extracción de DNA y la identificación de *Chlamydia abortus* mediante la técnica de amplificación de ácidos nucleicos.

Tinción de Giemsa. Se cultivaron e infectaron las células McCoy como se describió anteriormente en cubreobjetos redondos estériles. Una vez pasado el tiempo de infección, se lavaron con solución salina para eliminar detritos celulares, y se fijaron con metanol durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron de 4 a 5 gotas del reactivo de Giemsa durante 45 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con agua simple y se montaron en un portaobjetos para ser observados a 40 X y 100 X en un microscopio óptico.

Extracción de ADN. Para la obtención de ADN, las células McCoy infectadas fueron recuperadas mediante

raspado con un scraper y centrifugación a 3000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió en 400 μ L de la solución de lisis (Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 50 mM, SDS 0,2 %, proteinasa K 0,2 mg/mL). Posteriormente, el tubo Eppendorf se colocó en un baño maría a 55°C por una hora, con agitación cada 15 minutos. Seguido de eso, se precipitaron las proteínas con la adición de 400 μ L de fenol y 400 μ L de cloroformo, se centrifugó el tubo 3000 rpm durante 10 minutos, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo al cual se le adicionaron 400 μ L de cloroformo, se agitó el tubo por 1 minuto en vortex, y se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos. Posterior a ello, se recuperó la fase acuosa que se depositó en un tubo nuevo, al cual se le adicionaron 40 μ L de NaCl al 5 M, y 1 mL de etanol absoluto. El tubo se incubó por 30 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 3000 xg durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón ADN fue lavado dos veces por centrifugación con 1 mL de etanol al 70 % frío. Se decantó el sobrenadante y se repitió el lavado. Una vez decantado el último lavado, se dejó secar el botón de ADN y se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas. El ADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

Prueba de PCR. Para la reacción de PCR, se colocaron 12,5 μ L de la Mastermix® (AMPLIQON, Odense, Denmark), 0,5 μ L de los iniciadores previamente reportados por Laroucau y colaboradores (13), CpsiA (5'ATG AAA CAT CCA GTC TAC TGG3') y CpsiB (5'TTG TGT AGT ATT ATT ATC AAA 3'), así como 4,5 μ L de agua y 7 μ L del DNA obtenido, lo cual dio un volumen final de 25 μ L. La reacción que se realizó en un termociclador (MULTIGENE MINILABNET) consta de una temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 50°C por 60 segundos, y extensión a 72°C por 120 segundos. Finalmente se realizó una extensión final de 72°C por 5 minutos. El análisis en gel de agarosa al 1,5 % para observar la presencia de fragmentos de amplificación de ADN se realizó en un transiluminador (MultiImagenTM light cabinet, Alpha Innotech Co. USA). Un amplicon de 300 pb se consideró como la presencia de ADN de *Chlamydia* spp.

RESULTADOS

Detección de *Chlamydia* spp. en leucocitos

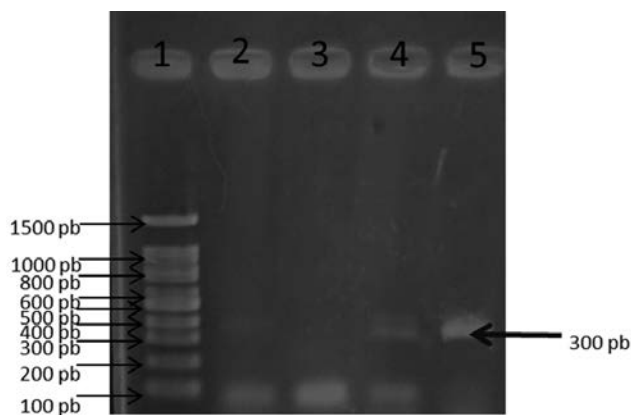
La figura 1 muestra el amplicon de 300 pb que corresponde a la amplificación del gen de la proteína polimórfica de *Chlamydia* spp., lo que confirmó la infección de esta bacteria en los cultivos celulares. Los resultados moleculares mostraron 21 muestras de leucocitos positivas a la infección por este patógeno y 21 muestras negativas (tabla 1), lo que dio un porcentaje de infección activa del 50 % por *Chlamydia* spp. en las muestras analizadas. Cabe señalar que solo en 10 muestras positivas

por PCR se logró identificar la presencia de *Chlamydia* spp. mediante la tinción de Giemsa (figura 2).

Seroprevalencia de *C. abortus* mediante prueba de ELISA

En cuanto a la prueba de ELISA, 22 sueros mostraron anticuerpos IgG anti-*C. abortus*, lo que sugirió la infección por este patógeno. En tres hubo presencia de anticuerpos IgG anti-*C. abortus*; sin embargo, mostraron un valor de absorbencia menor a 0,65 por lo que se considera como una infección dudosa por este patógeno. 17 sueros no mostraron anticuerpos IgG anti-*C. abortus* negativos (tabla 1 y figura 3).

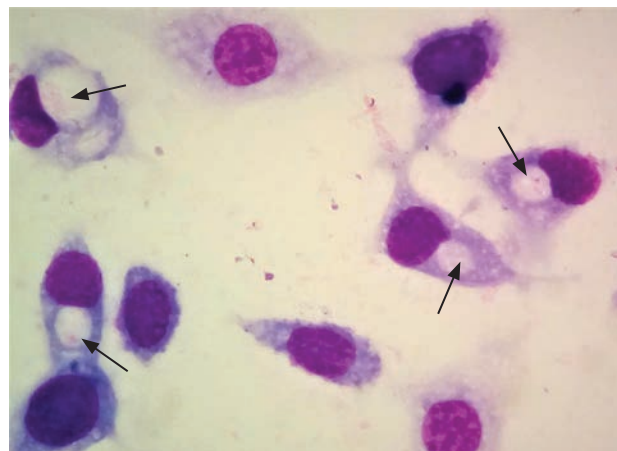
Figura 1. Amplicon del gen pmp-91 de *Chlamydia* spp.



Carril 1: marcador de talla molecular de 100 pb. Carriles 2 y 4: amplicon de 300 pb de un cultivo de células McCoy infectados con leucocitos de ovinos sin datos de aborto previo. Carril 3: DNA de células McCoy. Carril 5: amplicon 300 pb del DNA de *Chlamydia abortus* (ATCC VR-656™)

Fuente: elaboración propia

Figura 2. Células McCoy infectadas con *Chlamydia* spp. (100X)



Nota: Las células McCoy (Elx808, Biotek, Winooski, VT, USA) inoculadas con leucocitos de ovino sin datos de aborto previo, teñidas con May-Grünwald y Giemsa. Las células McCoy infectadas muestran vacuolas en cuyo interior se observan partículas de naturaleza catiónica (flecha)

Fuente: elaboración propia

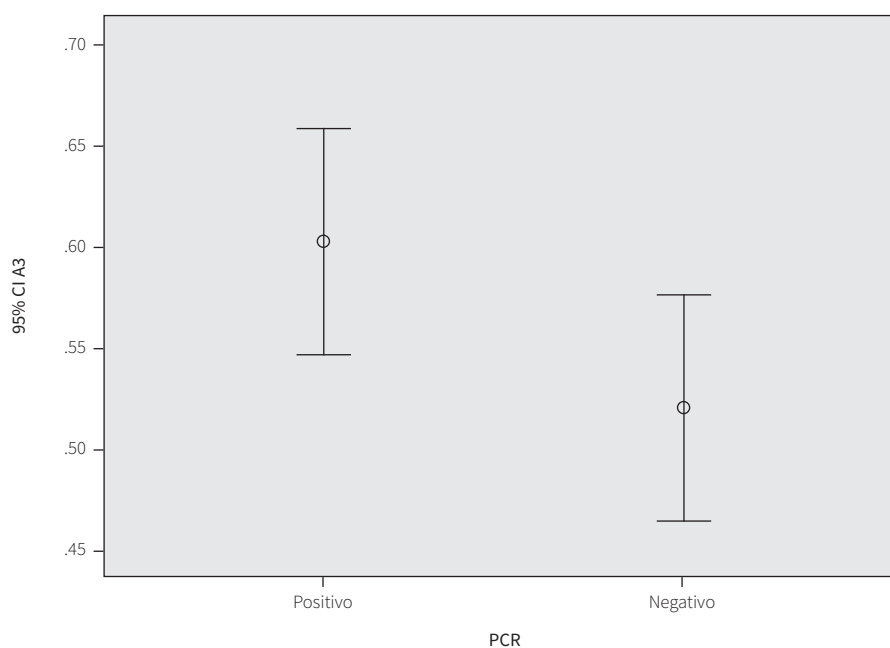
Tabla 1. Porcentaje de ovejas sin reporte previo de aborto infectadas por *Chlamydia* spp.

| | | | ELISA | | | Total |
|-------|----------|----------|----------|--------|----------|---------|
| | | | Positivo | Dudoso | Negativo | |
| PCR | Positivo | Recuento | 14 | 2 | 5 | 21 |
| | | % | 66,7 % | 9,5 % | 23,8 % | 100,0 % |
| | Negativo | Recuento | 8 | 1 | 12 | 21 |
| | | % | 38,1 % | 4,8 % | 57,1 % | 100,0 % |
| Total | | Recuento | 22 | 3 | 17 | 42 |
| | | % | 52,4 % | 7,1 % | 40,5 % | 100,0 % |

Nota: se evaluó la presencia de anticuerpos IgG anti-*C. abortus* por el método de ELISA (ELISA ID Scree *Chlamydophila abortus*, Grables, Francia). Mediante PCR se llevó a cabo la detección de *Chlamydia* spp. a partir de la amplificación de los genes *pmp* en células McCoy infectadas con leucocitos de sangre periférica de ovinos sin reporte previo de aborto.

Fuente: elaboración propia

Figura 3. Valores de absorbencia de los sueros de ovino con evidencia o ausencia de ADN de *Chlamydia* spp.



Nota: Se evaluó la presencia de anticuerpos IgG anti-*C. abortus* por el método de ELISA (ELISA ID Screen *Chlamydophila abortus*, Grables, Francia).

Fuente: elaboración propia

DISCUSIÓN

Los abortos en ovejas por infecciones bacterianas causan pérdidas económicas considerables. Las especies de *Brucella* sp., *Campylobacter fetus* subespecies *fetus*, *C. abortus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* son responsables del aborto en pequeños rumiantes (15). En México, la prueba de ELISA para detección de anticuerpos anti-*C. abortus* es el método más utilizado para el serodiagnóstico de infección por clamidias en los animales; sin embargo, su sensibilidad y especificidad son bajas y solo indica una exposición al patógeno más que una infección activa (2, 3, 5). Debido a lo anterior, un mejor diagnóstico está basado en la detección del ADN, en particular la PCR, que permite la identificación directa a partir de muestras clínicas y la diferenciación de especies (11-13).

En este estudio, se utilizaron los iniciadores reportados por Laroucau y colaboradores (13), quienes reportan que estos amplifican los genes de las proteínas polimórficas (*pmp*) de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. caviae*, y no los genes *pmp* de *C. pecorum*, *C. felis*, *C. pneumoniae* y *C. trachomatis*. La ventaja de estos iniciadores es que aumentan 10 veces más la sensibilidad de la prueba de PCR en comparación con el gen de la proteína principal de membrana externa (*ompA*), al identificar una familia de genes *pmp*, por lo que estos iniciadores son capaces de identificar no solo a *C. abortus*, sino a otras especies de *Chlamydia* (12, 13).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los leucocitos de sangre periférica pueden ser útiles para detectar una infección por *Chlamydia* spp. Diversos estudios han demostrado que los macrófagos son susceptibles a la infección por *Chlamydia* spp. y que estas células pueden ser empleadas para el cultivo de diversas especies de clamidia (8-10). También el uso de sangre directa para la detección de *C. trachomatis* ha sido empleada como una prueba de diagnóstico de infección por esta bacteria en humanos (16, 17). A pesar de lo anterior, una desventaja de este estudio fue no haber llevado a cabo la búsqueda de *Chlamydia* en muestras vaginales para

comparar qué tipo de muestra es mejor, si la sangre o el raspado vaginal, y así poder determinar la sensibilidad y especificidad de la muestra. Sin embargo, se ha descrito que las muestras vaginales o cervicales de ovejas no son adecuadas para hacer el diagnóstico de infección activa por *C. abortus* debido a la baja cantidad de ADN de este patógeno que se ha encontrado en este tipo de muestras, por lo que habría una posibilidad de que las muestras de sangre fueran mejores para detectar una infección crónica por esta bacteria (2, 19).

En cuanto al porcentaje de muestras positivas a la infección por *C. abortus* fue menor al 34 % (14 muestras) cuando fueron analizadas por PCR y serología. Cabe señalar que la serología no fue tan efectiva al no mostrar anticuerpos en cinco muestras que fueron positivas por PCR y a las cuales no se les detectaron anticuerpos anti-*C. abortus*. Sin embargo, la infección podría obedecer a otras especies de *Chlamydia* como *C. psittaci* o *C. caviae*. En 2011, Osman y colaboradores (18) reportaron que la infección por *C. psittaci* en ovejas es muy frecuente, llegando hasta un 25,7 %, en cuyos casos una característica particular de estos animales es la frecuente presencia de diarrea. En este estudio no se reportó información sobre la presencia de diarrea en algún animal del rebaño. En cuanto a la infección por *C. caviae* en ovejas, no existen reportes al respecto; debido a lo anterior, será necesario identificar si estas cinco muestras positivas por PCR y que no mostraron anticuerpos anti-*C. abortus* obedecen a la presencia de ADN de *C. psittaci* o de *C. caviae*.

En cuanto a las muestras negativas por PCR y que mostraron anticuerpos IgG anti-*C. abortus*, su ocurrencia podría obedecer a una infección pasada o a un estado de latencia de la bacteria. Estudios previos han informado que el diagnóstico serológico de AEO se ve limitado por algunos factores, como es el estado de latencia de la propia infección, por el cual permanece sin ser detectada hasta el día 90 de gestación (19), o por una infección con otra especie de clamidia distinta a *C. abortus* como *C. pecorum*, que es frecuente en pequeños rumiantes y que produce artritis (20, 21). En México, la prevalencia de infección por *C. pecorum* en ovejas no se conoce.

Esta reactividad cruzada de los anticuerpos entre las diferentes especies de clamidia por antígenos como el lipopolisacárido o la proteína principal de membrana externa al parecer no ocurre con la prueba de ELISA *ID Screen Chlamydophila abortus* que se empleó en este estudio. El antígeno que utiliza esta prueba de ELISA corresponde a péptidos sintéticos de la proteína principal de membrana externa (MOMP). Lo anterior puede reducir la reactividad cruzada, siempre y cuando estos péptidos muestren un epitope específico para los anticuerpos IgG anti *C. abortus*. A pesar de lo anterior, el proveedor no describe la sensibilidad y la especificidad de la prueba, empleando sueros de animales infectados con otras especies diferentes a *C. abortus*, por lo que habría la posibilidad de que este antígeno sea reconocido por sueros de animales infectados con otras especies de clamidia.

Los animales muestreados fueron del Estado de Hidalgo, una zona donde se ha descrito serología positiva de *C. abortus* hasta en el 11,56 % de los animales (2), por lo que la seropositividad obtenida en este estudio (52,38 %) fue alta comparada con lo reportado en este Estado y como ocurre en algunos otros de la República Mexicana, pero menor a lo reportado para el Estado de Querétaro, que se informa de un 67,18 % (2). Por consiguiente, esta diferencia posiblemente radique en el pequeño número de muestras analizadas en este estudio.

También es importante señalar que el productor no reportó la presencia de abortos, dentro de la explotación y el único procedimiento realizado fue la desparasitación. Además, al ser una explotación semitecnificada, existe la posibilidad de una reactividad cruzada entre los anticuerpos dirigidos contra diversas especies de clamidia como lo sugieren los resultados obtenidos en este estudio con la detección de ADN de *Chlamydia* spp. y los resultados de la serología.

En conclusión, los leucocitos de sangre periférica pueden ser una herramienta útil para identificar una infección crónica por diversas especies de *Chlamydia* en ovejas que no muestran reporte previo de aborto.

REFERENCIAS

1. Cheong HC, Lee CYQ, Cheok YY, Tan GMY, Looi CY, Wong WF. Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. *Microorganisms*. 2019;7(5): 146. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>
2. Palomares REG, Mejía SP, Aguilar RF, de la Cruz CL, Jiménez SH, Leyva CJC, et al. Frecuencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Chlamydia abortus*, en rebaños ovinos en México. *Rev Mex Cienc Pecuarias*. 2020;11(3): 783-794. Disponible en: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5269>
3. Jiménez-Estrada JM, Escobedo-Guerra MR, Arteaga-Troncoso G, López-Hurtado M, de Haro-Cruz MJ, Montes De Oca JR, et al. Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *Am J Anim Vet Sci*. 2008;3(4): 91-95. Disponible en: <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2008.91.95>
4. Soriano-Vargas E, Jiménez-Estrada JM, Salgado-Miranda C, López-Hurtado M, Escobedo-Guerra MR, Guerra-Infante FM. Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *Redvet*. 2011;12(11): 1-6. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111/111104.pdf>
5. Montes de Oca JR, Rodríguez DMC, Aldama FJ. *Chlamydia abortus*. Implicaciones en la veterinaria en el contexto mexicano. *RMAE*. 2021;8(1): 11-13.
6. Longbottom D, Livingstone M, Maley S, van der Zon A, Rocchi M, Wilson K, et al. Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *PLoS One*. 2013;8(2): e57950. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057950>
7. Essig A, Longbottom D. *Chlamydia abortus*: new aspects of infectious abortion in sheep and potential risk for pregnant women. *Curr Clin Micro R*. 2015;2: 22-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40588-015-0014-2>
8. Kuo CC. Cultures of *Chlamydia trachomatis* in mouse peritoneal macrophages: factors affecting organism growth. *Infect Immun*. 1978;20: 439-445. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/iai.20.2.439-445.1978>
9. Guerra-Infante F, García-Zaragoza FJ, Arredondo-García JL. Sensibilidad y especificidad de los macrófagos

- peritoneales de ratón en el diagnóstico de infecciones por *Chlamydia trachomatis*. Rev Latin-Amer Microbiol. 1992;34(1): 7-10.
10. Rajaram K, Nelson DE. *Chlamydia muridarum* Infection of Macrophages Elicits Bactericidal Nitric Oxide Production via Reactive Oxygen Species and Cathepsin B. Infec Immun. 2015;83(8): 3164-3175. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/IAI.00382-15>
 11. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiol. 2009;135(1-2): 2-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>
 12. Everett KD, Andersen AA. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. Int J Syst Bacteriol. 1999;49: 803-813. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-803>
 13. Laroucau K, Trichereau A, Vorimore F, Mahe AM. A pmp genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. Vet Microbiol. 2007;121: 150-157. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.013>
 14. Villagrana ZJR, López HM, Flores SVR, de Haro CMJ, Escobedo GMR, Guerra IFM. Persistence of *Chlamydia trachomatis* in endometrium and peritoneal fluid of infertile patients with negative cervical culture. Ginecol Obstet Mex. 2013;81(1): 23-28.
 15. Menzies PI. Causes of infectious abortion in sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2011;27(1): 81-93. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.011>
 16. López-Hurtado M, Cuevas-Recillas KN, Flores-Salazar VR, Guerra-Infante FM. *Chlamydia trachomatis* DNA in leukocytes of peripheral blood from neonates. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;33(7): 458-463. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.019>
 17. Cirino F, Webley WC, West C, Croteau NL, Andrzejewski C, Stuart ES. Detection of *Chlamydia* in the peripheral blood cells of normal donors using in vitro culture, immunofluorescence microscopy and flow cytometry techniques. BMC Infect Dis. 2006;6: 23. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-23>
 18. Osman KM, Ali HA, ElJakee JA, Galal HM. *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt. Rev Sci Tech. 2011;30(3): 939-948. Disponible en: <https://doi.org/10.20506/rst.30.3.2088>
 19. Buxton D, Barlow RM, Finlayson J, Anderson IE, Mackellar A. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. J Comp Pathol. 1990;102: 221-237. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80127-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80127-2)
 20. Anderson IE, Baxter SI, Dunbar S, Rae AG, Philips HL, Clarkson MJ, et al. Analyses of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. Int J Syst Bacteriol. 1996;46(1): 245-251. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-245>
 21. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol. 2003;128(4): 217-244. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>