



Boletín Veterinario Oficial

Sanidad y bienestar animal e inocuidad de los alimentos
División de Protección Pecuaria



Aborto enzoótico ovino (AEO) en Chile Implementación de técnicas de laboratorio

María Esther Saldías, MV¹, maria.saldias@sag.gob.cl
Claudio Lecocq, MV¹, claudio.lecocq@sag.gob.cl
Manuel Quezada, MV², mquezad@udec.cl
Claudia Ávila, BQ³, claudia.avila@sag.gob.cl
Maria José Segovia, MV¹, mjsegovia@sag.gob.cl

Agradecimientos

Por su cordialidad y prontitud en la obtención de los resultados, agradecemos al **Dr. Konrad Sachse**, Head of the OIE Reference Laboratory for Chlamydiosis Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Institute of Molecular Pathogenesis, Jena, Germany.



Resumen

El aborto enzoótico ovino (AEO) es una enfermedad causada por la bacteria *Chlamydomphila abortus*. Se caracteriza por provocar abortos en las últimas 2 ó 3 semanas de gestación y, junto con la pérdida de las crías, provoca placentitis. Además, la infección puede provocar nacidos débiles que sobreviven no más de 48 horas (OIE, 2012).

El diagnóstico del AEO se puede realizar por aislamiento o detección del ácido nucleico del agente, mediante técnicas de biología molecular aplicadas a los productos del aborto o excreción vaginal de las hembras afectadas (OIE, *op. cit.*).

Desde el año 2000 existe evidencia serológica en Chile de la presencia de la enfermedad en distintas regiones, diagnóstico confirmado por el laboratorio de referencia de la OIE para la enfermedad, Friedrich-Loeffler-Institut.

Dada la importancia de esta enfermedad se implementaron en el laboratorio del Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, las técnicas PCR convencional y en tiempo real, confirmándose la presencia de *Chlamydomphila abortus*.

¹ Subdepartamento de Laboratorio y Estación Cuarentenaria Pecuaria. Servicio Agrícola y Ganadero.

² Departamento de Patología y Medicina Preventiva. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción.

³ Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria: Unidad de Biotecnología. Servicio Agrícola y Ganadero.

1. Introducción

De acuerdo a la genética molecular, actualmente la familia Chlamydiaceae está conformada por dos géneros y nueve especies (OIE, 2012; Sachse *et al.*, 2009), lo cual se basa en los análisis de secuencia de los genes rRNA 16S y 23S, y *ompA*, que codifican la mayoría de las proteínas de membrana externa.

Chlamydiaceae	
<i>Chlamydia suis</i> (cerdos)	<i>Chlamydophila abortus</i> (ovinos, caprinos, bovinos)
<i>C. muridarum</i> (ratones y hámsters)	<i>Cp. felis</i> (gatos)
<i>C. trachomatis</i> (humanos)	<i>Cp. psittaci</i> (aves)
	<i>Cp. caviae</i> (cobayos)
	<i>Cp. pecorum</i> (ovinos y bovinos)
	<i>Cp. pneumoniae</i> (humanos)

El agente infeccioso del aborto enzoótico de ovejas y cabras, también denominado aborto enzoótico ovino (AEO), es la bacteria *Chlamydophila abortus*. Esta enfermedad representa la causa más importante de pérdidas de corderos en diversos países de Europa, Norteamérica y África, lo cual produce un fuerte impacto económico en las áreas afectadas. Además presenta potencial zoonótico y puede afectar con una enfermedad febril a la mujer embarazada y pérdida del feto (Sachse *et al.*, *op. cit.*).

AEO se caracteriza por provocar abortos dos a tres semanas previas a la fecha de parto y, junto con la pérdida de las crías, provoca placentitis; también puede provocar nacidos débiles que no sobreviven más de 48 horas (OIE, 2012). Las ovejas que abortan son resistentes a fallas reproductivas futuras debidas a *Cp. abortus*; sin embargo, son portadoras y diseminan la bacteria permanentemente a través del tracto reproductivo, en subsecuentes gestaciones (Soriano-Vargas *et al.*, 2011).

Las cepas aviarias de *Chlamydophila psittaci* causan psitacosis u ornitosis, una enfermedad septicémica aguda, crónica o que presenta manifestaciones subclínicas en psitácidos domésticos y silvestres (loros, papagayos). La infección es transmitida a humanos, los síntomas son poco específicos, similares a un cuadro de influenza, y pueden originar neumonía, endocarditis y encefalitis (Sachse *et al.*, *op. cit.*).

En bovinos se han encontrado *Chlamydophila pecorum*, *Cp. abortus* y *Cp. psittaci* en afecciones del tracto respiratorio y del aparato genital, y pueden causar además enteritis, artritis y encefalomiелitis (Sachse *et al.*, *op. cit.*).

En el hombre, las clamidias son responsables de diversas enfermedades, como el tracoma, enfermedad de transmisión sexual producida por *Chlamydia trachomatis* y enfermedades respiratorias y cardiovasculares, producidas por *Chlamydophila pneumoniae*.



Como las clamidias son bacterias intracelulares, requieren cultivos de tejidos para ser aisladas y propagadas. Éstos se realizan en líneas celulares y huevos embrionados, por lo que es necesario demostrar la viabilidad de la bacteria lo cual facilita la caracterización molecular y la aplicación de métodos bioquímicos.

El cultivo es considerado el “gold standard” en el diagnóstico de clamidias; sin embargo, hay dificultades asociadas a esta técnica lo que ha llevado al desarrollo de una gran variedad de métodos de detección, como la determinación de anticuerpos o detección del ADN (Sachse *et al.*, 2009).

En síntesis, esencialmente existen dos formas de aproximación al diagnóstico de infecciones por clamidias en aves y mamíferos (Sachse *et al.*, *op. cit.*):

- Detección de anticuerpos anti-clamidias mediante métodos serológicos de screening; por ejemplo, ELISA y test de anticuerpos fluorescentes, los que demuestran solo la presencia del agente y no permiten la identificación de las especies y serotipos o subtipos respectivos.
- Detección directa del agente en tejidos o tómulas mediante cultivos y técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de biología molecular. Sin embargo, una de las mayores desventajas del cultivo es que se requiere de una adecuada toma y transporte de la muestra, que asegure la viabilidad del microorganismo. Además, se requiere considerar otros aspectos como:
 - dependiendo del tipo de muestra y del método empleado, los tejidos podrían contaminarse con otras bacterias Gram negativas que pudieran dar reacciones falsas positivas y un diagnóstico incorrecto;
 - el manejo de los cultivos consume tiempo y requiere experiencia;
 - existe riesgo zoonótico asociado a *Chlamydia* spp.

2. Descripción de los casos registrados en el país

En Chile desde el año 2000 existe evidencia serológica de la presencia de aborto enzoótico en cabras, el cual ha sido detectado mediante ELISA indirecto y confirmado por fijación del complemento.

En el año 2010 ocurrieron abortos en caprinos de la Región de Atacama y mediante serología por técnica ELISA-I se reveló la presencia de anticuerpos para *Chlamydia abortus*. Desde uno de los fetos abortados se obtuvieron muestras de placenta, pulmón e hígado, las cuales se fijaron en formalina al 10% y se procesaron en el Laboratorio de Patología del SAG⁴. Se utilizó un procesador TP 1020 con bomba de vacío y un centro de inclusión Leica EG 1160.

⁴ Subdepartamento de Laboratorio y Estación Cuarentenaria Pecuaria. Servicio Agrícola y Ganadero.

Los bloques de parafina obtenidos se enviaron al laboratorio de referencia de la OIE⁵ para clamidiosis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health, [Institute of Molecular Pathogenesis](http://www.oie.int/es/), Jena, Alemania), donde fue confirmado el diagnóstico de aborto enzoótico y se identificó *Chlamydophila pecorum* mediante las técnicas de PCR tiempo real y microarreglos.



Durante el año 2012 se presentaron varios eventos de abortos en el país; uno de los primeros focos ocurrió en un predio de la Región Metropolitana, desde donde se tomaron muestras serológicas que fueron analizadas en la Unidad de Bacteriología del Laboratorio del SAG, mediante ELISA-I. De un total de 272 muestras, 117 resultaron positivas. La confirmación se realizó por fijación del complemento, cuyos resultados fueron títulos mayores a 1/32. Al respecto, la OIE señala que títulos mayores o iguales a dicho valor son indicativos de la presencia de *Chlamydophila abortus*.



Caprinos abortados, Región Metropolitana, 2012

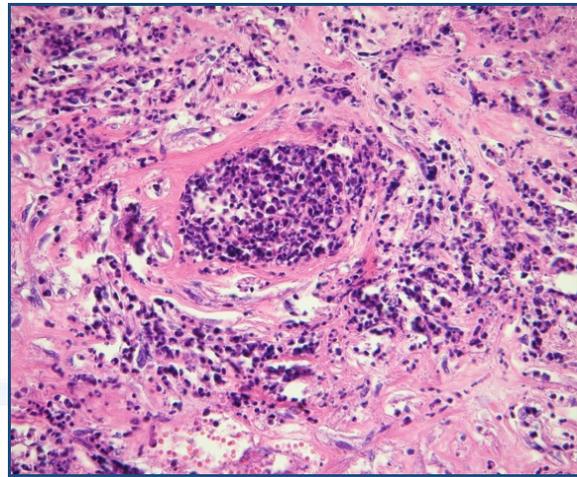
Posteriormente, en la Unidad de Patología se fijaron en formalina e incluyeron en parafina muestras de placenta, hígado y pulmón de un feto abortado, a fin de enviarlas al laboratorio de referencia para su confirmación. También se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor mediante un micrótopo de rotación Leica RM 2145 y se tiñeron con hematoxilina eosina según metodología estándar.

⁵ Organización Mundial de Sanidad Animal <www.oie.int/es/>. [Ver laboratorios de referencia de la OIE.](#)



Placenta 400x

Infiltrado inflamatorio en tejido y pared de vaso sanguíneo.
Caso N° 3.226 (Unidad de Patología)



Placenta 400x

Infiltrado inflamatorio en tejido.
Caso N° 417 (Unidad de Patología)

Los resultados del laboratorio de referencia confirmaron por primera vez la presencia de *Chlamydophila abortus* en Chile; se empleó PCR tiempo real para *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* y *Cp. psittaci* y se observó amplificación sólo para *Cp. abortus* en los tres tipos de tejidos analizados (placenta, hígado y pulmón).

Otro de los focos ocurridos en 2012, con múltiples abortos, se presentó en un predio de la Región del Biobío, donde se tomaron muestras serológicas que se analizaron mediante ELISA-I en el Laboratorio Pecuario del SAG. Éstas resultaron reaccionantes por lo cual se tomaron muestras de los fetos abortados para histopatología; se encontraron lesiones inflamatorias de la placenta, se fijaron en formalina e incluyeron en el Laboratorio de Patología de la Universidad de Concepción. Las muestras se enviaron al laboratorio de referencia y resultaron positivas a *Chlamydophila abortus*.

Muestra		PCR tiempo real	
		<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydophila abortus</i>
417-418/12a	12G2237	Pos (Ct 31,4)	Pos (Ct 31,2)
417-418/12b	12G2238	Pos (Ct 35,1)	Pos (Ct 35,1)
417-418/12c	12G2239	Pos (Ct 31,7)	Pos (Ct 31,9)



Cotiledones placentarios inflamados, Región del Biobío, 2012

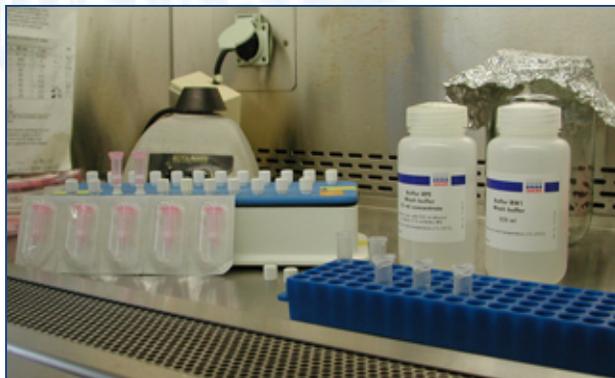
3. Material y métodos

Dada la importancia del aborto enzoótico, se detectó la necesidad de implementar la técnica **PCR convencional** y obtención del ADN correspondiente en el Laboratorio de Bacteriología Pecuaria del SAG. Para ello se utilizó placenta fresca de un aborto caprino ocurrido en la Región de Atacama, el año 2012.

La extracción del ADN se realizó según protocolos de las marcas Qiagen y Roche, utilizando un disruptor celular marca BioSpec® y perlas de zirconia/silica BioSpec®. Posteriormente la PCR se realizó según lo indicado por Ortega *et al.* (2007) y se utilizaron partidores Cpsi A y Cpsi B para amplificar la secuencia del gen *pmp*.

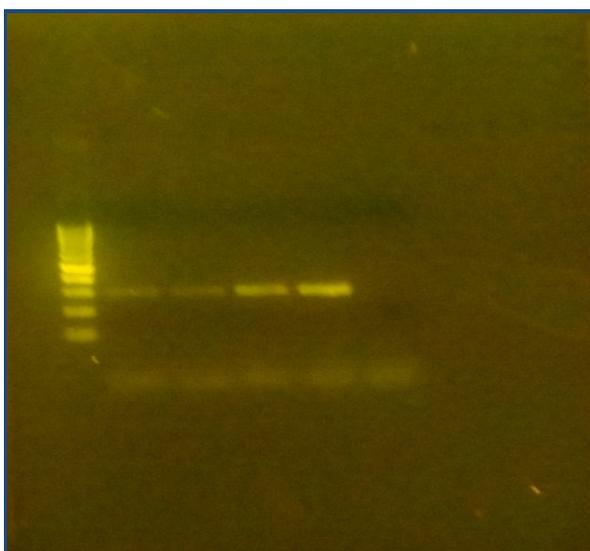
Los controles positivos de *Chlamydophila abortus*, *Cp. pecorum* y *Cp. psittaci* fueron donados por el laboratorio de referencia alemán, Friedrich-Loeffler-Institut.

Posteriormente se implementó en la Unidad de Biotecnología del Laboratorio del SAG, la técnica **PCR tiempo real** para discriminar entre *Cp. abortus* y *Cp. psittaci*, utilizando partidores y sondas según lo indicado por Pantchev *et al.* (2009).



4. Resultados y discusión

Mediante PCR convencional, en el Laboratorio de Bacteriología Pecuaria se amplificó una banda de 300 pb. Esta muestra de ADN se envió además al laboratorio de referencia para su identificación exacta, ya que los partidores utilizados no discriminaron entre *Chlamydomphila abortus* y *Cp. psittaci*, debido a la estrecha relación genética de ambas especies (Pantchev *et al.*, 2009).



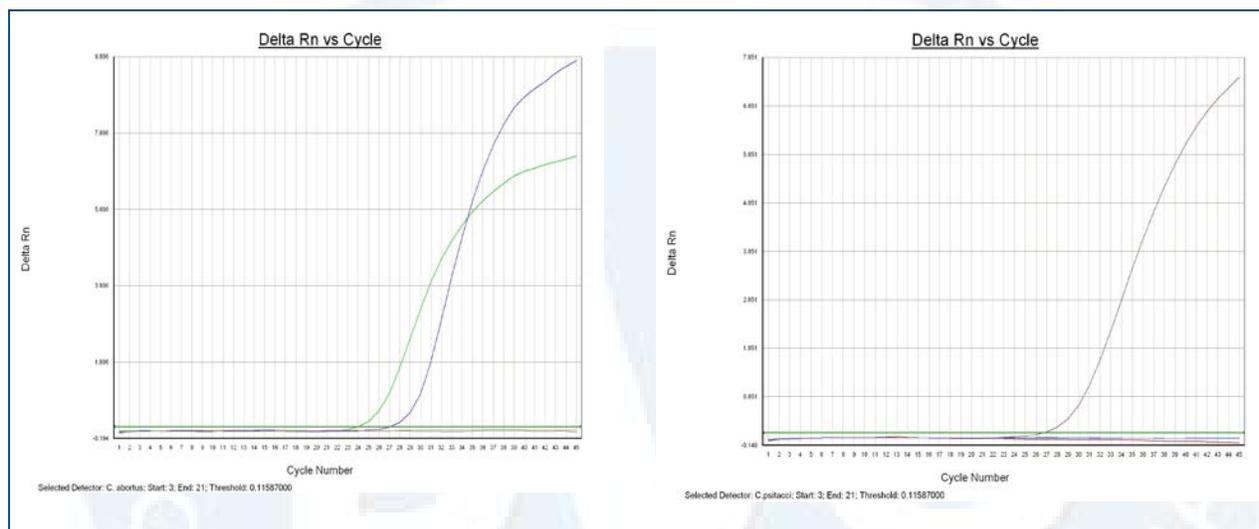
PCR convencional *Chlamydomphila* sp.
1, 2, 3: muestras de placenta
4: control positivo *Chlamydomphila abortus*
5: control negativo



Termociclador - PCR convencional

Posteriormente en la Unidad de Biotecnología del laboratorio SAG, se detectó *Chlamydophila abortus* mediante PCR tiempo real en la muestra de placenta fresca (Protocolo 5990), sin interferencia con *Cp. psittaci*:

Muestra	<i>Cp. abortus</i> (Ct)	<i>Cp. psittaci</i> (Ct)
Protocolo 5990	Pos 24,0	-
Control positivo <i>Cp. abortus</i>	Pos 27,1	-
Control positivo <i>Cp. psittaci</i>	-	Pos 26,8



PCR tiempo real

A

Detección de *Chlamydomphila abortus*
Azul: control positivo *Cp. abortus*
Verde: muestra 5990

B

Detección de *Chlamydomphila psittaci*
Rojo: control positivo *Cp. psittaci*
No se observa amplificación de la muestra 5990.

Mediante PCR tiempo real, los resultados obtenidos en el laboratorio de referencia alemán confirmaron la presencia de *Cp. abortus* y descartan *Cp. psittaci* y *Cp. pecorum*:

Muestra	<i>Chlamydiaceae</i>	PCR tiempo real			
		<i>Chlamydomphila</i>			
		<i>abortus</i>	<i>pecorum</i>	<i>psittaci</i>	
5990-1	12G2418	Pos (Ct 28,7)	Pos (Ct 29,8)	Neg	Neg
5990-2	12G2419	Pos (Ct 28,1)	Pos (Ct 29,5)	Neg	Neg
5990-3	12G2420	Pos (Ct 28,2)	Pos (Ct 29,0)	Neg	Neg

En síntesis, se confirmó la presencia en Chile de *Chlamydophila abortus* mediante evidencia serológica y por detección molecular, lo cual fue ratificado por el laboratorio de referencia de la OIE, Friedrich-Loeffler-Institut.

5. Bibliografía

- Ortega N., Navarro L., Buendía A., Caro M., Del Río L., Martínez C., Cuello F., Salinas J. & Gallego M. 2007. Evaluation of *Chlamydophila abortus* DNA protocols for polymerase chain reaction diagnosis in paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:421-425.
- OIE. 2012. Aborto Enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 2.7.7. Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. [En línea] <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.07_Aborto_enz_ovejas.pdf> [Consulta: mayo 2014].
- OIE. 2014. Infección por *Chlamydophila abortus* (aborto enzoótico de las ovejas, clamidiosis ovina). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. [En línea] <http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_chlamydophila_abortus.htm> [Consulta: mayo 2014].
- Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J. & Sachse K. 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *The Veterinary Journal* 181:145–150.
- Pantchev 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. [Resumen en línea] <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957109000447>> [Consulta: mayo 2014].
- Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A. & Longbottom D. 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*. 135:2–21.
- Soriano-Vargas E., Jiménez-Estrada J.M., Salgado-Miranda C., López-Hurtado M., Escobedo-Guerra C., Fernando M. & Guerra-Infante F. 2011. Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *REDVET* 12(11), 6 pp. [En línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111/111104.pdf>> [Consulta: mayo 2014].