

***Chlamydophila abortus* en ganado lechero de la zona norte de Heredia y
Alajuela, Costa Rica**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Vicedecano: Dr. Rafael Ángel Vindas Bolaños

Firma: _____

Directora: Dra. Laura Castro Ramírez

Firma: _____

Tutora: Dra. Gaby Dolz Wiedner

Firma: _____

Co-tutor: Jaime Murillo Herrera

Firma: _____

Lector: Dr. Juan José Romero Zúñiga

Firma: _____

Lector: Dr. Alejandro Alfaro Alarcón

Firma: _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A mis maravillosos padres, Martha y Martín.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, que sin él nada soy.

Y a todas las personas que me desearon éxito en este proyecto y me colaboraron de una u otra forma.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia y epidemiología	1
1.2 Taxonomía y etiología	2
1.3 Patogénesis, sintomatología y patología	5
1.4 Diagnóstico	7
1.6 Justificación	8
1.7 Hipótesis	10
1.8 Objetivos	10
<i>1.8.1 Objetivo general</i>	10
<i>1.8.2 Objetivos específicos</i>	10
2 MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Tipo de estudio y población de referencia	11
2.2 Tamaño de la muestra	11
2.3 Toma de muestras	13
2.4 Toma de datos	14
2.5 Diagnóstico serológico	15
2.6 Diagnóstico Molecular	16
<i>2.6.1 Extracción de ADN</i>	16
<i>2.6.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	16
3 RESULTADOS	18
4 DISCUSIÓN	25
5 CONCLUSIONES	29
6 RECOMENDACIONES	30
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
8 ANEXOS	35
8.1 Entrevista a los productores	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de animales a analizar dentro de cada finca, calculado según fórmula de Cannon y Roe (1982), mediante Win Episcopo 2.0 (10% prevalencia esperada y 95% nivel de confianza).....	12
Cuadro 2. Características generales de las 24 fincas incluidas en el estudio.....	18
Cuadro 3. Resultado de la encuesta realizada a 24 hatos bovinos de la zona norte de Heredia y Alajuela para determinar factores de riesgo para la transmisión de <i>C. abortus</i>	20
Cuadro 4. Valores S/P agrupados por categorías, obtenidos de las muestras bovinas de la zona norte de Heredia y Alajuela, analizadas en el 2012 mediante ELISA para detección de anticuerpos contra <i>C. abortus</i>	22
Cuadro 5. Resultados de los exámenes serológicos y moleculares, historial de mastitis y preñez de 22 de los animales que presentaron $S/P \geq 22$ en el primer análisis con ELISA.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas entre las especies de clamidias según la clasificación de Everett de <i>Chlamydiaceae</i> y comparación con especies de clamidias reconocidas antes de 1999 (Li. et al, 2008)	3
Figura 2. Ciclo de desarrollo de las clamidias (Longbottom y Coulter, 2003)	5
Figura 3. Potencial zoonótico de los patógenos animales (Longbottom y Coulter, 2003)....	9
Figura 4. Distribución de 608 sueros bovinos de la zona norte de Heredia y Alajuela según los valores S/P obtenidos en el ELISA para detección de anticuerpos contra <i>C. abortus</i> . Línea intermitente: punto de corte negativo, línea continua: punto de corte positivo, en medio de ambas líneas, muestras sospechosas.	21
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR anidado para <i>Chlamydophila spp.</i> (M: marcador molecular; C+: control positivo; 1: muestra positiva 2, 3, 4 muestras negativas a <i>Chlamydophila spp.</i>	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN: Ácido Ribonucleico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

CE: Cuerpo Elemental

CR: Cuerpo Reticulado

ELISA: Ensayo Inmuno-enzimático (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay)

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria

MEM: Medio Esencial Mínimo (Minimum Essential Medium)

MOMP: Principal Proteína Externa de Membrana (Major outer-membrane protein)

OD: Densidad Óptica (Optical Density)

OIE: Oficina Internacional de Epizootias/Organización Mundial de Salud Animal

PC: Promedio de Controles Positivos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

S/P: Positividad de la Muestra (Sample-to-Positive)

TMB: Tetrametilbenzidina

UNA: Universidad Nacional

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue establecer la presencia de *Chlamydophila abortus* en las fincas lecheras de la zona norte de Heredia y Alajuela mediante la determinación de anticuerpos. Para esto se analizaron 608 sueros de bovinos especializados en producción de leche, mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), las muestras fueron recolectadas durante el 2012 en 24 fincas de la zona. Solamente un animal resultó positivo y otros dos sospechosos, mientras el resto (n= 605) fueron negativos. En el 2013 a un total de 22 animales con valores S/P mayores a 22% en el ELISA, se les tomaron muestras de leche, sangre e hisopados para análisis mediante la PCR, resultando únicamente un hisopado vulvar positivo para *Chlamydophila sp.*; además, se les repitió el ELISA y todas las muestras resultaron negativas. Al analizarse la información recaudada de las fincas, de los animales y los resultados obtenidos se concluye que *C. abortus* no está presente en forma significativa (menos de 0.5%) en las fincas lecheras de la zona norte de Heredia y Alajuela, Costa Rica.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish the presence of *Chlamydophila abortus* in milk farms in the north of Heredia and Alajuela by determining antibodies. For this study, 608 serum samples of dairy cattle were analyzed by immunosorbent assay (ELISA). The samples were collected during the last semester of 2012 in 24 farms; Only one animal yielded positive results, two animals reacted weak positive, whereas the rest (n=605) were negative. In 2013, milk, blood and swab samples from 22 animals with Sample-to-Positive (S/P) values more than 22% in the ELISA were taken PCR analysis, only one vulvar swab positive was amplified for *Chlamydophila sp.*, therefore, ELISA was repeated, however all samples yielded negative S/P values. The analyses of the collected information of the farms, animals and laboratory results allow us to conclude, that *C. abortus* doesn't have a significant presence (less than 0.5%) in the milk farms in the Northern area of Heredia and Alajuela, Costa Rica.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Historia y epidemiología

El aborto epizoótico bovino producido por *Chlamydophila abortus* es una enfermedad importante en los continentes europeo y asiático (Gibson da Silva et al., 2006). Ha sido reportado en Francia (Giroud, 1957), Alemania (Schoop et al., 1965), España (Blanco, 1969), el Reino Unido (Holliman et al., 1994) y el subcontinente indio (Nanda et al., 1992). En Estados Unidos, se realizó el primer aislamiento de la bacteria de la familia Chlamydiaceae de un aborto bovino (Storz et al., 1960). Hasta en el 2001 se reportó el primer caso de aborto clamidial bovino en Graubunden, Suiza; simultáneamente, se reportó en esta región, la primera infección zoonótica y primer aborto en humanos por infección con *C. abortus*, cuya transmisión fue por medio de material abortivo caprino (Borel et al., 2006).

En el continente americano, las investigaciones en torno a este agente son escasas. En México y en la mayoría de los países de Centroamérica y Suramérica, las investigaciones se han limitado a determinar la presencia de anticuerpos contra este agente en las producciones caprinas u ovinas y en uno que otro caso aislaron el mismo de material abortivo (Gibson da Silva et al., 2006; Soriano et al., 2011; Lazcano et al., 2012). En cuanto a Norteamérica, en el pasado (1966-1988) se reportaron múltiples casos de abortos bovinos por clamidia diagnosticados mediante la prueba de fijación de complemento y aislamientos del agente (Storz, 1971; Schachter et al., 1974; Shewen, 1980; Papp et al., 1996), pero en la actualidad se encuentran pocos datos referentes a la prevalencia de *C. abortus* en las poblaciones bovinas.

Son pocos los estudios que se han realizado en la población bovina, probablemente, debido a que el aborto por clamidia en el ganado vacuno no se ha considerado como una amenaza importante para la industria ganadera. Aunque la enfermedad es similar al aborto enzoótico de las ovejas, el aborto clamidial, en el ganado bovino y en otras especies como cerdos, es mucho más esporádico y menos común que la enfermedad en ovejas y cabras (Griffiths et al., 1995). Sin embargo, algunos estudios demuestran prevalencias significativas de este agente en poblaciones bovinas de distintas regiones del mundo como 37,5% en Taiwan (Wang et al., 2001), 51.9% en Brasil (Igayara-Souza et al., 2004), 51,3% en Polonia (Niemczuk, 2005), de 4,7 a 12,6% en Turquía (Gokce et al., 2007), 100% en Alemania (Biesenkamp-Uhe et al., 2007; Petit et al., 2008), y 28% en Suecia (Godin et al., 2008).

En Costa Rica, las investigaciones relacionadas con el orden Chlamydiales se enfocan, por el momento, en otras especies como las aves, ya que los problemas reproductivos del ganado, hasta la fecha, se han atribuido a otros agentes importantes como lo son el virus de la diarrea viral bovina (Murillo et al., 2005) y *Neospora caninum* (Romero et al., 2005), entre otros.

1.2 Taxonomía y etiología

C. abortus, anteriormente, conocida como *Chlamydophila psittaci* serotipo 1; cambió de nomenclatura basado en el análisis de los genes 16S Y 23S rRNA (Gibson da Silva et al., 2006). Los estudios sugieren que *C. psittaci* y *C. abortus* tienen un ancestro común, pero son especies diferentes, debido a sus grandes diferencias con relación a patogenicidad, reasociación ADN-ADN y secuencia genómica, entre otros (Van Loock et al., 2003). Este agente pertenece al reino de las bacterias, phylum Chlamydiae, orden Chlamydiales, familia

Chlamydaceae, y género *Chlamydiophila/Chlamydia* (Everett y Andersen, 1999; Everett et al., 1999).

En 1999, Everett introduce un nuevo género (*Chlamydophila*) en la familia Chlamydiaceae en el cual se reagrupan seis especies (Figura 1). Esto basado en el tamaño del genoma, la similitud de la secuencia de los genes ARNr 16S y 23S, reasociación ADN-ADN, similar codificación de secuencia, y número de operones ribosomales. Se cree que las nuevas especies divergieron de las especies existentes, basándose en las diferencias que existen entre ellas, en relación con el tropismo por hospedador. Si bien esta clasificación ha encontrado una amplia aceptación, algunos investigadores encuentran controversial la división de este género y argumentan que la evidencia biología existente contradice la separación de este género (Schachter et al., 2001; Li. et al, 2008).

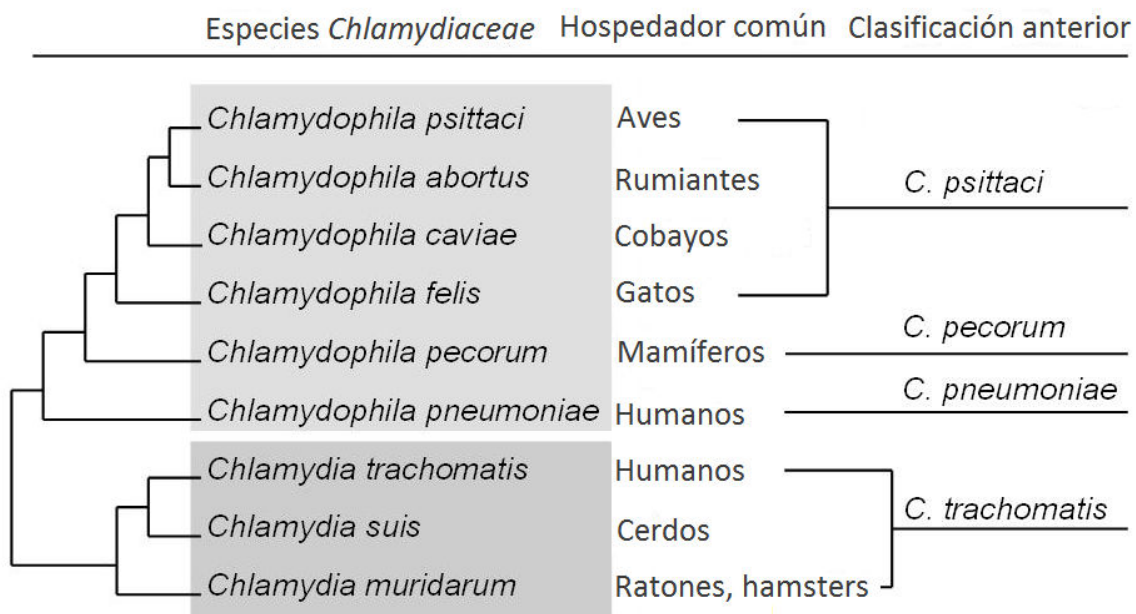


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre las especies de clamidias según la clasificación de Everett de *Chlamydiaceae* y comparación con especies de clamidias reconocidas antes de 1999 (Li. et al, 2008)

Las clamidias son bacterias gram-negativas, intracelulares obligadas, con un ciclo de vida que alterna entre la forma extracelular infectante (cuerpos elementales, CE) y la forma intracelular no infectante, metabólicamente activa (cuerpos reticulados, CR) (Schachter y Caldwell, 1980). El ciclo inicia cuando el CE infecta una célula susceptible induciendo su propia endocitosis; luego, los pequeños CE se transforman en grandes CR y se reproducen por medio de fisión binaria (Ward, 1988; Moulder, 1991). Después de 24 a 48 horas, y varios ciclos de fisión binaria, dependiendo de la especie, el CR se reorganiza nuevamente en el metabólicamente inactivo e infeccioso CE, que se liberará durante la lisis de la célula huésped y pasará a invadir células vecinas (Figura 2). La parte central del ciclo de replicación es similar al de otras bacterias, excepto que el crecimiento y la división celular de las clamidias se limitan a un medio ambiente intracelular. El principio y el final del ciclo, sin embargo, son los que hacen a las clamidias únicos. El CE se caracteriza por su resistencia tanto a los factores físicos y químicos del medio ambiente extracelular, así como por su falta de actividad metabólica (Longbottom y Coulter, 2003). Las clamidias liberadas al medio ambiente por células de animales infectados son resistentes a la actividad proteolítica de ciertas enzimas y pueden sobrevivir en materiales fecales secos por varios meses. Sin embargo, el alto contenido de lípidos de su pared celular los hace susceptibles a la acción microbicida de los detergentes, solventes orgánicos y de otros desinfectantes (Perez y Storz, 1987).

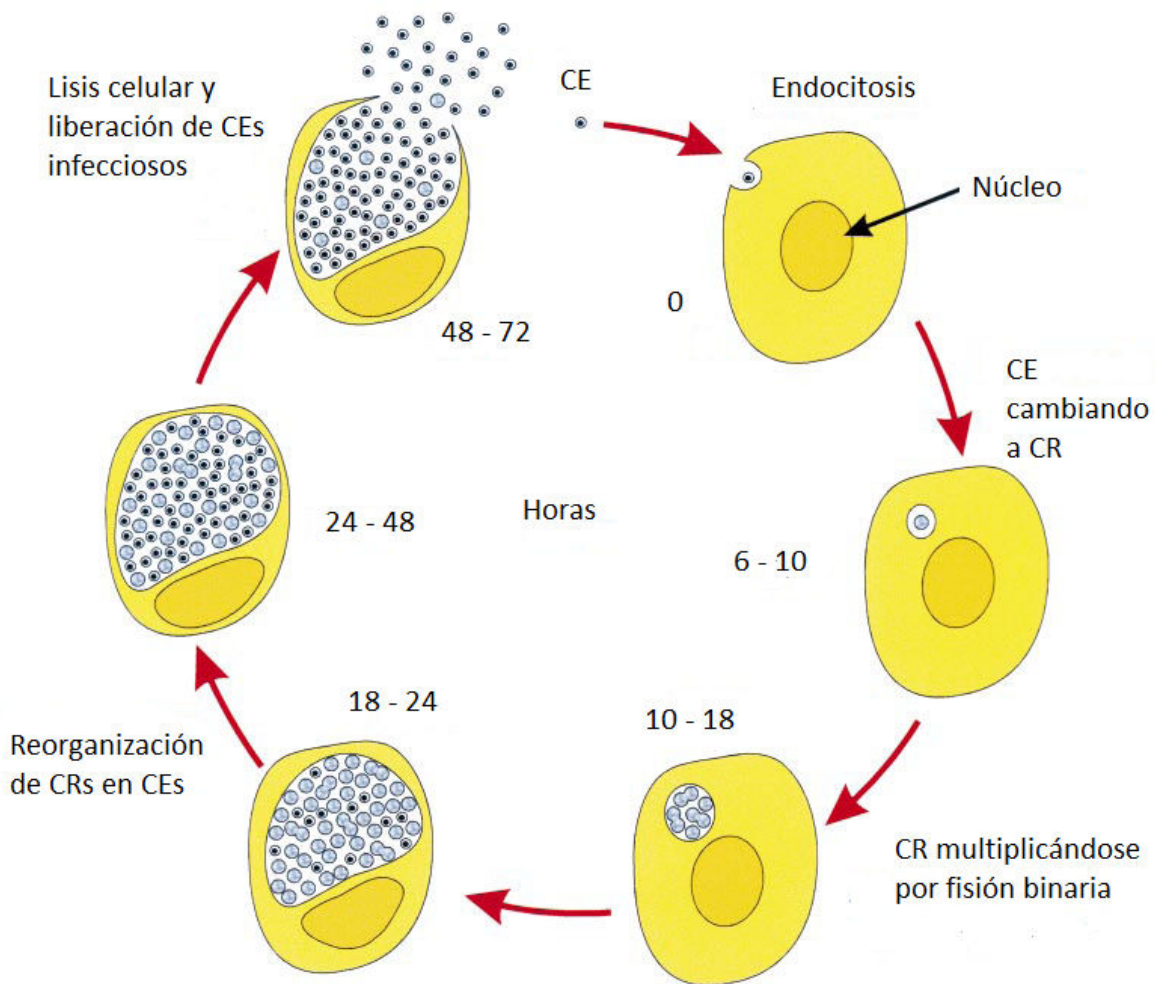


Figura 2. Ciclo de desarrollo de las clamidias (Longbottom y Coulter, 2003).

1.3 Patogénesis, sintomatología y patología

C. abortus causa múltiples síntomas que son inespecíficos y se pueden asociar con otros agentes infecciosos. Dentro de la sintomatología, se puede encontrar: repetición de celos en intervalos irregulares, aumento del intervalo entre partos, aumento de servicios o inseminaciones (Shewen, 1980; Wittenbrink et al., 1993), retención de placenta, endometritis, vaginitis, metritis, abortos esporádicos en las últimas dos o tres semanas de

gestación, partos prematuros y muerte fetal (Godin, 2008). Las vacas con infección por *C. abortus* pueden dar a luz animales muy débiles, con sintomatología respiratoria inespecífica o encefalitis (Longbottom y Coulter, 2003; Godin, 2008); también pueden sufrir mastitis clínica o subclínica (Jee et al., 2004; Biesenkamp-Uhe et al., 2006).

Los animales pueden infectarse con *C. abortus* por contacto directo e indirecto, ya que el agente se elimina en grandes cantidades en el feto, la placenta, las descargas uterinas y las secreciones genitales y conjuntivales (Longbottom y Coulter, 2003). Comúnmente, la transmisión ocurre por la contaminación directa de la comida con secreción conjuntival o genital, siendo esta la ruta más importante. Una vez ingeridos los CE, se propagan en sangre y linfa a otros órganos (Degraives et al., 2004). Los estudios experimentales han demostrado la implicación de la transmisión sexual en la epidemiología de la enfermedad: los toros pueden transmitir las clamidias a las vacas como una enfermedad venérea a través del semen, éstas se replican en las células del endometrio, causando daño que puede conducir a la muerte del embrión o infertilidad de la vaca (Bowen et al., 1978).

El aborto, probablemente, sigue a la infección sistémica, pero también puede ser resultado de la inoculación directa de CE en el aparato reproductor durante el contacto sexual. Aunque el ganado vacuno puede experimentar la enfermedad clínica posterior a la inoculación con *C. abortus*, la respuesta más típica es un equilibrio entre el huésped y el parásito, que resulta en infección asintomática crónica (DeGraves et al., 2004).

Los mecanismos responsables del aborto no son claros, pero se cree que es el resultado de las lesiones epiteliales coriónicas, que conducen a un deterioro del intercambio de oxígeno y nutrientes entre la madre y el feto, y los cambios patológicos del feto, en especial la necrosis focal del hígado (Buxton et al., 2002). Sumado a lo anterior, los cambios en las concentraciones plasmáticas de las hormonas progesterona, 17β estradiol y

prostaglandina E2 en el líquido amniótico y alantoideo, como consecuencias de la infección placentaria por *C. abortus*, pueden resultar en parto prematuro (Keer et al., 2005). Los animales no abortados nacen muy débiles y con infección congénita, que está latente y se manifiesta en la primera preñez (Papp y Shewen, 1996).

La patología general del feto abortado es variable, puede ser normal o con diversos grados de edema, ascitis, petequias en la boca, la lengua, el timo, los ganglios linfáticos y en otros órganos (Storz, 1971). El hígado suele ser de color rojo amarillento y moteado. Otras lesiones graves pueden incluir hemorragia subcapsular en el riñón, esplenomegalia, y constricción de los vasos sanguíneos en el cerebro (Storz y McKercher, 1962; Reed et al., 1975).

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de *C. abortus* puede hacerse directamente con tejidos de la placenta, órganos fetales, excreciones de la vagina (hasta 14 días después del aborto) o semen, mediante cultivo en huevos embrionados o cultivo celular; mediante improntas o tejidos teñidos con Giemsa o Ziehl Neelsen y observadas mediante microscopía directa; y mediante amplificación del ADN con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y posterior secuenciación genómica de los productos de la PCR (Gibson da Silva et al., 2006; Albarracín, 2011). Estas técnicas son las más confiables, pero resultan tediosas y con un grado de complejidad elevado que las hace no aptas para diagnósticos masivos.

Para la detección de anticuerpos contra *C. abortus* se utilizan pruebas inmunoenzimáticas (ELISA, por sus siglas en inglés) que son las más utilizadas y recomendadas en la actualidad. El diagnóstico se logra mediante la asociación de sintomatología con un título elevado de anticuerpos. Las pruebas inmunofluorescentes son

muy sensibles pero tiene la desventaja de ser subjetivas, y por último la prueba de fijación del complemento, que es la recomendada por la OIE, a pesar de que es una prueba muy lenta, brinda una sensibilidad moderada, y no permite diferenciar la especie de clamidia (OIE, 2004; Gibson da Silva et al., 2006; Albarracín, 2011).

1.5 Tratamiento y control

La familia Chlamydiaceae ha demostrado ser susceptible a varios antibióticos como las tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y penicilina, siendo las tetraciclinas las más utilizadas. La oxitetraciclina de larga acción es comúnmente administrada en animales de producción (20 mg/kg, vía intramuscular). Sin embargo, no elimina la infección, solamente suprime la replicación del microorganismo, lo que reduce, en algunos casos, la severidad de los síntomas clínicos y, permite así, el nacimiento de animales vivos (Longbottom y Coulter, 2003); por lo tanto, el tratamiento con antibióticos se recomienda solo en casos excepcionales. La vacunación representa el método preferible y económicamente favorable para el control de la enfermedad en hatos donde la problemática por *C. abortus* es significativa; además, se recomienda el aislamiento del animal infectado por al menos dos o tres semanas, la destrucción de la placenta y la limpieza de los potreros contaminados durante el aborto (Longbottom y Coulter, 2003). Además se enfatiza en las correctas medidas de manejo, como lo son el uso de un guante de palpación por animal, entre otros.

1.6 Justificación

En Costa Rica se desconoce la presencia e implicaciones de *C. abortus* en el ganado bovino, por ende, su importancia a nivel reproductivo; esto debido a que no se han realizado estudios. Es importante avanzar en el estudio y conocimiento de este agente con la finalidad de diagnosticar y tratar a los animales de forma certera, y verificar cuán

significativo es el papel de este agente en la problemática reproductiva de los hatos lecheros especializados.

Por otro lado, esta bacteria no solo infecta a rumiantes, equinos y porcinos, también puede infectar a diversos animales silvestres e incluso al ser humano, ocasionando síntomas semejantes al resfrío (DeGraves et al., 2004). Existe evidencia creciente de que *C. abortus* puede infectar al humano (Figura 3) y tener resultados adversos durante la gestación de las mujeres que conviven con rebaños infectados (Baud et al., 2008).

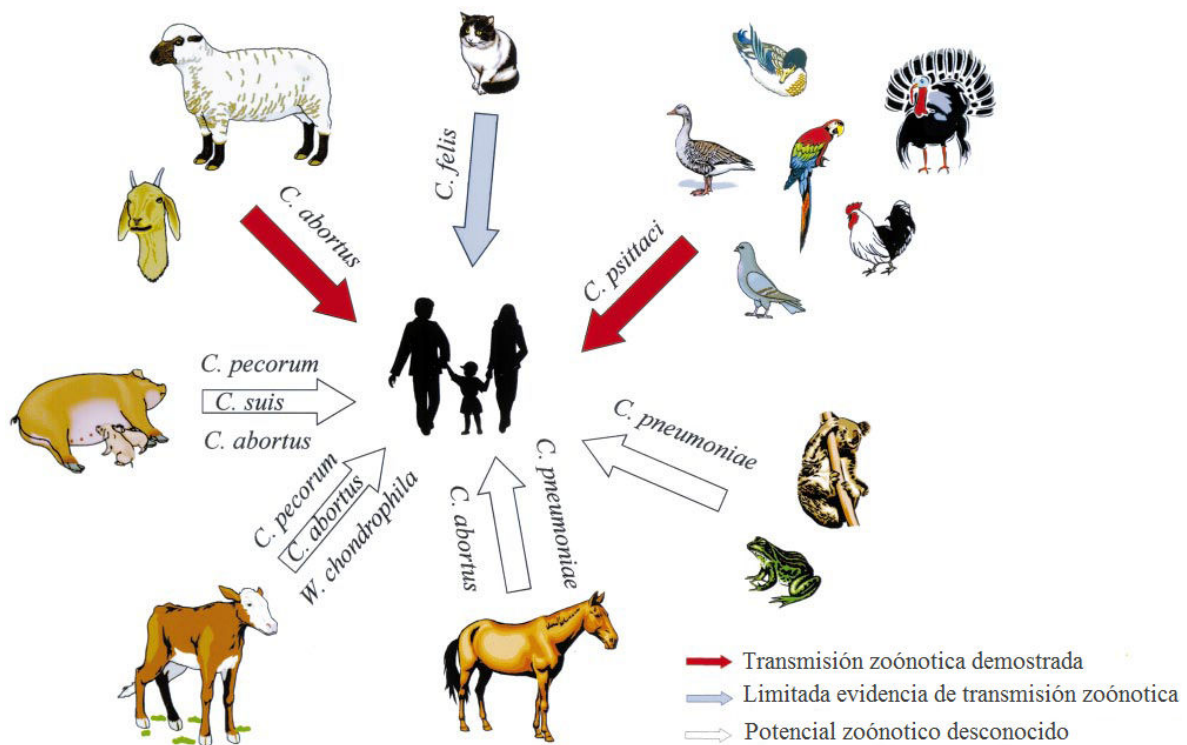


Figura 3. Potencial zoonótico de los patógenos animales (Longbottom y Coulter, 2003).

Es vital que las personas involucradas en el manejo de animales y procesamiento de alimentos de origen animal, tengan el conocimiento de la existencia de este agente y las posibilidades de transmisión, para que sean cuidadosas con sus prácticas, y rigurosas en cuanto a la higiene y saneamiento en el manejo de animales, cadáveres o material infeccioso (Shewen, 1980).

Este estudio busca determinar la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* y hallar alguna relación entre la presencia de este agente con alguno de los múltiples casos de abortos o problemas reproductivos en bovinos. Además, se intentó una primera aproximación a la determinación de la presunta responsabilidad de *C. abortus* en las pérdidas económicas que sufren los productores de leche a causa de problemas de infertilidad clínica o subclínica, así como de mastitis en sus animales (DeGraves et al., 2004, Jee et al., 2004, Yihang, 2008); todo con el objetivo de buscar reducir o evitar la propagación del agente y procurar el mayor bienestar tanto animal como productivo.

1.7 Hipótesis

Ho: No hay anticuerpos contra *C. abortus* en sueros sanguíneos de bovinos de hatos lecheros especializados de la zona norte de Heredia y Alajuela.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Determinar, en una población de bovinos de hatos especializados en producción de leche de la zona norte de Heredia y Alajuela, la presencia de anticuerpos contra *C. abortus*.

1.8.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* en sueros sanguíneos de bovinos recolectados en la zona norte de Heredia y Alajuela.
- Establecer la prevalencia global de *C. abortus* en bovinos lecheros de la zona norte de Heredia y Alajuela.
- Relacionar la presencia o ausencia de sintomatología clínica con el estatus serológico de los animales muestreados.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio y población de referencia

Se realizó un estudio transversal, de tipo descriptivo, para determinar la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* en bovinos de las razas Jersey, Holstein y cruces de la zona norte de Heredia y Alajuela, mediante análisis serológico.

2.2 Tamaño de la muestra

El tamaño total de la muestra para este estudio fue de 582 muestras de suero bovino (0.5% de prevalencia global esperada, con un 95% de confianza), calculado con la fórmula de Cannon y Roe (1982) utilizando el programa Win Episcopo 2.0 sobre una población aproximada de 11000 vacas y 70 fincas.

Fórmula de Cannon y Roe (1982) detallada a continuación:

$$n \cong \frac{\left(1 - (1 - NC)^{\frac{1}{D}}\right) \left(N - \frac{1}{2(Se D - 1)}\right)}{Se}$$

Donde: n = tamaño de muestra necesario

N = tamaño de la población base

D = prevalencia esperada

NC = nivel de confianza

Se = Sensibilidad

Para el primer nivel de selección de fincas, se asumió una misma probabilidad de infección entre las fincas ya que se encontraban en una misma zona de vida, bosque pluvial pre montano o montano bajo, con iguales condiciones: pastoreo, tipo de pasto y sistema de rotación de potreros similar, ordeños de forma mecánica dos veces al día, además, dado que: a) se desconocía la presencia o ausencia del agente, b) las condiciones de manejo y,

por consiguiente, de transmisión eran similares y estaban presentes en la mayoría de las fincas, c) todos los animales de las fincas mayores a un parto (dentro de cada finca) tendrían la misma posibilidad de estar infectados. Por lo tanto, se realizó un muestreo aleatorio simple a nivel de fincas.

Para el segundo nivel de selección, intra-finca, se calculó el tamaño de la muestra necesario para comprobar la presencia o ausencia del agente, con una prevalencia esperada del 10%, aunque algunos autores reportaban prevalencias de hasta un 50% intra hato (Wang et al., 2001; Igayara-Souza et al., 2004; Niemczuk, 2005; Godin et al., 2008).

Debido a que los animales mayores a un parto son los que tienen mayor posibilidad de estar infectados con *C. abortus* según DeGraves *et al.* (2004), éstos se seleccionaron aleatoriamente en cada finca, donde se tomó un número de muestras específico determinado por el número de animales en la finca (Cuadro 1), y se fueron restando del total de muestras a analizar (582); así, sucesivamente, hasta completar el número total de muestras de suero requeridas.

Cuadro 1. Número de animales a analizar dentro de cada finca, calculado según fórmula de Cannon y Roe (1982), mediante Win Episcopa 2.0 (10% prevalencia esperada y 95% nivel de confianza).

Número de animales en la finca	Número de animales requeridos
≤ 29	18
30-39	19-20
40-49	21-22
50-69	22-23
70-80	24
81-109	25
110-159	26
160-289	27
290-370	28

El cálculo de la Prevalencia Global de la zona se obtuvo al dividir el número de animales encontrados seropositivos, entre el total de animales analizados de la zona en el periodo de tiempo determinado.

$$\text{Prevalencia Global} = \frac{\# \text{ Seropositivos}}{\text{Total de animales analizados}}$$

2.3 Toma de muestras

La toma de muestras de sangre se efectuó entre julio a diciembre del 2012 con apoyo del personal de las fincas. Las muestras sanguíneas fueron tomadas de la vena coccígea media, para facilitar el proceso y minimizar el estrés de los animales, con previa desinfección del sitio de sangrado, mediante torundas de alcohol con yodo, y con vacutainer. Las muestras se depositaron en tubos al vacío, sin anticoagulante, debidamente identificadas; se dejaron reposar para la correcta formación del coágulo y se transportaron en condiciones de refrigeración (hielera portátil a una temperatura media de 4-7°C) al Laboratorio de Medicina Poblacional de la EMV-UNA. Una vez en el laboratorio, se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 g para la adecuada obtención del suero, el cual se separó en tubos Eppendorf®. Posteriormente, se almacenaron a -20°C.

Se realizó un segundo muestreo entre enero y marzo del 2013, a animales seleccionados ($S/P \geq 22$). De estas vacas se tomó dos muestras de sangre, una con y otra sin anticoagulante, una muestra de leche, hisopados de la vulva y de la conjuntiva.

Las muestras de sangre sin anticoagulante se obtuvieron y procesaron de igual forma que en el primer muestreo, arriba descrito.

Para los hisopados se empleó hisopos de algodón estériles. Previo a la toma del hisopado vulvar se limpió y secó la zona externa y se procedió a tomar la muestra con uso

de guantes limpios y se colocó en tubos Eppendorf® con medio MEM (Medio Esencial Mínimo, por sus siglas en inglés).

La muestra de leche se tomó directamente de la ubre, primeramente se limpió y secó la superficie de la ubre, se despuntó adecuadamente los cuatro pezones y se procedió a coleccionar la muestra en bolsitas de muestreo bacteriológico, las cuales se rotularon previamente. Tanto los sueros, la sangre completa, los hisopados como la leche, se transportaron en condiciones de refrigeración al laboratorio, donde se congelaron a -20°C hasta el momento de la prueba serológica o la extracción de ADN.

2.4 Toma de datos

Durante la primera toma de muestras de sangre (julio-diciembre 2012) se realizó una entrevista al propietario o encargado, para obtener información general de la finca (existencia de aéreas exclusivas de cuarentena o de parición, entrada de animales de otras fincas, presencia de otros animales de producción), del manejo reproductivo (monta natural o inseminación artificial), del manejo de terneras (tipo de leche para alimentación, tiempo de contacto con su madre) y del manejo de los animales en general (desinfección de equipos, abordaje de partos, abortos, manejo de mastitis); además, para verificar si existía o no conocimiento del agente en estudio (Anexo 1). Durante la entrevista se realizó una revisión de la finca para constatar algunas de las prácticas de manejo; además, se obtuvo un respaldo del programa VAMPP Bovino 3.0 (programa computacional para el manejo de hatos bovinos lecheros) para corroborar datos reproductivos (intervalo entre partos, tasa de servicios por concepción, porcentaje de concepción, número de pérdidas fetales).

Durante la segunda toma de muestras de sangre, hisopados y leche, se entrevistó al manejador de la finca o encargado de los animales, con el fin de conocer la historia de los animales seleccionados, dando énfasis a los detalles que no se suelen incluir en el VAMPP

(historial de mastitis, cuartos afectados, la frecuencia de estos hallazgos, dificultades para preñarse, otras infecciones).

2.5 Diagnóstico serológico

Se utilizó el ELISA ID Screen® *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species kit, de la compañía ID VET Innovative Diagnostics, Francia, para la detección de anticuerpos contra *C. abortus* en rumiantes, suinos y caballos. Esta compañía reporta para este ensayo una sensibilidad de 100% y especificidad de 99.7%. Los pozos de la placa están recubiertos con un antígeno específico sintético de la proteína principal de membrana externa (MOMP por sus siglas en inglés) de *C. abortus*, lo que reduce la posibilidad de reacciones inespecíficas. A los pozos se les añadió 90 µl del tampón de dilución, luego 10µl de las muestras a analizar y 10 µl de los controles positivos y negativos (por duplicado), y se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavó tres veces los pocillos con la solución de lavado, se añadió el conjugado (peroxidasa multiespecie) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se eliminó el conjugado por tres lavados y se añadió la solución de sustrato (TMB, tetrametilbenzidina), se incubó por 10 minutos en la oscuridad y se paró la reacción con solución de parado. La coloración que resultó fue proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra. La placa se leyó a 450nm en un espectrofotómetro de lectura de placas. Para la validación de los resultados el promedio de los controles positivos (PC) debió mostrar una densidad óptica (DO) mayor de 0.350 y la diferencia de los promedios de DO de los controles positivos y negativos debió ser >3.

Para cada muestra se calculó el porcentaje S/P, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{S}{P} = \frac{DO_{Muestra}}{DO_{PC}} \times 100$$

Muestras con un valor S/P mayor o igual a 60% se consideraron positivas a *C. abortus*, muestras con S/P menor o igual al 50% se consideraron negativas, mientras que muestras menores a 60% pero mayores a 50% se catalogaron como sospechosas, según lo indicado en el ensayo.

2.6 Diagnóstico Molecular

2.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de los hisopados se realizó con el kit DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN, según el protocolo recomendado por la compañía. Las muestras de leche se extrajeron con el mismo ensayo, solamente se incluyó una fase con Trizol® y cloroformo después de la incubación de las muestras con proteinasa K, esto para lograr separar el exceso de proteínas y grasas presentes en la leche del ADN, ya que podrían inhibir la PCR.

2.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El PCR anidado para la detección de *C. abortus* se realizó según lo descrito por Biesenkamp-Uhe y colaboradores (2006), para amplificar parte del gen *ompA* (outer membrane protein A) e identificar especies del género *Chlamydophila spp.* Los iniciadores utilizados fueron: *191CHOMP* (5'-GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC-3') y *CHOMP371* (5'-TTA GAA IC (GT) GAA TTG IGC (AG)TT IA(TC) GTG IGC IGC-3'). Se preparó una reacción con un volumen total de 12.5µl con 6.25µl de MasterMix 2x (Fermentas®), 0.5 µl de cada iniciador a una concentración de 20µM, 2.5 µl de ADN y 2.75 µl de agua molecular (Fermentas®). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización (95°C por 45 seg.), alineación (50°C por 45 seg.), extensión (72°C por 30 seg.) y una extensión final a 72°C por 7 min. Todas las muestras se sometieron a un segundo PCR utilizando los

iniciadores *CHOMP 336s* (5'-CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT-3') y *218PSITT* (5'-GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG-3'), en una reacción con proporciones de reactivos igual a la anterior, variando las condiciones del termociclador: desnaturalización inicial (95°C por 5 min.), seguido de 20 ciclos de desnaturalización (95°C por 45seg.), alineación (60°C por 45 seg.), extensión (72°C por 30seg.) y una extensión final (72°C por 7 min.), para amplificar una porción de 389-404 bp. Como control positivo en los dos PCR se utilizó ADN de *C. psittaci* de una paloma de San José, CR (GenBank: KF770962), como control negativo se utilizó agua molecular (Fermentas®).

Los productos del primer y segundo PCR fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5x (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA pH 8, 0.5 M), teñidos con Gel Red (0.5 µg/ml) y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. El marcador utilizado fue Thermo Scientific GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Sm0321). Fueron consideradas como positivas las muestras en las que se observó una banda con los pesos respectivos esperados en ambos PCR (576-597 bp en el primero y 389-404 bp en el segundo PCR).

2 RESULTADOS

Se recolectaron un total de 608 sueros de 24 fincas. Quince se encontraban ubicadas en la provincia de Alajuela: tres en el cantón Central, dos en el cantón de Grecia, dos en el cantón de Alajuela y ocho en el cantón de Poás. Las otras nueve se ubicaron en la provincia de Heredia: tres en el cantón Central, cinco en el cantón de Santa Bárbara y una en el cantón de San Rafael. El número de animales en estas fincas oscilaba entre 60 y 535 animales. El detalle de la ubicación, tamaño, edad promedio del hato y razas se desglosa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características generales de las 24 fincas incluidas en el estudio.

Finca	Provincia, distrito	cantón,	Animales en la finca	Animales muestreados	Edad promedio en meses	Raza
1	Alajuela, Redonda	Poás, Sabana	100	21	50	Holstein
2	Heredia, Blanca	Heredia, Vara	70	23	43	Holstein y Jersey
3	Alajuela, Redonda	Poás, Sabana	150	24	35	Holstein
4	Heredia, Los Cartagos	Santa Bárbara,	150	25	40	Holstein, Jersey, y Pardo
5	Alajuela, Poás,	San Juan	203	25	40	Holstein
6	Alajuela, Poás,	San Rafael	125	26	51	Holstein y Jersey
7	Alajuela, Poás,	Poasito	535	30	39	Jersey
8	Alajuela, Isidro	Grecia, San	90	24	44	Jersey
9	Heredia, Roble	Santa Bárbara, El	100	25	42	Jersey
10	Heredia, Roble	Santa Bárbara, El	80	26	34	Holstein
11	Heredia,	San Rafael	80	25	68	Holstein
12	Alajuela, Isidro	Alajuela, San	300	35	38	Jersey
13	Alajuela, Sabanilla	Alajuela,	240	28	45	Jersey, Holstein y cruces
14	Heredia, Blanca	Heredia, Vara	350	28	44	Jersey, Holstein y cruces
15	Alajuela, Roque	Grecia, San	65	20	39	Jersey y Holstein
16	Alajuela, Redonda	Poás, Sabana	80	20	50	Holstein
17	Alajuela, Redonda	Poás, Sabana	250	28	39	Holstein

Cuadro 2. Características generales de las 24 fincas incluidas en el estudio (continuación).

Finca	Provincia, cantón, distrito	Animales en la finca	Animales muestreados	Edad promedio en meses	Raza
18	Heredia, Santa Bárbara, El Roble	80	25	33	Jersey
19	Heredia, Santa Bárbara, El Roble	80	25	38	Jersey
20	Alajuela, Poás, San Juan	115	25	37	Holstein
21	Alajuela, Alajuela, San Isidro	150	25	51	Holstein, Jersey y cruces
22	Alajuela, Alajuela, Sabanilla	60	25	42	Holstein
23	Alajuela, Alajuela, San Isidro	113	25	37	Jersey
24	Heredia, Heredia, Vara Blanca	70	24	50	Holstein y Jersey

Las encuestas realizadas en estas fincas permitieron conocer características y prácticas de manejo de las mismas, las cuales se desglosan en el Cuadro 3. En cuanto al manejo reproductivo: 24 de las fincas utilizaron inseminación artificial, pero en tres fincas continuaban usando monta natural en ciertos casos. Dentro de la información general de las fincas, nueve afirmaron tener un área exclusiva de cuarentena, solo siete fincas respondieron tener un área exclusiva de parición. En 20 de las fincas reportaron ausencia de cabras u ovejas en la misma finca o en las cercanías. En 16 fincas reportaron ausencia de cerdos o caballos en la finca o en sus alrededores. En 21 fincas criaban sus propios remplazos. En cuanto a la crianza de terneras, solo en 2 fincas alimentaban las terneras con leche mastítica. En 15 de las fincas, las terneras pasaban menos de 12 horas con la madre. Finalmente en 11 fincas enterraban o roseaban con cal y enterraban los fetos abortados, placentas y material bioinfeccioso, en las restantes fincas simplemente los botaban en algún lugar lejano de los animales o nunca los encontraban, porque los perros se lo comían. Solo en 13 fincas realizaban prácticas de desinfección de equipos. En siete de las fincas se acostumbraba que las vacas parieran en el potrero junto con el resto del grupo, en la mayoría de las fincas (18) se trataba inmediatamente con antibióticos la vaca que presentaba mastitis, y solo en cuatro

fincas separaban estos animales enfermos del resto del grupo. En ninguna finca respondieron tener conocimiento alguno de *C. abortus*.

Cuadro 3. Resultado de la encuesta realizada a 24 hatos bovinos de la zona norte de Heredia y Alajuela para determinar factores de riesgo para la transmisión de *C. abortus*.

Variable encuestada a cada finca	Número de fincas con respuestas afirmativas
Manejo	
Desinfección adecuada del equipo	13 (54.1%)
Parición en potreros (de maternidad o de prontas)	15 (62.5%)
Realizan un adecuado descarte de material bioinfeccioso (fetos, placentas)	11 (45.8%)
Separación de animales con mastitis	4 (16.6%)
Se tratan inmediatamente los animales con mastitis	18 (75.0%)
Manejo reproductivo	
Utilizan inseminación artificial	24 (100.0%)
Utilizan monta natural	3 (12.5%)
Información general de la finca	
Remplaza exclusivamente con animales propios de la finca	21 (87.5%)
Compra animales a otras fincas	3 (12.5%)
Hay cabras u ovejas en la finca o alrededores	4 (16.6%)
Hay caballos o cerdos en la finca o alrededores	8 (33.3%)
Área exclusiva de cuarentena	9 (37.5%)
Área exclusiva de parición	7 (29.1%)
Crianza	
Usa leche mastítica en alimentación de terneras	2 (8.3%)
Terneras permanecen con sus madres menos de 12 horas	15 (62.5%)
Terneras permanecen con sus madres más de 12 horas	9 (37.5%)
Otros	
Conocimiento sobre <i>C. abortus</i>	0 (0.0%)

Del total de 608 muestras de suero recolectadas y analizadas se encontró únicamente una muestra positiva con un valor S/P de 62% en la finca 4 del cantón de Santa Bárbara y dos sospechosas con valores S/P de 52% y 53% en las fincas 12 y 18 de los cantones Central de Alajuela y Santa Bárbara de Heredia, respectivamente. La mayoría (n=580, 95.4%) de los sueros muestreados presentaron valores de S/P menores a 22%, mientras que 25 (4.1%) mostraron valores S/P entre 22 y 50% (Figura 4, Cuadro 4). Por consiguiente la prevalencia global aparente de la zona resultó ser 0.16%.

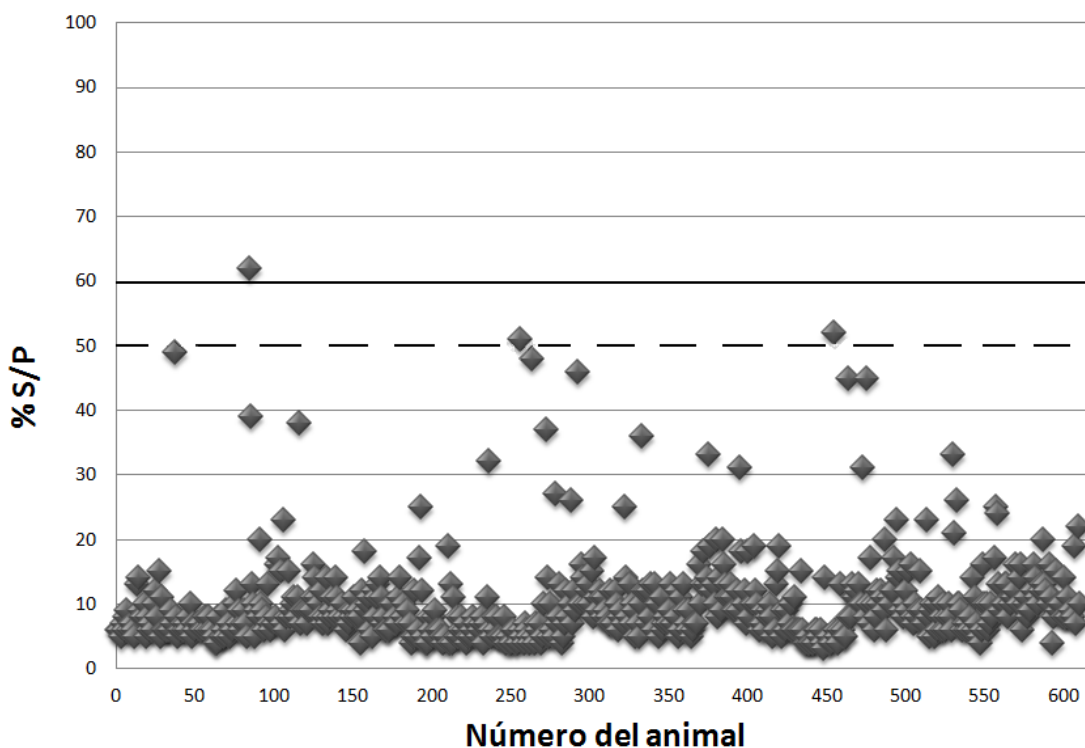


Figura 4. Distribución de 608 sueros bovinos de la zona norte de Heredia y Alajuela según los valores S/P obtenidos en el ELISA para detección de anticuerpos contra *C. abortus*. Línea intermitente: punto de corte negativo, línea continua: punto de corte positivo, en medio de ambas líneas muestras sospechosas.

Cuadro 4. Valores S/P agrupados por categorías, obtenidos de las muestras bovinas de la zona norte de Heredia y Alajuela, analizadas en el 2012 mediante ELISA para detección de anticuerpos contra *C. abortus*.

Valores S/P	# Animales (%)
0 – 21	580 (95.4%)
22 – 50	25 (4.1%)
51 – 59	2 (0.3%)
≥60	1 (0.1%)
Total	608 (100%)

En cuanto a la ubicación geográfica de animales con S/P entre 22 a 50 se determinó una en el cantón Central de Heredia (finca 2), cuatro en el cantón de Santa Bárbara de Heredia (fincas 4, 10, 18, 19), tres en el cantón de Poás (fincas 5 y 16), dos en el cantón de San Rafael de Heredia (finca 11), cinco en el cantón Central de Alajuela (fincas 12 y 21) y cuatro en el cantón de Alajuela (fincas 13 y 22).

De los 28 animales que presentaron valores S/P mayores a 22 en el ensayo serológico, se lograron recolectar muestras de 22 animales seis meses después (Cuadro 5). Al repetir el ensayo serológico, el único animal seropositivo obtenido en el 2012 resultó negativo (S/P 41%), uno de los sospechosos continuó similar (S/P 50%), mientras que el otro cambió a negativo (S/P 14%). Ninguna de las restantes muestras tomadas (de animales con S/P entre 22 a 50%) resultó positiva (Cuadro 5).

Mediante la técnica de PCR solamente se logró obtener una muestra positiva (Figura 5) que provenía del hisopado vulvar de un animal de la finca 19 (Cuadro 5). Este animal había resultado con S/P de 45% en el primer análisis serológico y S/P de 26% en el segundo muestreo. Sin embargo no se logró secuenciar el producto de PCR debido a que la cantidad de la muestra fue insuficiente y el animal fue eliminado del hato para cuando se intentó un

tercer muestreo. La finca en la que vivía este animal colindaba con la finca 18, donde un animal resultó sospechoso en el primer ELISA, ambas fincas pertenecían a un mismo propietario.

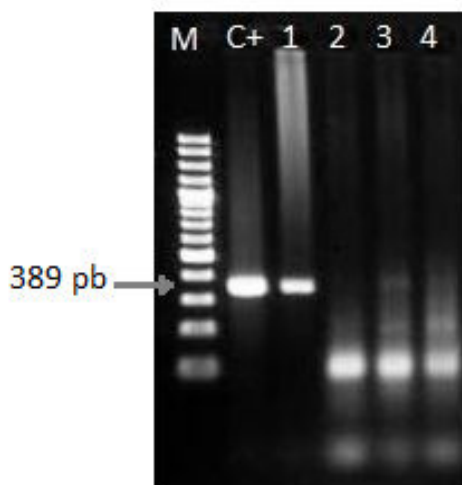


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR anidado para *Chlamydomphila spp.* (M: marcador molecular; C+: control positivo; 1: muestra positiva; 2, 3, 4: muestras negativas a *Chlamydomphila spp.*

La entrevista realizada a los manejadores de las fincas durante la visita para el segundo muestreo, permitió establecer que poco menos de la mitad de los animales (9/19, 47.3%) reportaron problemas de mastitis crónicas o recurrentes. A tres animales no se les tomó muestra de leche ya que se encontraban secas y por ende no se realizó la entrevista en relación a la salud de la ubre. En un total de 7 de 19 (36.8%) animales se reportó dificultades para preñarse; en tres casos el manejador no conocía el dato o no recordó (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de los exámenes serológicos y moleculares, historial de mastitis y preñez de 22 de los animales que presentaron S/P \geq 22 en el primer análisis con ELISA.

# Finca	# Animal	ELISA (2012) (S/P)	ELISA (2013) (S/P)	PCR Hisopado vulvar	PCR Hisopado conjuntival	PCR Leche	PCR Sangre	Historial mastitis	Historial dificultad para preñarse
2	37	- (49)	- (17)	-	-	-	-	-	-
4	84	+ (62)	- (41)	-	-	-	-	+	+
5	106	- (23)	- (8)	-	-	-	-	+	-
5	116	- (38)	- (31)	-	-	ND	-	-	+
10	236	- (32)	- (27)	-	-	-	-	-	-
12	255	S (51)	- (14)	-	-	-	-	-	-
12	272	- (37)	- (31)	-	-	-	-	+	-
12	278	- (27)	- (42)	-	-	-	-	-	+
11	285	- (46)	- (41)	-	-	-	-	+	-
11	281	- (26)	- (11)	-	-	-	-	-	-
13	315	- (25)	- (8)	-	-	ND	-	-	+
13	326	- (36)	- (34)	-	-	-	-	-	+
16	388	- (31)	- (22)	-	-	-	-	+	ND
18	447	S (52)	- (50)	-	-	ND	-	-	ND
19	456	- (45)	- (15)	-	-	-	-	+	ND
19	466	- (31)	- (27)	-	-	-	-	-	-
19	468	- (45)	- (26)	+	-	-	-	+	-
21	506	- (23)	- (9)	-	-	-	-	-	+
21	523	- (33)	- (14)	-	-	-	-	+	+
21	525	- (26)	- (25)	-	-	-	-	-	-
22	550	- (24)	- (11)	-	-	-	-	+	-
22	551	- (25)	- (13)	-	-	-	-	-	-

- = negativo, + = positivos, S = sospechoso, ND = no determinado

4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo no se logró determinar la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* en los bovinos de la zona norte de Heredia y Alajuela; ya que un único animal resultó positivo en la prueba serológica y en el segundo muestreo el mismo resultó negativo, lo cual hace pensar en la posibilidad de que se trató de una reacción falsa positiva del ELISA, lo que concuerda con lo reportado para este ensayo (100% sensibilidad y 99.7% especificidad). Estos resultados no concuerdan con estudios realizados en otras partes del mundo en los que se determinó altos porcentajes de seropositividad de *C. abortus* en los hatos bovinos: 51.9% en Brasil (Igayara-Souza et al., 2004), 100% en Alemania (Biesenkamp-Uhe et al., 2006), 37.5% en Taiwan (Wang et al., 2001), 51.3% en Polonia (Niemczuk, 2005) y 28% en Suecia (Godin et al., 2008). Sin embargo, en los estudios realizados recientemente en equinos y ovinos de distintas zonas de nuestro país, también se determinaron seroprevalencias bajas de *C. abortus*. Así, de un total 143 sueros equinos analizados 7 (4.9%) mostraron resultados positivos y 5 (3.5%) resultaron sospechosos. Por otro lado en ovinos, la población que mayor seroprevalencia debería mostrar, se analizaron 297 sueros, resultando 10 (3.4%) positivos y 7 (2.4%) sospechosos (Fonseca et al., 2013). Estos resultados pueden indicar tres cosas: reacciones falsas positivas, reciente introducción del agente en el hato o una baja prevalencia del agente en los hatos de nuestro país, lo cual tiene que ser aclarado en futuras investigaciones.

Al repetirse seis meses después la prueba serológica a los animales con S/P \geq 22, entre ellos el positivo y los sospechosos, y no encontrar evidencia de seroconversión en ninguno de los animales, ya que todos continuaron negativos y el positivo y los sospechosos resultaron negativos también, no se logró evidenciar la presencia de anticuerpos lo cual puede

ser confirmatorio de que se trataban de reacciones falsas positivas o que la introducción del agente pasó hace más de dos años, tiempo en el cual suelen decaer los niveles de anticuerpos (Gibson da Silva et al., 2006).

Entre los aspectos a valorar como explicación a las altas prevalencias de este agente en otras latitudes, y que no se dan en nuestro país, podría deberse a que en buena parte del continente Europeo y el Asiático la producción ovicaprina es mucho más intensa que en nuestro país, y en muchos casos ambos ganados pastorean juntos. Por otro lado, en Brasil, donde también se han reportado algunos hatos bovinos con altas prevalencias serológicas contra *C. abortus*, puede deberse a que en algunas regiones de este país la producción ovicaprina también es muy intensa; asimismo, los hatos bovinos en donde se encontraron estos resultados fueron en su mayoría de ganado de carne (Igayara-Souza et al., 2004), el cual tiene un manejo muy distinto al ganado de leche; en estos hatos el manejo es poco, pastorean en áreas extensas de tierra sin ninguna supervisión, por ende los diagnósticos de enfermedades y tratamientos son escasos, las visitas del veterinario también son esporádicas y además, se emplea principalmente monta natural, lo cual puede facilitar la entrada y esparcimiento del agente.

Por otra parte, las encuestas realizadas a los manejadores permitieron demostrar que, en la mayoría de las fincas, se presentan condiciones que hacen difícil la entrada y transmisión del agente, entre ellas: algunas de las fincas realizaban un adecuado manejo del material bioinfeccioso que suele ser fuente de contagio de *C. abortus*, como lo son las placentas y los fetos (Longbottom y Coulter, 2003); además, poseían un área exclusiva para parición la cual era desinfectada después de su uso, prácticamente no existía la monta natural (este agente también se transmite por el contacto sexual (Bowen et al., 1978)), en la mayoría de las fincas no habían otros animales de producción que podrían funcionar como reservorio

de este agente, y en las que sí los había, no estaban propiamente en la finca sino en un área vecina. Además, prácticamente no se empleaba la leche mastítica en la crianza de terneras, realizaban la crianza de sus propios reemplazos, lo que significa que no había ingreso de nuevas enfermedades al hato, a través de animales de otras zonas.

Otro aspecto del manejo a tener en cuenta es que en las producciones especializadas de nuestro país, los animales son tratados generalmente de forma profiláctica con antibióticos, esto porque el constante contacto de los manejadores con los animales facilita la detección temprana de cualquier cambio, o disminución de su producción, y muchas veces se instauran terapias antibióticas inespecíficas e innecesarias, esto provoca que la reacción inmune del animal muchas veces se vea disminuida y por ende disminuida también la producción de anticuerpos, junto con la replicación del agente y por consiguiente su diseminación en la finca.

Aspectos como el anterior deben contemplarse al analizar bajos niveles de anticuerpos y mínima o nula presencia del agente en hisopados y muestras de leche (Li, 2008).

En cuanto a la muestra positiva por PCR, la confirmación del resultado mediante la secuenciación de la muestra, habría probado la presencia del agente en el hato. Sin embargo, al no haberse secuenciado, no se puede descartar que se tratara de un resultado falso positivo al igual que lo obtenido en la prueba serológica.

Al analizar estos resultados se debe de tener presente, que un único muestreo de los animales para PCR, disminuye la posibilidad de determinación del agente. Para la búsqueda e identificación del agente se recomienda realizar la toma de muestras por tres días consecutivos, esto porque la excreción de las clamidias suele ser intermitente, por lo tanto, periodos de muestreo más extensos aumentan las posibilidades de encontrar el agente (Keer et al., 2005; Jee et al., 2004). En futuras investigaciones es importante tomar esto en cuenta.

Sin embargo, para este estudio los resultados de PCR son concordantes con los resultados de la prueba serológica la cual posee un muy buen nivel de exactitud.

En cuanto a la ubicación geográfica de los animales con altos valores S/P, en dos cantones (Santa Bárbara de Heredia y San Isidro de Alajuela) se encontraron mayor número de estos, sin embargo, no se consideró significativo, ya que no se muestrearon igual cantidad de animales por cantón.

El porcentaje de animales con problemas para preñarse o de mastitis, de igual forma no se consideró relevante ya que no se colectó la información de los demás animales con valores S/P normales o bajos. Y según la epidemiología de estas enfermedades, es probable que ambas poblaciones (con altos y bajos valores S/P) tengan igual porcentaje de problemas, ya que son muchos los agentes y factores involucrados en problemas reproductivos o mamarios del ganado de leche.

5 CONCLUSIONES

- No se determinó presencia de animales seropositivos a *C. abortus* en la zona norte de Heredia y Alajuela.
- Se estableció una prevalencia menor a 0.5% en la zona.
- No se logró correlacionar sintomatología clínica con el estatus serológico de los animales muestreados.

6 RECOMENDACIONES

1. Continuar la investigación en torno a este agente, ya que la zona de investigación de este trabajo fue pequeña y aislada en relación con otras zonas lecheras del país.
2. Para las próximas investigaciones, es de vital importancia realizar muestreos durante tres días en todos los casos, esto porque aumenta las posibilidades de detectar el agente mediante PCR, debido a su excreción intermitente.
3. Es sumamente importante que estudios semejantes se realicen en producciones de pequeños rumiantes, ya que este es el hospedador predilecto de este agente y la literatura menciona un gran impacto a nivel reproductivo.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Albarracín F. 2011. Clamidiosis bovina. Monografía de Licenciatura. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Baud D., L. Regan & G. Greub. 2008. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Curr. Opin. infect. Dis.*, 21 (1), 70-76.
- Biesenkamp-Uhe, C., Y. Li, H. R. Hehnen, K. Sachse & B. Kaltenboeck. 2007. Therapeutic *Chlamydia abortus* and *C. pecorum* Vaccination Transiently Reduces Bovine Mastitis Associated with *Chlamydia* Infection. *Infection and Immunity*, 75: 870–877 American Society for Microbiology.
- Borel, N., P. Spaeni, R. Weilenmann, K. Teankum, E. Brugnera, D.R. Zimmermann, L. Vaughan & A. Pospischil. 2006. *Chlamydia*-related abortions in Cattle from Graubunden, Switzerland. *Vet Pathol* 43:702-708.
- Bowen, R.A., P. Spears, J. Storz and G. E. Seidel. 1978. Mechanisms of infertility in genital tract infections due to *C. psittaci* transmitted through contaminated semen. *J. Inf. Dis.* 138: 95-98.
- Buxton, D., I. E. Anderson, D. Longbottom, M. Livingstone, S. Wattedegera & G. Entrican. 2002. Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.* 127, 133 - 141.
- Cannon RM and RT. Roe. 1982. Livestock disease surveys: A field manual for veterinarians. Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry; Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia. 33 pp.
- DeGraves, F.J., D. Gao, H.R. Hehnen, T. Schlapp & B. Kaltenboeck. 2003. Quantitative Detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by High-Sensitivity Real-Time PCR Reveals High Prevalence of Vaginal Infection in Cattle. *J Clin Microbiol.* 41:1726–1729.
- DeGraves, F.J., T.Y. Kim, J. Jee, T. Schlapp, H.R. Hehnen & B. Kaltenboeck. 2004. Reinfection with *Chlamydia abortus* by Uterine and Indirect Cohort Routes Reduces Fertility in Cattle Preexposed to *Chlamydia*. *Infection and Immunity.* 72: 2538–2545.

- Everett, K.D.E. and A.A. Andersen. 1999. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 803-810.
- Everett, K. D. E., R.M. Bush & A.A. Andersen. 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 for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:415-440.
- Detección de anticuerpos contra *Chlamydia abortus* en bovinos, equinos y ovinos de Costa Rica. p.10-11. *In* II Encuentro Anual de Medicina Veterinaria, CR. Ago. 9. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Costa Rica.
- Gibson da Silva, F., J. Cesar de Freitas., E. Müller Ekehardt. 2006. *Chlamydia abortus* en animales de producción. *Cienc. Vol. 36 no.1 Rural Santa María.*
- Giroud, P., 1957. Observations et données expérimentales concernant les avortements chez l'homme et l'animal. *Aroh. Inst. Pasteur (Tunis)* 34: 187-206.
- Godin, A. C., C. Björkman, S. Englund, K. E. Johansson, R. Niskanen & S. Alenius. 2008. Investigation of *Chlamydia* spp. in dairy cows with reproductive Disorders. *Acta Veterinaria Scandinavica*.50:39 doi: 10.1186/1751-0147-50-39
- Fonseca, L., Jiménez, D., Villagra, R., Alfaro, A., Murillo, J., Romero, J.J., Dolz, G., 2013. (<http://www.actavetscand.com/content/50/1/39>) Consultada: 5 May 2012.
- Griffiths, P. C., J. M. Plater, T. C. Martin, S. L. Hughes, K. J. Hughes, R. G. Hewinson, and M. Dawson, 1995. Epizootic bovine abortion in a dairy herd: characterisation of a *Chlamydia psittaci* isolate and antibody response. *Br. Vet. J.* 151: 683-693.
- Holliman A, RG. Daniel, JG. Parr, PC. Griffiths, BJ. Bevan, TC. Martin, RG. Hewinson, M. Dawson, R. Munro. 1994. Chlamydiosis and abortion in a dairy herd. *Vet. Rec.* 134:500–502.
- Igayara-Souza, C.A.; Genovez, M.E.; Ferreira, F.; Paulin, L.M.; Scarcelli, E. (2004). Ocorrência de anticorpos anti-*Chlamydia abortus* em bovinos e avaliação de possível relação com distúrbios reprodutivos em São Paulo-Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*28 (1), 28-33.
- Jee J, F.J. Degraives, T. Kim, and B. Kaltenboeck. 2004. High Prevalence of Natural *Chlamydia* Species Infection in Calves. *J Clin Microbiol.* 42: 5664–5672

- Lazcano, C., Escalante, C., Ducóing, A. 2012. Reconocimiento de la Clamidirosis caprina en México ¿La punta del iceberg? <http://es.convdocs.org/docs/index-5070.html>
- Longbottom D. & L. J. Coulter. 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.*, 128, 217–244.
- Murillo- Herrera, J. 2005. Abordaje de patologías reproductivas ocasionadas por los agentes infecciosos HVB-1, VDVB, VLVB y *N. caninum*. Tesis de Licenciatura, Heredia, Costa Rica. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional.
- Nanda, N. K., A. T. Rao, B. C. Nayak, A.G. Rao and P. Mistira, 1992. Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle. *Ind. Vet. J.* 69: 483 - 486.
- Niemczuk, K. 2005. Prevalence of antibodies against *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* in cattle in Poland. A preliminary report. *Bull Vet Inst Pulawy* 49: 293-297.
- Oficina Internacional de Epizootias [OIE]. 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. [en línea] Enzootic abortion of ewes. http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.07.07_enz_abor.pdf Consultada: 20 jul 2012.
- Papp, J. R., and P. E. Shewen. 1996. Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. *J. Infect. Dis.* 174:1296–1302.
- Reed, D.E., S.D.Lincoln, R.P. Kwapien, T.L.Chow, and C.E. Whiteman, 1975. Comparison of antigenic structure and pathogenicity of bovine intestinal chlamydia isolate with an agent of epizootic bovine abortion. *Am. J. Vet. Res.* 36: 1141.
- Romero Zuñiga, J.J. 2005. Appraisal of the epidemiology of *Neospora caninum* infection in Costa Rica dairy cattle. Ph.D Thesis, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University and Research Centre, The Netherlands.
- Sachse, K., and H. Hotzel. 2003. Detection and differentiation of chlamydiae by nested PCR. *Methods Mol. Biol.* 216:123–136
- Schachter, J., Banks, J., Sugg, N., Sung, M., Storz, J & Meyer, K. 1974. Serotyping of *Chlamydia*: Isolates of Bovine Origin. *American Society for Microbiology Vol. 11, No. 5 P. 904-907*

- Schachter, J. and Caldwell, H.D., 1980. Chlamydiae. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 285-309.
- Schoop, G., U. Krüger-Hansen, and G. Wachendörfer, 1965. Zur Isolierung von Miyagawanellen aus abortierten Rinderfeten. *Zentralbl. Vet. Med.* 12: 25-32.
- Shewen, P E. 1980. Chlamydial Infection in Animals: A Review. *Can. Vet. J.* 21: 2-11.
- Silva-Zacarias F.G., Spohr K.A.H., Lima B.A.C., Dias J.A., Müller E.E., Ferreira Neto J.S., Turilli C. & Freitas J.C. 2009. Prevalence of antibodies against *Chlamydophila* spp. in herds with bovine abortion of Paraná state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(3):215-219.
- Soriano-Vargas, E., J.M. Jiménez-Estrada, C. Salgado-Miranda, M. López-Hurtado, M.R. Escobedo-Guerra, & F.M. Guerra-Infante. 2011. Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *REDVET Rev. Electrón. Vet.* Vol. 12 N° 11
- Storz, J., 1971. Intestinal chlamydial infections of ruminants. In *Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A., p. 146-154.
- Storz, J. and McKercher, D.G., 1962. Etiological studies on epizootic bovine abortion. *Zentralbl. Vet. Med.* 9: 411-427, 520-541.
- Storz, J., D.G. McKercher, J.A. Howarth, and O.C. Straub, 1960. The isolation of a viral agent from epizootic bovine abortion. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 137: 509- 514.
- Storz, J. and Whiteman, C.E., 1981. Bovine chlamydial abortions. *Bovine Pract.* 16: 71.
- Van Loock, M., D. Vanrompay, B. Herrmann, J. Vander Stappen, G. Volckaert, B.M. Goddeeris, K.D.E. Everett, 2003. Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 761–770
- Wang, F.I., H. Shieh, and Y.K. Liao. 2001. Prevalence of *Chlamydophila abortus* infection in domesticated ruminants in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 63:1215–1220.
- Wittenbrink, M.M., H.A. Schoon, D. Schoon, R. Mansfield, and W. Bisping, 1993. Endometritis in cattle experimentally induced by *Chlamydia psittaci*. *J. Vet. Med.* B40: 437-450.

8 ANEXOS

8.1 Entrevista a los productores

ENTREVISTA

Información de la finca.

1. Nombre del entrevistado: _____
(Propietario, encargado)
2. Nombre de la finca: _____
3. Localización de la finca: _____
Provincia Cantón Distrito
4. Ubicación de la Finca (GPS):
5. ¿Cuál es el número total de animales en la finca? _____
6. ¿Cuáles razas son las que manejan en la finca?
 - (a) Holstein
 - (b) Jersey
 - (c) Otra: _____
7. ¿Utilizan el programa VAMPP Bovino en la finca?
 - (a) Sí
 - (b) No
8. Inspección del área de cuarentena de la finca. Observaciones:

9. ¿Hay cabras u ovejas que tengan acceso a los potreros o instalaciones de la finca o a sus alrededores en fincas vecinas?
 - (a) Sí
 - (b) No
10. ¿Hay caballos o cerdos en la finca o a sus alrededores en fincas vecinas?
 - (a) Sí
 - (b) No
11. ¿Cuánto tiempo pasan las terneras recién nacidas con sus madres tomando calostro?
 - (a) 0 horas
 - (b) 0-12 horas
 - (c) 12-24 horas
 - (d) 24-48 horas
 - (e) 48 horas o más.
12. ¿Calientan o pasteurizan el calostro antes de darlo a las terneras?

- (a) No
- (b) Sí → ¿Durante cuánto tiempo? _____

13. ¿Reciben reemplazador las terneras?

- (a) Sí
- (b) No
- (c) A veces

14. ¿Se utiliza la leche de vacas mastíticas en la cría de terneras?

- (a) Sí*
- (b) No
- (c) A veces*

* → ¿Calientan la leche antes de darla a las terneras? Sí o No

15. ¿Cómo se realiza el abordaje de un parto normal (sin asistencia) en la finca?, Describa detalladamente, desde ubicación o movilización de la vaca hasta manejo de material bioinfeccioso.

16. Al asistir los partos, ¿cómo se realiza? (Equipo utilizado, manejo del animal, del material bioinfeccioso, etc.)

17. ¿Ha notado usted o su veterinario de algún patrón en cuanto a problemas reproductivos de los animales de la finca?

- (a) Sí → ¿Cuáles? _____
- (b) No

18. ¿Cuál considera usted que es el problema reproductivo más común en su finca, se ha logrado determinar la causa? ¿Cuál es esta?

19. En caso de aborto, ¿cuál es procedimiento de rutina?, describa detalladamente:

20. ¿Se realiza el reemplazo de animales solamente con animales propios?

- (a) Sí
- (b) No

21. ¿Compran animales a otras fincas, ya sea para reemplazo o para otros fines?

- (a) Sí

(b) No

22. ¿Cada cuánto realizan pruebas para la detección de mastitis en la finca?

(a) Cada mes

(b) Cada dos meses

(c) Otro: _____

23. ¿Cuál es el manejo de las vacas con mastitis?

24. ¿Para la reproducción utilizan inseminación artificial o monta natural?

(a) I.A.

(b) Monta natural

(c) Ambos

25. ¿En monta natural los toros son propios o son prestados de otra finca?

(a) Propios

(b) Otra finca

26. Si es propio, ¿lo prestan a otras fincas?

(a) Sí

(b) No

27. Si usan I.A ¿desde hace cuanto?

28. ¿Conocía o había oído acerca de *Chlamydophila* o Chlamydia?

(a) Sí

(b) No

29. ¿Los toros utilizados en IA tienen exámenes de *Chlamydophila spp.*?

(a) Sí

(b) No

Comentarios:
