

ABORTO ENZOÓTICO DE LAS OVEJAS (CLAMIDIOSIS OVINA) (INFECCIÓN POR *CHLAMYDIA ABORTUS*)

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La clamidiosis ovina, también conocida como aborto enzoótico de las ovejas (AEO) o aborto enzoótico ovino (AEO), está causada por la bacteria *Chlamydia abortus*. El aborto clamidial suele ocurrir durante las últimas 2–3 semanas de la gestación, con la aparición de mortinatos y placentas débiles. No obstante, la infección también puede provocar el nacimiento de corderos mortinatos plenamente desarrollados o corderos débiles que no sobreviven más de 48 horas. Las ovejas infectadas también pueden parir corderos sanos. Rara vez se dan signos que ayuden a predecir un aborto, aunque pueden observarse cambios de conducta y secreciones vulvares en las últimas 48 horas de la gestación.

El diagnóstico del aborto enzoótico se basa en la detección del antígeno o del ácido nucleico del agente causal en los productos del aborto o en la secreción vaginal de las hembras que acaban de abortar. Después del aborto, se puede detectar una respuesta humoral de anticuerpos. Pueden verse afectadas las cabras y las ovejas, y, en menor medida, el ganado vacuno, los cerdos, los caballos y rumiantes salvajes. La clamidiosis de los pequeños rumiantes causada por *C. abortus* es una zoonosis y el microorganismo debe manipularse con medidas de bioseguridad. Las mujeres embarazadas presentan un especial riesgo de contagio.

Identificación del agente: Las bases para un diagnóstico positivo de la infección por *C. abortus* es un historial de abortos en las ovejas y las cabras (a menudo en las últimas fases de la gestación), la evidencia de placentitis entre purulenta y necrotizante con vasculitis y la demostración de un gran número de microorganismos en las placentas afectadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pruebas de detección de antígeno o frotis teñidos. También resultan útiles la lana aún húmeda de los fetos y el contenido de sus abomasos o los frotis vaginales de las hembras que acaban de abortar. Es importante distinguir el daño a los cotiledones causado por *Toxoplasma gondii* y, en hisopos teñidos, ser consciente de las similitudes morfológicas entre *C. abortus* y *Coxiella burnetii*, el agente causal de la fiebre Q.

Los microorganismos clamidiales de los tejidos y frotis se pueden detectar mediante tinción o métodos de detección de antígenos (inmunohistoquímica o inmunofluorescencia), mientras que el ADN clamidial se puede detectar mediante métodos basados en la PCR, como la PCR en tiempo real y microchips de ADN. Algunos de estos métodos están disponibles en forma de kit comercial.

Chlamydia abortus solo puede aislarse de células vivas; por tanto, se requiere disponer de instalaciones para el cultivo en embriones de pollo y en cultivos celulares, con las correspondientes medidas relativas a la contención de riesgos biológicos.

Pruebas serológicas: Un aumento en el título de anticuerpos contra *C. abortus*, que puede detectarse mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), es común después del aborto o del nacimiento de una cría muerta, pero esto no ocurre en todos los casos. *Chlamydia abortus* comparte antígenos con otras especies de *Chlamydia* y algunas bacterias gramnegativas, de modo que la prueba de fijación del complemento (CF) o los ELISA crudos no son específicos y ya no se recomiendan. La detección serológica durante el período posterior al parto ayuda a identificar los rebaños infectados, a las cuales se pueden aplicar las medidas de control. Actualmente, no se dispone de pruebas serológicas que permitan diferenciar entre ovejas o cabras vacunadas y ovejas o cabras infectadas de forma natural (pruebas DIVA).

Requisitos para las vacunas: Se dispone de vacunas inactivadas y de vacunas vivas capaces de prevenir el aborto y de reducir la excreción, que contribuyen al control de la enfermedad, aunque no la erradican.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción e impacto de la enfermedad

La clamidiosis ovina (aborto enzoótico de las ovejas [AEO], o aborto enzoótico ovino) está causado por la bacteria *Chlamydia abortus*. El aborto clamidial al final de la gestación provoca importantes pérdidas económicas en muchas áreas del mundo dedicadas a la cría ovina, particularmente cuando los rebaños se juntan durante el período de partos (Aitken & Longbottom, 2007; Longbottom & Coulter, 2003). Lo normal es que el aborto ocurra en las 2–3 últimas semanas de la gestación, con la aparición de corderos mortinatos y placentas visiblemente inflamadas. La infección también puede provocar el parto de corderos mortinatos plenamente desarrollados y de corderos débiles que, por lo general, no logran sobrevivir más de 48 horas. También es infrecuente que, en los partos múltiples de ovejas infectadas nazca un cordero muerto y uno o más débiles o sanos. La infección en general entra por la introducción de ganado de reposición infectado a rebaños “limpios” (inmunológicamente naives”) y provoca un pequeño número de abortos durante el primer año, seguido de un gran número de abortos durante el segundo año, que pueden afectar en torno al 30% de las ovejas.

Los animales infectados no muestran la enfermedad clínica antes del aborto, aunque pueden observarse cambios de conducta y las secreciones vulvares en las ovejas durante las 48 últimas horas de gestación. La patogénesis se inicia sobre los 90 días de gestación, coincidiendo con una fase de rápido crecimiento fetal, cuando la invasión de los placentomas por las clamidias produce una reacción inflamatoria difusa y progresiva, vasculitis trombotica y necrosis tisular. En el hígado y en los pulmones fetales, se producen cambios menos drásticos y, en casos en los que la lesión de la placenta es grave, puede producirse lesión cerebral debido a la hipoxia (Buxton *et al.*, 2002; Longbottom *et al.*, 2013). El aborto es probablemente el resultado de una combinación de alteraciones en la alimentación materno-fetal y en el intercambio gaseoso, las perturbaciones en la regulación hormonal de la gestación y la agresión inducida por citoquinas (Entrican, 2002).

El aborto ocasionado por clamidias también ocurre, con un alcance similar, en las cabras y, con menos frecuencia, en las vacas, los cerdos, los caballos y los rumiantes salvajes. En las ovejas, el aborto en la fase terminal de la gestación con expulsión de las membranas fetales necróticas constituye un indicador del diagnóstico.

2. Naturaleza y clasificación del patógeno

Taxonómicamente, la familia *Chlamydiaceae* comprende un grupo de bacterias gramnegativas e intracelulares estrictas que corresponden al género único *Chlamydia*, que incluye once especies: *C. trachomatis* (humanos), *C. suis* (cerdo), *C. muridarum* (ratón y hámster), *C. psittaci* (aves), *C. felis* (gato), *C. abortus* (ovino, caprino y bovino), *C. caviae* (cobaya), *C. pecorum* (ovino, bovino y koala), *C. pneumoniae* (humanos), *C. avium* y *C. gallinaceae* (ambos en aves) (Sachse *et al.*, 2015), así como dos especies candidatas llamadas *Candidatus Chlamydia ibidis* y *Candidatus Chlamydia sanzinia* (Taylor-Brown *et al.*, 2016; Vorimore *et al.*, 2013).

Las ovejas infectadas liberan un gran número de *C. abortus* infecciosos en el momento del aborto o el parto, particularmente con la placenta y las secreciones uterinas, proporcionando así una fuente de infección. Las ovejas que han abortado, generalmente no vuelven a abortar por una infección por *C. abortus*. La evidencia reciente sugiere que la proporción de ovejas infectadas se reduce en la siguiente época de reproducción y solo se detectan niveles bajos de ADN clamidial durante el período de la periovulación y en el momento del parto, de modo que esto no tendría un impacto significativo en la epidemiología (Gutiérrez *et al.* 2011; Livingstone *et al.*, 2009).

3. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

La infección humana puede contraerse a partir de productos del aborto o el parto, o de cultivos de laboratorio manejados con descuido, con signos que varían desde una infección subclínica a una enfermedad aguda semejante a la gripe. Los cultivos y los tejidos que puedan estar infectados deberán manipularse aplicando los procedimientos de bioseguridad y bioprotección apropiados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Los casos reales de placentitis y aborto en humanos, causados por *C. abortus* de origen ovino/caprino, indican que existe un riesgo de contagio especial en las mujeres embarazadas que y no deben exponerse a las fuentes de infección (Sillis & Longbottom, 2011; Longbottom & Coulter, 2003).

4. Diagnóstico diferencial

Se necesita experiencia específica para distinguir el patrón difuso de necrosis e inflamación causado por la infección por *C. abortus* de la necrosis causada por *Toxoplasma gondii*, que se limita a los cotiledones. La diferenciación de otras causas infecciosas de aborto, como la brucelosis (véase el Capítulo 2.1.4), la coxielosis (véase el Capítulo 2.1.16) u otras infecciones bacterianas (*Campylobacter* [véase el Capítulo 2.9.3], *Listeria* [véase el Capítulo 2.9.6], *Salmonella* [véase el Capítulo 2.9.8]), se puede lograr llevando a cabo más pruebas de diagnóstico específicas de agente. Recientemente, otras especies de clamidias, como *C. pecorum* y *C. psittaci*, se han relacionado con abortos en los rumiantes (Berri *et al.*, 2009; Lenzko *et al.*, 2011).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del aborto enzoótico de las ovejas y su propósito

Método	Propósito					
	Determinar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección - vigilancia	Determinar el estado inmunitario de un animal o una población post-vacunación
Identificación del agente¹						
Frotis teñidos	–	–	–	+	–	n/a
Aislamiento de la bacteria	–	–	–	++	–	n/a
Detección de antígeno mediante IHC	–	–	–	++	+	n/a
PCR convencional	–	–	–	+++	++	n/a
PCR en tiempo real	–	–	–	+++	++	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
CF	+	+	+	+	+	+
ELISA	+++	++	+++	++	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado, validado para el fin indicado; ++ = método adecuado, pero puede precisar una validación posterior; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan considerablemente su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad; n/a = no aplicable.

IHC= inmunohistoquímica; PCR= reacción en cadena de la polimerasa; CF= fijación del complemento; ELISA= enzimoimmunoanálisis.

1. Identificación del agente

1.1. Frotis

Cuando la historia clínica del rebaño y el carácter de las lesiones de la placenta abortada sugieren un aborto enzoótico, se puede intentar un diagnóstico mediante el examen microscópico de frotis del vello coriónico o del corion adyacente. Los frotis se tiñen con la tinción de Maquiavelo modificada, la de Giemsa, la tinción diferencial para *Brucella*, la de Stamp o la tinción de Ziehl–Neelsen modificada (Stamp *et al.*, 1950). En casos positivos teñidos con el último método se puede ver mediante el examen microscópico con alta resolución un gran número de pequeños cuerpos elementales cocoides (300 nm) individualmente o en grupo teñidos de rojo y destacando sobre un fondo azul de restos celulares. Bajo iluminación de fondo oscuro, los cuerpos elementales presentan un color verde claro. Se pueden usar pruebas de inmunofluorescencia indirecta (FAT) con un antisuero o un anticuerpo monoclonal específicos para identificar *C. abortus* en frotis. Sin embargo, las pruebas basadas en la

1 Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son superiores a los frotis teñidos o a la FAT con respecto a la sensibilidad y la especificidad y, por lo tanto, deben aplicarse si están disponibles. Los frotis teñidos pueden ser útiles como una prueba de detección inicial, pero la confirmación por métodos moleculares es muy recomendable debido a la sensibilidad inferior de la tinción y la falta de especificidad de especie.

Si no se dispone de material placentario se pueden preparar frotis a partir de hisopos vaginales de ovejas que hayan abortado en las últimas 24 horas o de la lana húmeda de un feto recientemente abortado o de un cordero nacido muerto que no haya sido limpiado por su madre, o bien de contenido del abomaso de corderos abortados o nacidos muertos. En general, tales preparaciones contienen menos microorganismos que los frotis placentarios.

Por su morfología y propiedades tintoriales *C. abortus* se parece a *Coxiella burnetii* (véase el capítulo 2.1.16 *Fiebre Q*), que, en algunas circunstancias, puede provocar abortos y que origina la fiebre Q en los humanos. Se debe tener cuidado en diferenciar ambos microorganismos en casos en los que no exista un buen historial de signos anatomopatológicos placentarios inducidos por clamidias.

1.2. Aislamiento del agente – cultivo celular

El cultivo celular es el método de elección para el aislamiento del microorganismo. El agente causal de la clamidiosis ovina es zoonótico y, por tanto, los procesos de aislamiento e identificación deben llevarse a cabo aplicando los procedimientos de bioseguridad y biocontención apropiados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4).

Las muestras de tejido, como los cotiledones, las membranas placentarias, el pulmón o el hígado fetal, o los hisopos vaginales cuyos procedimientos de aislamiento se retrasen antes del aislamiento en el laboratorio, deben mantenerse en un medio de transporte adecuado. Para que la recuperación sea la óptima, estas muestras deben guardarse congeladas, preferiblemente a -80°C. El medio más satisfactorio es un medio con sacarosa/fosfato/glutamato o medio SPG (sacarosa [74,6 g/litro KH₂PO₄ [0,52 g/litro], K₂HPO₄ [1,25 g/litro], L-ácido glutámico [0,92 g/litro]) suplementado con suero fetal bovino – fracción V (1 g/litro), antibióticos (son adecuadas la estreptomycin y la gentamicina, pero no la penicilina) y un inhibidor fúngico. En general, se utiliza una proporción de tejido: medio de 1:10. De forma alternativa, se homogeneiza aproximadamente 1 g de tejido con arena estéril en 8 ml de medio de transporte.

Chlamydia abortus de origen ovino en muchos tipos celulares, pero las células McCoy, de mono verde de Búfalo (BGM) o de riñón de hámster neonato (BHK) son las que más se utilizan. Para el diagnóstico confirmativo, se suspenden en medio de crecimiento monocapas de células cultivadas a una concentración de 2×10^5 células/ml. Se depositan alícuotas de 2 ml de la suspensión en viales de fondo plano, cada una de las cuales contiene un único cubre de 12 mm. Después de incubar durante 24 horas a 37°C, se obtienen monocapas confluentes sobre el cubre. Se elimina el medio de crecimiento y se sustituye por 2 ml del inóculo problema, que a continuación se centrifuga a 2.500 – 3.500 **g** durante 30-60 minutos sobre la monocapa del cubre y se incuba a 37 °C y un 5% de CO₂ durante 2 horas. El inóculo se retira y se sustituye por medio de cultivo tisular sin suero o que contenga cicloheximida (0,5 µg/ml), y se incuba a 37 °C durante 2–3 días. Las monocapas sobre el cubre se fijan con metanol y se tiñen con Giemsa o los procedimientos de Giménez (Arens & Weingarten, 1981; Giménez, 1964), o se detectan mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos de especie o de género (Sachse *et al.*, 2009). Después de la fijación con metanol, los cultivos infectados contienen inclusiones intracitoplásmicas basófilas (Giemsa) o eosinófilas (Giménez) fluorescentes. Para la preparación de antígeno, se siguen procedimientos similares de cultivo de *C. abortus*.

1.3. Aislamiento del agente – embriones de pollo

Las muestras problema se preparan como suspensiones al 10% en caldo nutritivo que contenga estreptomycin (no penicilina) (200 µg/ml); se inoculan 0,2 ml de suspensión en el saco vitelino de embriones de 6 a 8 días, que luego se incubarán a 37 °C. Los embriones infectados mueren entre 4 y 13 días después de la inoculación. Los frotis preparados a partir de sus membranas del saco vitelino vascularizadas revelan un gran número de corpúsculos elementales.

1.4. Detección de antígeno en cortes de tejido

En los cortes histopatológicos, la detección del antígeno se puede lograr usando anticuerpos anti-*Chlamydiaceae* comerciales dirigidos contra lipopolisacárido (LPS) o MOMP (proteína principal de la

membrana externa) (Borel *et al.*, 2006). La inmunohistoquímica es una herramienta indispensable para mostrar la asociación entre el agente clamidial y las lesiones anatomopatológicas de los tejidos. Los anticuerpos específicos de especie o género en combinación con estreptavidina-biotina se usan para detectar el antígeno clamidial dentro de las lesiones histológicas de la placenta u órganos internos (principalmente pulmón e hígado) de fetos abortados (Sachse *et al.*, 2009).

Las inclusiones clamidiales intracelulares pueden demostrarse mediante tinción de cortes finos con Giemsa ($\leq 4 \mu\text{m}$) tomados de tejidos diana que se hayan fijado adecuadamente en líquidos tales como Bouin o Carnoy. Sin embargo, los procedimientos de tinción inmunológica no ambiguos descritos anteriormente son más adecuados.

1.5. Detección de ADN mediante PCR convencional, PCR en tiempo real y microchips de ADN

La amplificación del ADN clamidial por PCR para verificar la presencia de clamidias en muestras biológicas es el método de elección debido a la alta sensibilidad y especificidad de la PCR. Los protocolos de PCR convencional para la detección de ADN de *C. abortus* se dirigen al ARN ribosomal 16S-23S (Everett y Andersen, 1999) o a los genes *pmp* (Laroucau *et al.*, 2001) y se pueden combinar con análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para discriminar entre secuencias de ADN amplificadas de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum*.

La PCR en tiempo real se ha convertido en el método preferido de los laboratorios de diagnóstico debido a su alta especificidad, rapidez, rendimiento y facilidad de estandarización (Sachse *et al.*, 2009). Se recomienda un sistema jerárquico que incluya una PCR de cribado específica de *Chlamydiaceae* basada en las secuencias de ARN ribosomal 23S (Ehrlich *et al.*, 2006) y, si el resultado es positivo, seguida de una PCR específica de *C. abortus* basada en secuencias de la proteína de membrana externa (*ompA*) (Livingstone *et al.*, 2009; Pantchev *et al.*, 2009) o ensayos de hibridación de microchips de ADN (Sachse *et al.*, 2005). Tanto la PCR en tiempo real como los microchips de ADN han sido validados para la detección e identificación directa de microorganismos a partir de muestras clínicas (Borel *et al.*, 2008; Pantchev *et al.*, 2010).

Se han desarrollado PCR en combinación con RFLP o análisis de HRM (fusión de alta resolución) con el objetivo de diferenciar entre animales infectados naturalmente y animales vacunados (DIVA) (Laroucau *et al.*, 2010; Vorimore *et al.*, 2012; Wheelhouse *et al.*, 2010).

Tabla 1. PCR en tiempo real para el cribado y especificación de *C. abortus*

Referencia	Ehrlich <i>et al.</i> , 2006	Livingstone <i>et al.</i> , 2009	Pantchev <i>et al.</i> , 2009
Especificidad	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>C. abortus</i>	<i>C. abortus</i>
Diana	ARNr 23S	<i>ompA</i>	<i>ompA</i>
Tamaño del amplicón	111 pb	86 pb	82 pb
Cebador directo 5'–3'	CTG-AAA-CCA-GTA-GCT-TAT-AAG-CGG-T	GCG-GCA-TTC-AAC-CTC-GTT	GCA-ACT-GAC-ACT-AAG-TCG-GCT-ACA
Cebador inverso 5'–3'	ACC-TCG-CCG-TTT-AAC-TTA-ACT-CC	CCT-TGA-GTG-ATG-CCT-ACA-TTG-G	ACA-AGC-ATG-TTC-AAT-CGA-TAA-GAG-A
Sonda 5'–3'	FAM-CTC-ATC-ATG-CAA-AAG-GCA-CGC-CG-TAMRA	FAM-TGT-TAA-AGG-ATC-CTC-CAT-AGC-AGC-TGA-TCA-G-TAMRA	FAM-TAA-ATA-CCA-CGA-ATG-GCA-AGT-TGG-TTT-AGC-G-TAMRA
Condiciones de ciclado	95°C/10 minutos 45 x (95°C/15 segundos, 60°C/60 segundos)	95°C/10 minutos 45 x (95°C/15 segundos, 60°C/60 segundos)	95°C/10 minutos 45 x (95°C/15 segundos, 60°C/60 segundos)

2. Pruebas serológicas

Ovejas y cabras se examinan mediante pruebas serológicas en un plazo de tres meses tras el aborto o el parto. La infección se considera detectada cuando hay una respuesta de anticuerpos específicos de *C. abortus* sobre

todo durante la invasión placentaria activa por parte del agente patógeno en el último mes de la gestación y después de la bacteriemia que a menudo acompaña al aborto. Por consiguiente, el suero recogido tras el aborto revelará un aumento en el título de anticuerpos derivado de una infección actual o previa.

2.1. ELISA

Existen a la venta varios ELISA para el diagnóstico de *Chlamydia* en ovejas (consúltese información general en Sachse *et al.*, 2009). Se debe tener cuidado de seleccionar un ELISA apropiado para cada problema de diagnóstico teniendo en cuenta las diferentes especificidades y sensibilidades. Los ELISA basados en antígenos de LPS o EB (corpúsculos elementales) no permiten diferenciar entre los animales infectados por *C. pecorum* y los infectados por *C. abortus*, pero se demostró que son herramientas de detección primaria más sensibles para la EAE que la prueba de la CF. Se puede lograr una detección específica de anticuerpos anti-*C. abortus* mediante el uso de ELISA basados en péptidos sintéticos de MOMP, MOMP recombinante (Salti-Montesanto *et al.*, 1997) o POMP90 (proteína de membrana externa polimórfica) (Longbottom *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2009). Más recientemente, se ha comercializado un nuevo ELISA indirecto basado en POMP90 y se ha demostrado que es sensible y específico de *C. abortus*, en particular para la diferenciación de animales infectados por esta bacteria (Anon, 2015; Essig y Longbottom, 2015).

2.2. Prueba de la fijación del complemento

La fijación del complemento (CF) ha sido tradicionalmente el procedimiento más utilizado para detectar EAE. Sin embargo, la reactividad antigénica cruzada entre *C. abortus* y *C. pecorum*, que es endémica en pequeños rumiantes, así como con algunas bacterias gramnegativas (como *Acinetobacter*), puede dar lugar a falsos positivos. Esto se debe a que el antígeno clamidial contiene LPS como componente inmunodominante, que es común a todas las especies de *Chlamydiaceae*. Además, se ha demostrado que la CF es menos sensible que las pruebas alternativas. Por lo tanto, la CF ya no se recomienda como método de elección para el diagnóstico serológico de EAE, pero podría utilizarse para el diagnóstico a nivel de rebaño si no se dispone de herramientas alternativas y se tienen en cuenta las limitaciones mencionadas anteriormente.

El antígeno se prepara a partir de las membranas del saco vitelino densamente infectadas, que se obtienen de los embriones de pollo inoculados de la misma manera que para el aislamiento del microorganismo a partir del material de campo. La preparación del antígeno debe realizarse en cabinas de bioseguridad con las precauciones adecuadas para evitar la infección humana (véase el capítulo 1.1.4). Las membranas cortadas y homogeneizadas se suspenden en tampón fosfato, pH 7,6, a razón de 2 ml por membrana. Después de eliminar los restos, el sobrenadante se centrifuga a 10.000 g durante 1 hora a 4°C, el sedimento se resuspende luego en un pequeño volumen de solución salina y se examina un frotis de esta preparación para comprobar que haya un alto contenido en clamidias. La suspensión se mantiene 20 minutos en un baño con agua hirviendo o se esteriliza en autoclave, y se añade azida sódica (0,3%) como conservante. El antígeno también se puede preparar a partir de los cultivos celulares infectados por *C. abortus*. Las monocapas infectadas se suspenden en tampón fosfato, pH 7,6, y las células se lisan mediante homogeneización o ultrasonificación. Se eliminan los residuos macroscópicos y el proceso es similar al de la preparación del antígeno a partir de los sacos vitelinos infectados. En los dos casos, las pruebas de CF con complemento y antisueros estandarizados permitirán una dilución de trabajo óptima para cada lote de antígeno. Existe a la venta antígeno para realizar la prueba de la CF en sueros de rumiantes.

Las muestras se analizan a diluciones a la mitad, de entre 1/32 y 1/512. Los títulos de CF se expresan como la dilución de suero más alta que produce un 50% o menos de hemólisis: el 50% de la hemólisis se puntúa como 2+ y el 0% de la hemólisis se puntúa como 4+. Se considera que un título de 4+ a una dilución de 1/32 o superior es positivo, mientras que un título de 2+ a una dilución de 1/32 es ambiguo (Stamp *et al.*, 1950).

Ninguna de las pruebas serológicas disponibles hasta la fecha permite diferenciar entre los títulos derivados de una vacunación y los adquiridos como resultado de una infección natural (pruebas DIVA).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Actualmente, están disponibles en el mercado dos tipos de vacunas (las vacunas vivas atenuadas y las no atenuadas, que se han de administrar por vía intramuscular o por vía subcutánea al menos 4 semanas antes del cruce como medio para prevenir abortos. La vacuna recombinante de varios componentes contra *C. abortus* sigue siendo un objetivo de la futura investigación de las vacunas clamidiales (Longbottom & Livingstone, 2006).

Las vacunas inactivadas pueden prepararse a partir de los sacos vitelinos infectados o de cultivos celulares (Jones *et al.*, 1995) e incorporar microorganismos completos o fracciones de los mismos (Tan *et al.*, 1990), utilizando precauciones apropiadas de bioprotección para evitar la infección en los humanos (véase el capítulo 1.1.4). El operario debe tener cuidado al manipular las vacunas inactivadas disponibles comercialmente en las que se incorporan adyuvantes en suspensión de aceites minerales, ya que la autoinyección puede provocar una inflamación local grave y necrosis tisular. La vacuna comercial viva y atenuada contiene una cepa mutante del microorganismo obtenida por inducción química y sensible a la temperatura (Rodolakis, 1986). Ese microorganismo crece a 35°C pero no a 39,5°C, que es la temperatura corporal de las ovejas (Rodolakis, 1986). Esta vacuna se proporciona liofilizada, y debe reconstruirse en diluyente inmediatamente antes de administrarse. El operario deberá tener cuidado al manejar y administrar la vacuna viva, especialmente si se trata de una persona inmunocomprometida o de una mujer embarazada. Es importante que las vacunas vivas no se administren a los animales a los que se esté tratando con antibióticos, sobre todo con tetraciclinas. Las vacunas inactivadas son inocuas aunque se administren durante la gestación, mientras que las vivas no pueden emplearse en animales gestantes.

Cada una desarrolla un papel en el control de la enfermedad, pero ninguna confiere protección total contra el desafío ni reduce por completo la diseminación de los microorganismos infecciosos. Sin embargo, los animales vacunados expuestos a la infección, experimentan un número significativamente menor de abortos y una reducción de la excreción de clamidias durante un período que como mínimo abarca dos a tres gestaciones con posterioridad a la vacunación. Se ha afirmado que la vacuna viva podría ayudar a erradicar de la enfermedad (Nieffeld, 2001). Además, la cepa 1B de la vacuna viva se ha detectado en las placentas de animales vacunados que han abortado como consecuencia del AEO, lo cual sugiere que la vacuna podría intervenir como causa de enfermedad (Wheelhouse *et al.*, 2010), pero a pesar de esto, el uso de la vacuna viva sigue siendo el método más eficaz de proteger frente a la enfermedad (Essig & Longbottom, 2015; Stuen & Longbottom, 2011).

La vacuna guardada en refrigeración (5±3°C) debe permanecer estable durante al menos 1 año. No se dispone de datos firmes, pero se recomienda la revacunación cada 1–3 años, según el riesgo de exposición.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Son adecuadas uno o más cepas a partir de aborto ovino que crezcan repetidamente de modo productivo en el substrato elegido y que permitan establecer una reserva de inóculo con un número bajo de pases. Alternativamente, se puede usar una cepa que se haya adaptado al embrión de pollo mediante muchos pases (más de 100). Aunque la adaptación al embrión puede disminuir la virulencia de la cepa en las ovejas, no hay pruebas de que tal cambio reduzca su eficacia protectora como vacuna inactivada.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Antes de inocular un gran número de embriones o cultivos celulares, debe verificarse la viabilidad y ausencia de contaminación (por ejemplo, por otros agentes patógenos, hongos, micoplasmas, toxinas, etc.) de la reserva de inóculo. Puede ser conveniente recoger todas las células en lotes manejables independientes. En este caso, debe titularse la infectividad de una alícuota de cada lote por separado para garantizar que todos ellos cumplen los requisitos (véase abajo). Se guarda en refrigeración.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Para la producción, se infectan monocapas celulares o embriones de pollo con *C. abortus*. Una vez que se obtiene la suspensión final, se toma una alícuota para titular la infectividad. El resto se trata con formalina a una concentración final de 0,4% y se almacena hasta que las pruebas de esterilidad confirmen que la inactivación es completa.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

La masa inactivada se centrifuga y se resuspende en solución salina tamponada con fosfato que contenga un 0,2% de formalina hasta un volumen que represente un título infectivo de preinactivación de aproximadamente 10^8 unidades infecciosas/ml. Normalmente la suspensión acuosa se mezcla con un aceite como adyuvante, directamente o tras la precipitación con alumbre potásico ($\text{AlK}[\text{SO}_4]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). También se puede añadir un conservante, como tiomerosal al 0,01%.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los principales requisitos son asegurar un crecimiento suficiente de *C. abortus*, evitar las infecciones indeseables del sustrato del cultivo, completar la inactivación y concienciar del riesgo biológico a quienes trabajan en el proceso.

2.2.4. Pruebas en lotes del producto final

En cada lote individual de la vacuna fabricada debe comprobarse la esterilidad, la seguridad y la potencia.

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se encuentran en el capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

La inoculación subcutánea de dos o más ovejas seronegativas con el doble de la dosis estándar de la vacuna fabricada no debe provocar reacciones sistémicas, pero las vacunas con adyuvante oleoso pueden causar una hinchazón indolora en el punto de inoculación.

iii) Potencia del lote

En la actualidad, la potencia se estima por la aparición de una respuesta serológica en ovejas no vacunadas previamente a las que se administra por vía subcutánea 1 ml de vacuna. Se comparan las muestras de sangre tomadas antes y 28 días después de la vacunación. Finalmente, la potencia tiene que comprobarse mediante un estudio de vacunación-desafío controlado o evaluando el rendimiento en condiciones de campo, pero no se ha establecido todavía una correlación *in vitro* de la eficacia protectora.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

Véase el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*.

2.3.2. Requisitos de eficacia

Véase el Capítulo 1.1.8.

2.3.3. Estabilidad

Véase el Capítulo 1.1.8.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Actualmente no se utiliza ninguna vacuna para esta enfermedad desarrollada mediante ingeniería genética.

BIBLIOGRAFÍA

AITKEN I.D. & LONGBOTTOM D. (2007). Chlamydial abortion. *In: Diseases of Sheep Fourth Edition*, Aitken I.D., ed. Blackwell Scientific Ltd., Oxford, UK, 105-112.

ANON (2015). Diagnostic test for ovine chlamydiosis. *Vet. Rec.*, **176**, 393.

ARENS M. & WEINGARTEN M. (1981). Vergleichende Untersuchungen an Buffalo Green monkey (BGM) Zellen und Mäusen zur Isolierung von *Chlamydia psittaci* aus Kot und Organproben von Vögeln. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **28**, 301–309.

BERRI M., REKIKI A., BOUMEDINE K.S. & RODOLAKIS A. (2009). Simultaneous differential detection of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum*, and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC. Microbiol.*, **9**, 130.

BOREL N., KEMPF E., HOTZEL H., SCHUBERT E., TORGERSON P., SLICKERS P., EHRLICH R., TASARA T., POSPISCHIL A. & SACHSE K. (2008). Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay – a validation study. *Mol. Cell. Probes*, **22**, 55–64.

BOREL N., THOMA R., SPAENI P., WEILENMANN R., TEANKUM K., BRUGNERA E., ZIMMERMANN D.R., VAUGHAN L. & POSPISCHIL A. (2006). *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Vet. Pathol.*, **43**, 702–708.

BUXTON D., ANDERSON I.E., LONGBOTTOM D., LIVINGSTONE M., WATTEGADERA S. & ENTRICAN G. (2002). Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.*, **127**, 133–141.

EHRLICH R., SLICKERS P., GOELLNER S., HOTZEL H. & SACHSE K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell. Probes.*, **20**, 60–63.

ENTRICAN G. (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 79–94.

ESSIG A. & LONGBOTTOM D. (2015). *Chlamydia abortus*: New aspects of infectious abortion in sheep and potential risk for pregnant women. *Curr. Clin. Microbiol. Reports*, **2**, 22–34.

EVERETT K.D. & ANDERSEN A.A. (1999). Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR RFLP. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 803–813.

GIMENEZ D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.*, **39**, 135–140.

GUTIERREZ J., WILLIAMS E.J., O'DONOVAN J., BRADY C., PROCTOR A.F., MARQUES P.X., WORRALL S., NALLY J.E., MCELROY M., BASSETT H.F., SAMMIN D.J. & MARKEY B.K. (2011). Monitoring clinical outcomes, pathological changes and shedding of *Chlamydomphila abortus* following experimental challenge of periparturient ewes utilizing the natural route of infection. *Vet. Microbiol.*, **147**, 119–126.

JONES G.E., JONES K.A., MACHELL J., BREBNER J., ANDERSON I.E. & HOW S. (1995). Efficacy trials with tissue-culture grown, inactivated vaccines against chlamydial abortion in sheep. *Vaccine*, **13**, 715–723.

LAROUCAU K., SOURIAU A. & RODOLAKIS A. (2001). Improved sensitivity of PCR for *Chlamydomphila* using *pmp* genes. *Vet. Microbiol.*, **82**, 155–164.

LAROUCAU K., VORIMORE F., SACHSE K., VRETOU E., SIARKOU V.I., WILLEMS H., MAGNINO S., RODOLAKIS A. & BAVOIL P.M. (2010). Differential identification of *Chlamydomphila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine*, **28**, 5653–5656.

LENZKO H., MOOG U., HENNING K., LEDERBACH R., DILLER R., MENGE C., SACHSE K., SPRAGUE L.D. (2011). High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Vet. Res.*, **7**, 29.

LIVINGSTONE M., WHEELHOUSE N., MALEY S.W. & LONGBOTTOM D. (2009). Molecular detection of *Chlamydomphila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Vet. Microbiol.*, **135**, 134–141.

- Longbottom D. & Coulter L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.*, **128**, 217–244.
- Longbottom D., Fairley S., Chapman S., Psarrou E., Vretou E. & Livingstone M. (2002). Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydomphila abortus*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4235–4243.
- Longbottom D. & Livingstone M. (2006). Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Vet. J.*, **171**, 263–275.
- Longbottom D., Livingstone M., Maley S., Van der Zon A., Rocchi M., Wilson K., Wheelhouse N., Dagleish M., Aitchison K., Wattedegedera S., Nath M., Entrican G. & Buxton D. (2013). Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *PLoS One*, **8**, e57950.
- Nietfeld J.C. (2001). Chlamydial infections in small ruminants. USA. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **17**, 301–314.
- Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J. & Sachse K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila abortus* from tissue samples. *Vet. J.*, **181**, 145–150.
- Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J. & Sachse K. (2010). Detection of all *Chlamydomphila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **33**, 473–484.
- Rodolakis A. (1986). Use of a live temperature-sensitive vaccine in experimental and natural infections. In: *Chlamydial Diseases of Ruminants*, Aitken I.D., ed. Commission of the European Communities, Luxembourg, 71–77.
- Sachse K., Hotzel H., Slickers P., Ellinger T. & Ehrlich R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydomphila* spp. *Mol. Cell. Probes*, **19**, 41–50.
- Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A. & Longbottom D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (Review). *Vet. Microbiol.*, **135**, 2–21.
- Sachse K., Bavoil P.M., Kaltenboeck B., Stephens R.S., Kuo C.C., Rosello-Mora R. & Horn M. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst. Appl. Microbiol.*, **38**, 99–103.
- Salti-Montesanto V., Tsoli E., Papanassiliou P., Psarrou E., Markey B.M., Jones G.E. & Vretou E. (1997). Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 228–235.
- Sillis M. & Longbottom D. (2011). Chlamydiosis. In: *Oxford Textbook of Zoonoses, Biology, Clinical Practice and Public Health Control*, Palmer S.R., Lord Soulsby, Torgerson P.R. & Brown D.W.G., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, 146–157.
- Stamp J.T., McEwen A.D., Watt J.A.A. & Nisbet D.I. (1950). Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec.*, **62**, 251–254.
- Stuen S. & Longbottom D. (2011). Treatment and control of *Chlamydial* and *Rickettsial* infections in sheep and goats. *Vet. Clin. Food Anim.*, **27**, 213–233.
- Tan T.W., Herring A.J., Anderson I.E. & Jones G.E. (1990). Protection of sheep against *Chlamydia psittaci* infection with a subcellular vaccine containing the major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, **58**, 3101–3108.
- Taylor-Brown A., Bachmann N.L., Borel N. & Polkinghorne A. (2016). Culture-independent genomic characterisation of Candidatus *Chlamydia sanzina*, a novel uncultivated bacterium infecting snakes. *BMC Genomics*, **17**, 710.
- Vorimore F., Cavanna N., Vicari N., Magnino S., Willems H., Rodolakis A., Siarkou V.I. & Laroucau K. (2012). High-resolution melt PCR analysis for rapid identification of *Chlamydia abortus* live vaccine strain 1B among *C. abortus* strains and field isolates. *J. Microbiol. Methods*, **90**, 241–244.
- Vorimore F., Hsia R.C., Huot-Creasy H., Bastian S., Deruyter L., Passet A., Sachse K., Bavoil P., Myers G. & Laroucau K. (2013). Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *Plos One*, **8**, e74823.
- Wheelhouse N., Aitchison K., Laroucau K., Thomson J. & Longbottom D. (2010). Evidence of *Chlamydomphila abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine*, **28** (35), 5657–5663.

WILSON K., LIVINGSTONE M. & LONGBOTTOM D. (2009). Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. *Vet. Microbiol.*, **135**, 38-45.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para el Aborto enzoótico de las ovejas (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para el Aborto enzoótico de las ovejas.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.