

CLAMIDIOSIS PORCINA: ESTUDIO PRELIMINAR EN LA REGIÓN DE MURCIA

Chlamydial infection in swine: A preliminary study in the region of Murcia (Spain)

Buendía, A.J.; Salinas, J.; Cano, L.D.* y Cuello, F.

Departamento de Patología Animal (Microbiología e Inmunología). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30071 Murcia, Spain.

* Veterinario clínico.

Recibido: 26 Marzo 1996

Aceptado: 30 Abril 1996

RESUMEN

En el presente estudio se ha investigado el posible papel de las bacterias del género *Chlamydia* en una explotación porcina con una historia clínica de abortos. Posteriormente se ha realizado una encuesta serológica, utilizando una técnica ELISA, en una serie de explotaciones de la Región de Murcia elegidas al azar. Hemos confirmado la presencia de clamidias como causantes de los problemas de aborto de la explotación en estudio. Los resultados de la encuesta serológica han mostrado una seroprevalencia por individuos del 49,3% (502/1018), mientras que la seroprevalencia por explotaciones ha sido del 47,1% (16/34).

Palabras claves: *Chlamydia*, Cerdo, ELISA, Abortos.

ABSTRACT

In the present study have been evaluated the role of *Chlamydia* as pathogen in a swine herd with a clinical history of abortions. In addition, it have been accomplished a serologic survey by ELISA in 34 herds randomly selected. The results confirmed the presence *Chlamydia* as the etiological agent of the abortions. The survey results showed an individual seroprevalence of 49.3% (502/1018) and a herd seroprevalence of 47.1% (16/34).

Key words: *Chlamydia*, Swine, ELISA, Abortion.

INTRODUCCIÓN

El género *Chlamydia* está constituido por bacterias intracelulares obligadas, que presentan un ciclo evolutivo único entre los Procariotas. Estos microorganismos poseen dos formas evolutivas, una forma infecciosa que penetra en la célula eucariota, denominada cuerpo elemental (CE), y una forma metabólicamente activa o cuerpo reticular (CR), que se divide por fisión binaria para dar lugar a una microcolonia o inclusión clamidial. Dentro del género *Chlamydia* existen tres especies clásicas; dos de ellas son patógenas para el hombre, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*, y la otra es patógena tanto para el hombre como para numerosas especies animales, *C. psittaci*. Recientemente ha sido propuesta una cuarta especie, *C. pecorum*, a partir de cepas de baja virulencia aisladas de rumiantes (FUKUSHI e HIRAI, 1992) o de cerdos (STORZ *et al.*, 1994).

La clamidiosis es una infección ampliamente difundida en el reino animal, afectando a numerosas especies tanto aviares como mamíferas. En el caso de los mamíferos, tienen especial interés las clamidiosis de los pequeños rumiantes, debido a las fuertes pérdidas económicas que provoca el aborto inducido por *C. psittaci* (CUELLO *et al.*, 1992). Sin embargo, en el resto de especies mamíferas de interés veterinario, excepto en el gato donde provoca una queratoconjuntivitis asociada normalmente a una grave neumonía (WILLS *et al.*, 1988), no está todavía suficientemente estudiado el papel de *C. psittaci* y *C. pecorum* como agentes patógenos.

En el cerdo se han asociado clásicamente las clamidias a la infección secundaria de animales infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, agravando el cuadro pulmonar junto a otras bacterias pertenecientes a algunos géneros como *Pasteurella* y *Haemophilus*. No obstante, se ha demostrado que las clamidias son capaces de provocar lesiones pulmonares, en concreto neumonía exudativa, actuando como patógenos primarios en una infección experimental (HARRIS

et al., 1984). Además, se han encontrado clamidias como causantes de afecciones genitales en verracos (uretritis y orquitis) (SARMA *et al.*, 1983), abortos y mortalidad perinatal en cerdas (WOOLLEN *et al.*, 1990), procesos entéricos (NIETFELD *et al.*, 1993) así como en conjuntivitis y queratoconjuntivitis (ROGERS *et al.*, 1993). La especie clamidial que normalmente se asocia a las infecciones porcinas es *C. pecorum*, sin embargo ciertos autores (STORZ *et al.*, 1994) han aislado cepas porcinas con características biológicas semejantes a las de *C. trachomatis*, lo que concede a estos aislamientos un interés no sólo clínico, sino también taxonómico.

El objetivo de este trabajo ha sido, en primer lugar, constatar la presencia de infección clamidial en un colectivo porcino con un historial clínico de abortos y mortalidad perinatal, donde se habían descartado las etiologías más usuales de estos procesos en la especie porcina. Con posterioridad y ante la total falta de información acerca de la incidencia de este microorganismo en nuestro país, y en particular en nuestra Región, hemos puesto a punto una técnica de tipo ELISA para realizar una encuesta serológica inicial, que sirva de base a posteriores estudios epidemiológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras: Escobillones vaginales

Se han recogido muestras vaginales de siete cerdas abortadas en el último tercio de gestación, la toma de éstas se ha llevado a cabo con escobillones vaginales entre los días 2-6 post-aborto.

Muestras: Sueros

Se han analizado 1.018 muestras de sueros pertenecientes a 34 explotaciones de la Región de Murcia, seleccionadas aleatoriamente. El número medio de sueros por explotación fue de

30, con un máximo de sueros de 84 y un mínimo de 10. Los sueros fueron remitidos por el Laboratorio Agrario Regional (L.A.R.)¹. Como suero control positivo se utilizó una mezcla de sueros obtenidos de una explotación porcina con una historia clínica de abortos y mortalidad perinatal y que presentaban títulos de 1/160 o superiores para la reacción de fijación del complemento (RCF) y de 1/320 o superiores para la inmunofluorescencia indirecta (IFI). La toma de muestras de sueros se realizó dentro de la semana posterior al aborto. Como sueros control negativo se utilizaron sueros cedidos por la granja experimental del INRA en Nouzilly (Francia); estos sueros procedían de lechones y tanto éstos como sus madres fueron analizados previamente y resultaron negativos a la clamidiosis, tanto mediante RFC como mediante IFI. Estas dos técnicas utilizadas para analizar tanto los sueros control positivos como los negativos han sido descritas en anteriores publicaciones (CUELLO *et al.*, 1992; SALINAS *et al.*, 1993).

Bacterioscopia

A partir de las improntas realizadas con los escobillones utilizados en las cerdas abortadas se utilizó una técnica tintorial clásica, la de STAMP *et al.*, (1950); posteriormente se realizó una IFI para detectar antígenos (SALINAS *et al.*, 1995), utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal AD5A8 (SOURIAU *et al.*, 1994) dirigido contra el lipopolisacárido de membrana, antígeno común a todas las especies del género *Chlamydia*.

ELISA indirecta

Para la realización de la técnica ELISA indirecta, hemos seguido el protocolo de CEVENINI *et al.*, (1989) para el estudio serológico en

pequeños ruminantes y que utilizaba como antígeno CE purificados.

Como antígeno se ha utilizado la cepa de *C. psittaci* AB7 (cedida por la Dra. Rodolakis del INRA-Nouzilly) aislada de un aborto ovino. Esta cepa ha sido propagada mediante inoculación en sacos vitelinos de embriones de pollo de 7 días. La purificación se realizó siguiendo el método de CALDWELL *et al.*, (1981) con algunas modificaciones. Brevemente, los sacos vitelinos obtenidos, una vez muertos los embriones, se sometieron a un proceso de ruptura con microesferas de vidrio estériles, el resultado se resuspendió en tampón fosfato-salino (PBS), pH 7,2, (3 ml por cada saco vitelino) y se centrifugó a 500 g durante 10 minutos para separar los restos celulares de mayor tamaño por un lado y la fracción lipídica por otro. La porción intermedia resultante se colocó sobre una solución de 8 ml de Renografin 76® (ditriazoato de meglumina y ditriazoato sódico) (Schering) al 35% en PBS y se centrifugó en un rotor Beckman SW28 a 43.000 g durante una hora a 4°C. El precipitado resultante se recogió en 3 ml de PBS y se colocó sobre un gradiente discontinuo de Renografin en PBS, consistente en 5 ml al 62%, 8 ml al 40% y 13 ml al 30%, este gradiente se centrifugó a 43.000 g durante una hora a 4°C. La banda localizada en la interfase entre el 62% y el 40% se recogió (5 ml), combinándose con 15 ml de PBS y centrifugándose de nuevo a 43.000 g durante una hora a 4°C. El precipitado final resultante con las clamidias purificadas se diluyó al 1/5 en PBS adicionado con sacarosa (0,2 M) y se alicuotó y almacenó a -70°C hasta el momento de su empleo.

Para la puesta a punto de la técnica se emplearon diferentes diluciones del antígeno (1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000) en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) que se distribuyeron a razón de 100 µl por pocillo en las placas de ELISA de 96 pocillos (Costar), dejándose durante 18 horas en agitación continua (100 rpm) a 4°C. Una vez antigenadas las placas se realizó un bloqueo de las uniones inespecíficas

¹ Actualmente LAYMA (Laboratorio Agrario y del Medio Ambiente).

añadiendo 100 ml por pocillo de PBS con un 5% de leche descremada (PBS-LD) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 100 µl/pocillo de las diferentes diluciones en PBS-LD (1/25, 1/50, 1/100, 1/200) de los sueros controles, incubándose durante una hora a 37°C. Tras esto se lavaron las placas tres veces durante 5 minutos cada vez, utilizándose como solución lavadora PBS con un 0,05% de Tween-20. Se añadió posteriormente a cada pocillo 100 ml de suero anti-IgG de cerdo, obtenido en cabra, conjugado con la enzima peroxidasa (The Binding Site), y diluido en PBS-LD siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (1/2000), y se dejó incubar durante una hora a 37°C. A continuación se lavó de nuevo de la forma antes indicada. Como sustrato de la reacción enzimática se utilizó ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS) en un tampón citrato (pH 4) con 200 ml/100 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 33%. De esta mezcla se añadieron 150 ml a cada pocillo. Tras 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, se leyeron los resultados en un espectrofotómetro Titertek Multiskan® a 414 nm.

A partir de los sueros negativos se calculó el umbral de positividad para ELISA, utilizando la fórmula de MARKEY *et al.*, (1993): media de las densidades ópticas de los sueros negativos más 3,5 veces su desviación típica. Aplicando esta fórmula en nuestra experiencia situamos el umbral de positividad a partir de una densidad óptica de 0,400.

El mismo protocolo es el utilizado para la encuesta serológica, empleando el antígeno y el suero problema a las diluciones óptimas establecidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bacterioscopia

Todas las muestras procedentes de los escobillones vaginales de las cerdas abortadas resul-

taron ser positivas a la tinción de Stamp, apareciendo las típicas inclusiones de *Chlamydia* en el interior de las células. Igualmente fueron positivas a la inmunofluorescencia indirecta, detectándose el LPS clamidial. Hasta el momento, y debido a la alta tasa de contaminación bacteriana de las muestras y a la propia dificultad que entraña el cultivo de las cepas porcinas de *Chlamydia* (STORZ *et al.*, 1994), donde se requieren entre 10 y 12 pases ciegos (ANDERSEN y ROGERS, 1994), no nos ha sido posible el aislamiento de la cepa causante del cuadro abortivo.

Puesta a punto de la técnica ELISA

En primer lugar comparamos los resultados obtenidos con las diferentes diluciones tanto del suero control positivo (Figura 1.A), como del control negativo (Figura 1.B) con diferentes diluciones del antígeno purificado. Posteriormente se llevó a cabo un control de las posibles reacciones inespecíficas (ruido de fondo), cuando no se colocaba en el pocillo el antígeno clamidial (Figura 2). A la luz de estos datos establecimos que la dilución óptima de los sueros para su análisis, o lo que es lo mismo, aquella que nos proporciona una mayor reacción con un mínimo ruido de fondo, es la dilución 1/100.

Seguidamente se calculó la dilución óptima del antígeno en relación con la dilución óptima de los sueros (Figura 1). En este caso, y teniendo en cuenta que la producción del antígeno es un proceso relativamente complejo, nos hemos inclinado por la 1/4000, aunque la dilución 1/2000 ofrecía unas densidades ópticas algo superiores. Hay que señalar que nos movemos en un margen muy amplio entre los sueros negativos y los positivos, lo que nos permite estas combinaciones de dilución del suero y del antígeno con la seguridad de no alterar la eficacia de la técnica.

Encuesta serológica

Los resultados de las densidades ópticas obtenidas en los diferentes sueros quedan refleja-

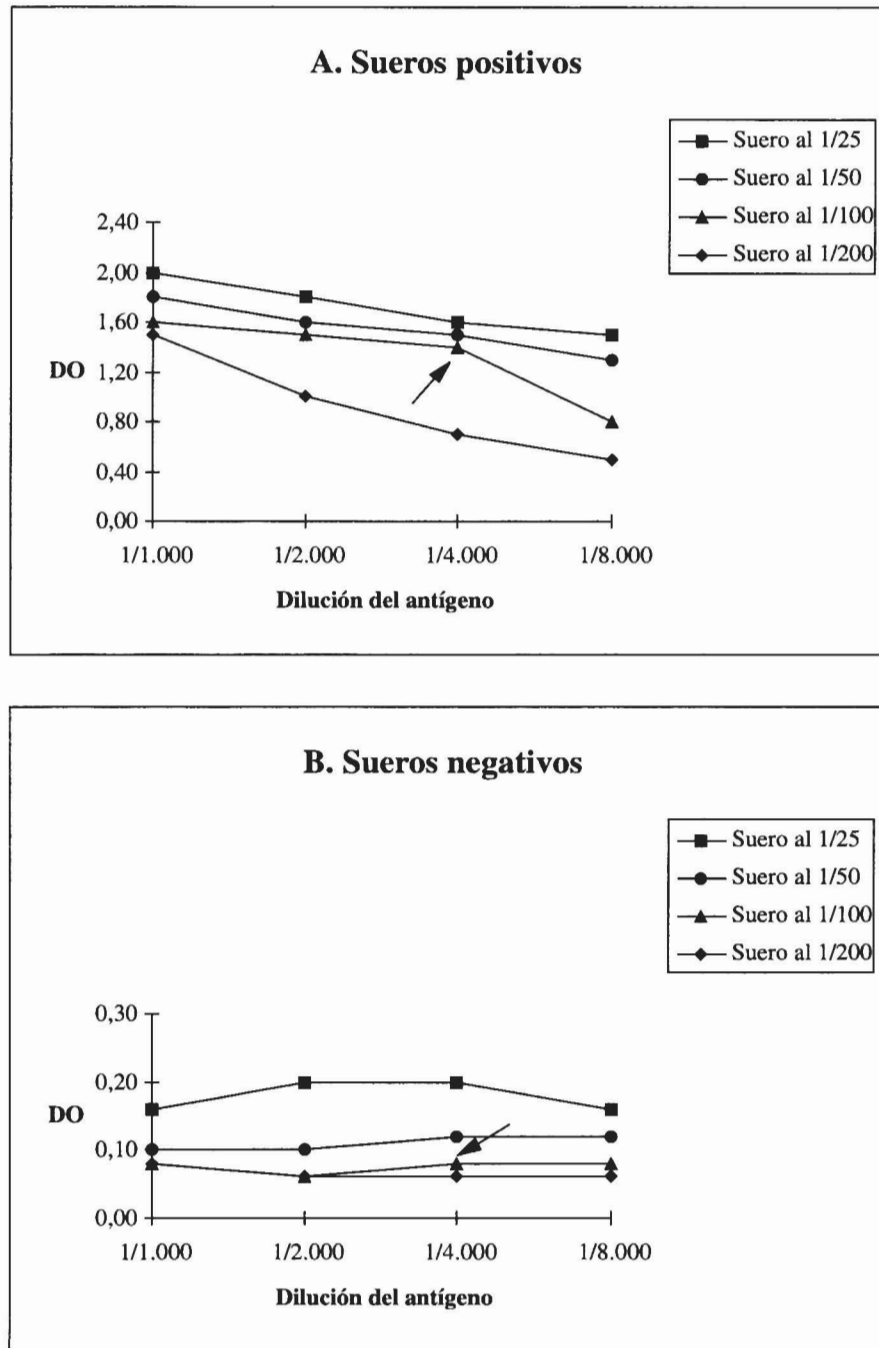


FIGURA 1. Cálculo de la dilución óptima para el antígeno y para el suero. A. Sueros positivos. B. Sueros negativos. La flecha indica el valor elegido. DO: Densidad óptica.

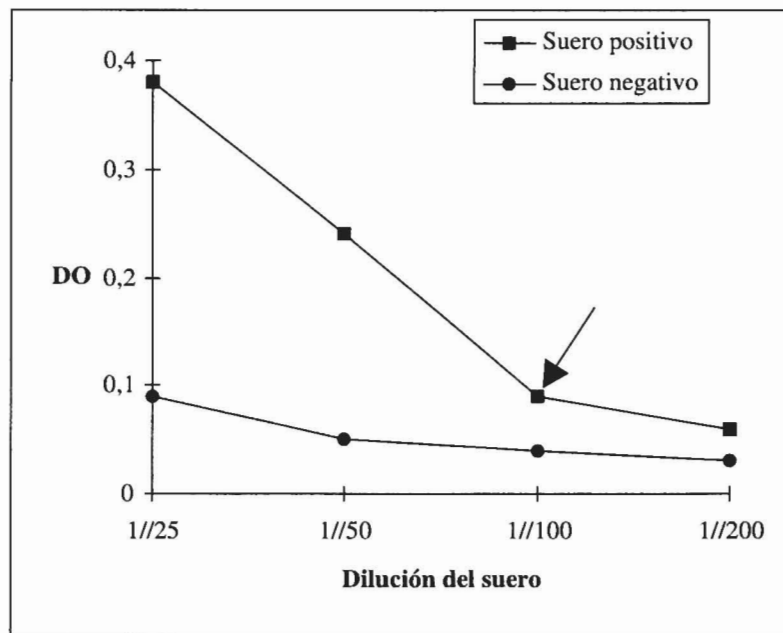


FIGURA 2. Control del ruido de fondo de los sueros positivos y negativos cuando las placas no se antigenan. La flecha señala la dilución óptima del suero. DO: Densidad óptica.

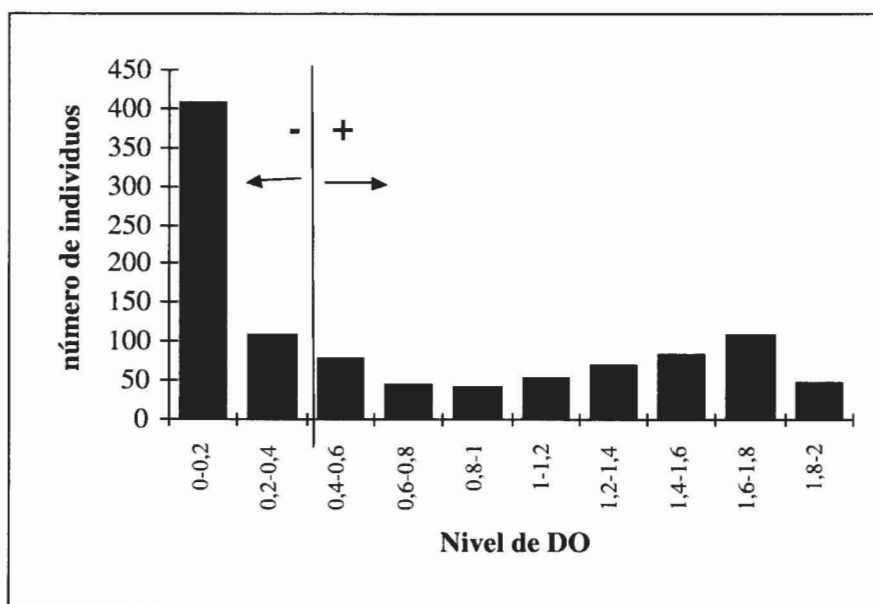


FIGURA 3. Resultados de la encuesta serológica, distribuidos por valores de densidad óptica (DO), obtenidos con la técnica ELISA.

dos en el histograma de la figura 3. Aplicando, como hemos referido anteriormente, un umbral de positividad de 0,400, el porcentaje de sueros positivos es del 49,3% (502/1018), cifra bastante alta si tenemos en cuenta que en la única encuesta serológica (HARRIS, 1976) de la que tenemos noticia en Europa, el porcentaje de positivos fue del 16%. Sin embargo, esta encuesta fue realizada mediante la prueba de fijación del complemento, y esta prueba puede presentar bastantes problemas de sensibilidad cuando se trabaja con sueros de títulos bajos. Es posible incluso, que al igual que sucede con los pequeños rumiantes (RODOLAKIS y SOURIAU, 1989), los cerdos presenten infecciones inaparentes a nivel intestinal que compliquen el diagnóstico serológico de los casos de significación clínica. Es por tanto necesario intentar relacionar la presencia de anticuerpos contra *Chlamydia* con la aparición de procesos patológicos asociados con esta bacteria (conjuntivitis, abortos o neumonías), hecho que, hasta el momento, sólo lo hemos podido constatar en una explotación, donde la existencia de un grave problema de abortos vino acompañado de una fuerte reacción serológica contra *Chlamydia*, detectada tanto por RFC e IFI como por nuestra técnica ELISA.

La seroprevalencia por explotaciones es del 47,1% (16/34), siendo de destacar la elevada presencia de seropositivos en las explotaciones afectadas, ya que en 12 de estas 16, más del 80% de las muestras de suero manifestaron esta característica, mientras que sólo en una de las explotaciones, los positivos fueron menos del 20% de los sueros analizados. Estos datos coinciden con las características de la infección clamidial en los pequeños rumiantes, donde los animales que han padecido la enfermedad quedan como portadores durante un período más o menos largo de tiempo con altos títulos de anticuerpos y excretando clamidias, siendo la causa de la perpetuación de la infección en el colectivo y de la aparición de nuevos casos clínicos en animales que entran en contacto con el microorganismo por primera vez.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al L.A.R, en la persona de su director en el período de la toma de muestras, J.R. Jara, la ayuda prestada. Así mismo, agradecemos la colaboración prestada por A. Souriau del equipo de Chlamydiosis del INRA de Nouzilly (Francia) en los intentos de aislamiento de las cepas de *Chlamydia*, así como por los sueros controles negativos cedidos.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSEN, A.A. y ROGERS, D.G. 1994: Characterization of *Chlamydia psittaci* isolates from swine. *Proceedings of the 8th International Symposium on Human Chlamydial Infection*. Chantilly (Francia). pp. 578-581.
- CALDWELL, H.D.; KROMHOUT, J. y SCHACHTER, J. 1981: Purification and partial characterization of the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 44: 306-314.
- CEVENINI, R.; MORONI, A.; SAMBRI, V.; PERINI, S. y LA PLACA, M. 1989: Serological response to chlamydial infection in sheep, studied by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *FEMS Microbiol. Immunol.* 47: 459-465.
- CUELLO, F.; SALINAS, J.; CARO, M.R.; GALLEGO, M.C.; SÁNCHEZ-GALLEGO, M.J.; BUENDÍA, A.J. y BRETON, J. 1992: Prevalencia de la clamidiosis ovina y caprina en la región de Murcia. *An. Vet. (Murcia)* 8: 39-45.
- FUKUSHI, H. y HIRAI, K. 1992: Proposal of *Chlamydia pecorum* sp.nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 88-90.
- HARRIS, J.W. 1976: Chlamydial antibodies in pigs in Scotland. *Vet. Rec.* 98: 505.
- HARRIS, J.W.; HUNTER, A.R. y McCARTIN, D.A. 1984: Experimental chlamydial pneumonia in pigs. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 19-26.
- MARKEY, B.K.; McNULTY, M.S. y TODD, D. 1993: Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Vet. Microbiol.* 36: 232-252.
- NIETFELD, J.C.; JANKE, B.H.; LESLIE-STEEN,

- P.; ROBINSON, D.J. y ZEMAN D.H. 1993: Small intestinal *Chlamydia* infection in piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 114-117.
- RODOLAKIS, A. y SOURIAU, A. 1989: Variations in the virulence of strains of *Chlamydia psittaci* for pregnant ewes. *Vet. Rec.* 125: 87-90.
- ROGERS, D.G.; ANDERSEN, A.A.; HOGG, A.; NIELSEN, D.L. y HUEBERT, M.A. 1993: Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with chlamydiae in swine. *JAVMA* 203: 1321-1323.
- SARMA, D.K.; TAMULI, M.K.; RAHMAN, T.; BORO, B.R.; DEKA, B.C. y RAJKONWAR, C.K. 1983: Isolation of chlamydia from a pig with lesions in urethra and prostate gland. *Vet. Rec.* 112: 525.
- SALINAS, J.; CARO, R. y CUELLO, F. 1993: Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to *Chlamydia psittaci* in pigeon sera. *J. Vet. Med. B* 40: 239-244.
- SALINAS, J.; SOURIAU, A.; CUELLO, F. y RODOLAKIS, A. 1995: Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 43: 219-226.
- SOURIAU, A.; SALINAS, J.; DE SA, C.; LAYACHI, K. y RODOLAKIS, A. 1994: Identification of subspecies- and serotype-1 specific epitopes on the 80-90-kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *Am. J. Vet. Res.* 55: 510-514.
- STAMP, J.T.; McEWEN, A.D.; WATT, J.A.A. y NISBET, D.I. 1950: Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. *Vet. Rec.* 62: 251-256.
- STORZ, J.; BAGHIAN, A. y KOUSULAS, K.G. 1994: Advances in detection of *Chlamydiae* from animals. *Proceedings of the 8th International Symposium on Human Chlamydial Infection*. Chantilly (Francia). pp. 563-573.
- WILLS, J.M.; HOWARD, P.E.; GRUFFYDD-JONES, T.J. y WATHES, C.M. 1988: Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat population in Britain. *J. Small Anim. Pract.* 29: 327-339.
- WOOLLEN, N.; DANIELS, E.K.; YEARY, T.; LEIPOLD, H.W. y PHILIPS, R.M. 1990: Chlamydial infection and perinatal mortality in a swine herd. *JAVMA* 197: 600-601.