

**ECO EPIDEMIOLOGÍA DE *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*: IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA.**

TRABAJO DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD.

*FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS*  
*UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA*

MARIA CELIA FRUTOS

2015

COMISION DE TESIS DE DOCTORADO

DIRECTOR

PROF. DRA. CECILIA CUFFINI

CODIRECTOR

PROF. DRA. VIVANA RÉ

MIEMBROS

Prof. Dra. Diana Masih

Prof. Dra. Marina Bottiglieri

Eco epidemiología de *Chlamydia psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*: Impacto en la salud pública.

Biol. María Celia Frutos

---

Artículo 43 del reglamento para Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud:

"La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de esta Tesis"

## ÍNDICE

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	9
SUMMARY	12
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Taxonomía	14
1.2 Características generales	14
1.2.1 Estructura antigénica y factores de virulencia	14
1.2.2 Características moleculares	16
1.2.3 Plásmido Críptico	16
1.2.4 Ciclo de Vida	17
1.3 Importancia Zoonótica	18
1.4 Diagnóstico	19
1.5 <i>Chlamydia psittaci</i>	21
1.5.1 Antecedentes	21
1.5.2 Epidemiología	22
1.5.3 Genotipos y Serotipos	22
1.5.4 Patología Humana	23
1.5.5 Diagnóstico	24
1.5.6 Tratamiento	25
1.5.7 Patología Aviar	26
1.5.8 Diagnóstico	27
1.5.9 Tratamiento	28
1.6 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	28
1.6.1 Antecedentes	28
1.6.2 Epidemiología	29
1.6.3 Biovariedades y Genotipos	29
1.6.4 Patología Humana	30
1.6.5 Diagnóstico	32
1.6.6 Tratamiento	33

1.7 <i>Chlamydia pecorum</i>	33
1.7.1 Antecedentes	33
1.7.2 Epidemiología	33
1.7.3 Serotipos y Genotipos	33
1.7.4 Patologías	34
1.7.5 Diagnóstico	36
1.7.6 Tratamiento	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo general	37
2.2 Objetivos particulares	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Estudios serológicos en humanos	38
3.1.1 Muestras analizadas	38
3.1.2 Métodos serológicos para la detección de anticuerpos anti-LPS de <i>Chlamydia</i>	40
3.2 Estudios moleculares en humanos	43
3.2.1 Muestras analizadas para la detección de ADN de <i>Chlamydia</i>	43
3.2.2 Métodos moleculares para la detección de ADN de <i>Chlamydia</i>	44
3.2.3 Análisis estadísticos	54
3.3 Estudios moleculares en animales	54
3.3.1 Muestras analizadas	54
4. RESULTADOS	61
4.1.1 Detección de anticuerpos anti- LPS de <i>Chlamydia</i> por neutralización (NT)	61
4.1.2 Estudio comparativo de seroprevalencia detectada en el grupo control y en el grupo con nexo epidemiológico para <i>C. psittaci</i>	65

4.2.1 Implementación de técnicas de amplificación genómica para la detección de <i>Chlamydia</i> y determinación de la especie	68
4.2.2 Detección y secuenciación de las especies de <i>Chlamydia</i> en pacientes con sospecha de psitacosis de la provincia de Córdoba	69
4.2.3 Detección y caracterización genética de las especies de <i>Chlamydia</i> en animales	82
4.2.4 Cuantificación del ADN bacteriano	90
5. DISCUSIÓN	92
6. CONCLUSIONES	108
7. BIBLIOGRAFÍA	110
8. ABREVIATURAS	135
9. ANEXOS	137
Anexo I: Consentimiento informado	137
Anexo II: Ficha de estudio laboral-epidemiológica de casos sospechosos de psitacosis	143
Anexo III: Sitios de captura de la provincia de Córdoba, Argentina	144
Anexo IV: Imagen de células LLCMK2 infectadas con <i>C. muridarum</i> cepa MoPn, tinción con Naranja de Acridina al 1% visualizadas en Microscopio Invertido de Inmunofluorescencia con un aumento de 200x y 400x	145
Anexo V: publicación: "Detection of the <i>ompA</i> gene of <i>Chlamydochila pecorum</i>	146

in captive birds, in Argentina”. 2012. Revista Argentina de Microbiología. 44: 65-68.	
Anexo VI: publicación: “Genotyping of <i>C. psittaci</i> in central area of Argentina”. 2012. Diagnostic Microbiology and Infection Disease. 74(3): 320-322.	150
Anexo VII: publicación: “Molecular evidence of <i>Chlamydia pneumoniae</i> infection in reptiles in Argentina”. 2014. Revista Argentina de Microbiología. 46(1): 45-48.	153
Anexo VIII: publicación: <i>Chlamydia</i> spp. among captive and wild birds from central Argentina: genetic diversity. 2014. Avian Pathology	156
Anexo IX: Ley provincial de tenencia y comercialización de animales	163

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mí papá.

A mis padres, quienes alentaron desde mis comienzos mis decisiones, quienes incondicionalmente estuvieron, que nos alentaron a mí y a mis hermanas a estudiar y desarrollarnos como personas; y que supieron forjarnos el sentido de la responsabilidad, amor al trabajo y perseverancia.

A Maxi, mi compañero, quien supo estimular mi tarea profesional y apoyar todas mis decisiones, quién soportó mis ausencias y mis vaivenes anímicos y a su familia.

A mis hermanas, quienes siempre me apoyaron y alentaron mis decisiones.

A mi directora Prof. Dra Cecilia Cuffini y mi codirectora Prof. Dra Viviana Ré, quienes confiaron en mí y en mi trabajo y que supieron guiar mis pasos en la carrera científica.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Prof. Dra Cecilia Cuffini, mi codirectora Prof. Dra Viviana Ré y a los miembros de la Comisión de Tesis Prof. Dra. Diana Massih y Prof. Dra. Marina Bottiglieri, quienes guiaron mi trabajo de tesis.

A mis compañeros del laboratorio, Marina, Jessica, Ximena y Fernando, quienes me brindaron su compañía, tiempo y cooperación desinteresada.

A mis colegas del Instituto de Virología, quienes de una forma u otra cooperaron y cooperan con mi formación académica.

A toda la gente que colaboró en campo, a Marina que estuvo siempre conmigo en los muestreos, a Estela y Gladis, gracias a todos por su trabajo que permitió realizar el mío.

A la Dirección de Epidemiología y a la Secretaría de Ambiente de la provincia de Córdoba, por la colaboración brindada para la concreción de este estudio.

A los pacientes que participaron del estudio.

A la Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Nacional de Córdoba, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECYT), que contribuyeron a la elaboración de mi tesis.



## RESUMEN

Las infecciones zoonóticas son una creciente amenaza para la salud mundial. Las neumonías atípicas son causadas frecuentemente por patógenos zoonóticos como por ejemplo *Chlamydia*; sin embargo, varias de estas especies bacterianas y sus implicancias son aún poco conocidas.

El objetivo del estudio fue profundizar en el conocimiento eco-epidemiológico de las especies de *Chlamydia* de importancia médico-veterinaria presentes en la provincia de Córdoba, Argentina.

Para tal fin, se implementaron técnicas serológicas y moleculares para la detección, cuantificación y caracterización genética de *Chlamydia* en un amplio rango de muestras humanas [individuos sanos (n=314), individuos con nexo epidemiológico asociado a psitacosis (n=44) y animales [aves silvestres (n=505), aves en cautiverio (n=288), reptiles (n=30), equinos (n=30)].

La especie de *Chlamydia* más frecuentemente detectada en humanos fue *C. pneumoniae*, seguida de *C. pecorum* y *C. psittaci*. También se detectaron coinfecciones. Este hallazgo no pudo asociarse al sexo, edad, cuadros clínicos específicos, patrón estacional, ni especie aviar de contacto. Sin embargo, la neumonía atípica fue el cuadro clínico más fuertemente asociado al hallazgo de estos agentes y las infecciones mixtas estuvieron asociadas a mayor cuantificación bacteriana y a una exacerbación del cuadro clínico, llevando a la hospitalización de los pacientes, quienes requirieron cuidados intensivos.

Se demostró que la prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-*Chlamydia* en individuos sanos fue más baja (14,3 %, con títulos neutralizantes  $\leq 20$ ), que en aquellos pacientes con nexo epidemiológico asociado a psitacosis (68,2 %, con neutralizantes  $\geq 80$ ), quienes en su mayoría relataron contacto con aves. Además, se evidenció una exacerbación de la respuesta inmune (títulos de IgG: 512-4096) en trabajadores de un centro recreativo en contacto rutinario con reptiles infectados con *C. pneumoniae*. En reptiles, no se hallaron las especies *C. psittaci* y *C. pecorum*.

En aves en cautiverio no sólo se logró identificar la tradicionalmente estudiada *C. psittaci*, sino también se halló en mayor frecuencia y por primera vez *C. pneumoniae*, *C. pecorum* e infecciones mixtas. La mayor concentración de ADN bacteriano se halló en

muestras con infecciones con más de una especie de *Chlamydia*. Si bien, no encontramos una asociación significativa entre el nivel de excreción, la especie de *Chlamydia* involucrada en la infección y el tipo de hospedador, la especie *Pheucticus aureoventris* (Passeriformes), de amplia distribución en nuestra región, presentó mayor carga bacteriana. Asimismo, se identificó una nueva especie, *C. gallinacea*, en aves del orden Passeriformes, cuyo rol patogénico se desconoce. En las aves silvestres analizadas no se detectó la presencia de *Chlamydia*, lo que sugiere que la interrupción de la preservación ecológica y ambiental en las aves podría ser la causa de la excreción de *Chlamydia*.

En equinos asintomáticos y con signos de conjuntivitis se halló únicamente *C. pneumoniae*. También se halló *C. pneumoniae* en las especies *Suricata suricatta* y en *Atelerix albiventris* asintomáticas.

En todos los casos la administración de antibióticos específicos logró erradicar la infección. Por lo que la detección precoz y específica de estas bacterias es importante para un mejor manejo clínico-terapéutico.

La caracterización genética reveló la presencia de *C. pneumoniae* genotipo A en muestras de humanos, reptiles, aves y mamíferos no humanos cuyas secuencias estuvieron estrechamente asociadas entre sí. Sin embargo, *C. pneumoniae* genotipo B fue hallada en equinos. Sorprendentemente, *C. psittaci* genotipo WC, previamente solo reportado en mamíferos rumiantes, se halló en aves y humanos. También se detectaron en menor frecuencia los genotipos E/B y A. Este nuevo hallazgo sugiere que los animales pueden representar una fuente de origen subestimada de *C. psittaci* o que las aves pueden dispersar cepas asociadas a mamíferos; como consecuencia, la clasificación de los genotipos de *C. psittaci* debería ser revisada.

El hallazgo de *C. pneumoniae* y *C. pecorum* en humanos con enfermedad respiratoria y la detección de estas bacterias en animales de compañía incautados en domicilios particulares plantea la existencia de posibles ciclos zoonóticos. Por lo tanto surge la necesidad de empezar a considerar la inclusión de estas bacterias en el diagnóstico diferencial de las infecciones respiratorias en nuestra región. Además nuestros resultados destacan la necesidad de implementar normas de bioseguridad laboral en el personal en contacto con animales y de controles más estrictos sobre la

tenencia y comercialización de aves y nuevos animales de compañía, con el objeto final de mitigar su diseminación.

Los resultados aquí presentados son los primeros registros de estos patógenos en animales locales y amplían el conocimiento previo acerca de la abundancia de *Chlamydia* en el reino animal.

Estos resultados avalaron el decreto de ley provincial de tenencia y comercialización de animales, promovido por la Secretaría de Ambiente de la Provincia de Córdoba.

**Palabras claves:** *Chlamydia psittaci*; *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum*; seroprevalencia; detección molecular, caracterización genética.

## SUMMARY

Zoonotic infections are a growing threat to global health. Atypical pneumonias are often caused by zoonotic pathogens such as *Chlamydia*. However; very little is known about chlamydial infections and their implications in our region

The aim of this study was to enhance the eco-epidemiological knowledge of *Chlamydia* species in the province of Córdoba, Argentina.

Serological and molecular techniques were implemented for the detection, quantification and genetic characterization of *Chlamydia* from a wide range of human samples [healthy individuals (n = 314) and individuals with suspected human psittacosis (n = 44) as well as animal samples [wild birds (n = 505), captive birds (n = 288), reptiles (n = 30), horses (n = 30)].

*C. pneumoniae* was the most frequently detected species in humans, followed by *C. psittaci* and *C. pecorum*. Co-infections were also detected. We did not find associated with sex, age, specific clinical conditions, seasonal pattern, or avian contact. However, atypical pneumonia was the main clinical manifestation associated with these agents. Mixed infections were associated with increased DNA quantification and an exacerbation of clinical symptoms, leading to hospitalization of patients who required intensive care.

Prevalence of neutralizing anti-*Chlamydia* antibodies in healthy individuals was lower (14.3%, titles <20) than in patients with suspected human psittacosis (68.2%, titles  $\geq$  80); most of the latter reported contact with birds. Workers of a recreation centre, who had regular contact with infected *C. pneumoniae* reptiles, had an exacerbated immune response (512-4096 titles IgG). The reptiles were negative for *C. psittaci* and *C. pecorum*.

In captive birds not only the traditionally studied *C. psittaci* was identified, but also *C. pneumoniae*, *C. pecorum* and mixed infections were described for the first time. The highest DNA concentration was found in samples with co-infections. Although we did not find a significant association among the level of excretion, *Chlamydia* species involved in the infection and host type, the species Black-backed grosbeak (*Pheucticus aureoventris*, Passeriformes), which is widely distributed in the region, showed higher bacterial load. Another remarkable finding was the first detection of *C. gallinacea* in

birds of the order Passeriformes in our region, whose pathogenic role is unknown. *Chlamydia* was not detected in wild birds, suggesting that disruption of ecological and environmental preservation in birds could be the cause of *Chlamydia* excretion.

In healthy horses and others with conjunctivitis, only *C. pneumoniae* was found. This species was and also found in *Suricata suricatta* and asymptomatic *Ateles albiventris*.

In all cases, the administration of specific antibiotics was enough to eradicate the infection. The early and specific detection of these bacteria was important for clinical and therapeutic management.

Genetic characterization revealed the presence of *C. pneumoniae* genotype A in human samples, as well as in reptile, bird and non-human mammal samples. However, *C. pneumoniae* genotype B was found in horses. Surprisingly, *C. psittaci* genotype WC, which was previously reported only in ruminant mammals, was here detected in birds and humans. Genotypes E/B and A were also detected, but with lower frequency. This new finding suggests that birds can be an underestimated source of *C. psittaci* or that they can disperse strains associated with mammals; hence, the classification of *C. psittaci* genotypes should be reviewed.

The finding of *C. pneumoniae* and *C. pecorum* in humans with respiratory disease and in companion animals collected from houses suggests the existence of a zoonotic cycles and the need to consider the inclusion of these bacteria in the differential diagnosis of respiratory infections in our region. Our results also highlight the need to implement biosecurity measures to protect the personnel in contact with animals, as well as strong controls of the possession and sale of birds and pets with the ultimate aim of mitigating bacterial spread.

These results are the first records of the presence of these pathogens in local animals and help us improve our understanding on the abundance of *Chlamydia* in the animal kingdom.

These results supported the provincial decree-law promoted by the Ministry of Environment of the Province of Córdoba about the possession and commercialization of animals.

**Keywords:** *Chlamydia psittaci*; *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum*; *Chlamydia gallinacea*; seroprevalence; molecular characterization.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia Chlamydiaceae son bacterias gram-negativas intracelulares obligadas exógenas, originalmente fueron consideradas como protozoo y luego como virus, debido a su pequeño tamaño, su supuesta incapacidad de producir adenosina trifosfato (ATP) y por su estricto parasitismo intracelular. Estudios de secuencias de genes de ácido nucleico ribosomal (ARNr) confirmaron que *Chlamydia* es una Eubacteria, que causa un amplio espectro de enfermedades en el hombre, mamíferos no humanos, reptiles y aves (Longbottom y Coulter, 2003).

### 1.1 Taxonomía

La familia Chlamydiaceae consta de un único género, *Chlamydia* y las siguientes especies: *Chlamydia muridarum*, *C. suis*, *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. abortus* (Kuo et al, 2011).

Nuevas especies han sido recientemente descritas: *C. ibidis* (Vorimore et al, 2013) *C. avium* y *C. gallinacea* (Sachse et al, 2014), descritas en aves Pelecaniformes, Psittaciformes y Columbiformes, respectivamente.

### 1.2 Características generales

#### 1.2.1 Estructura antigénica y factores de virulencia

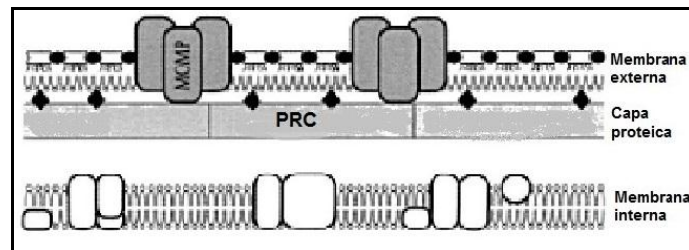
Los principales antígenos de *Chlamydia* están presentes en la membrana externa, la cual contiene el lipopolisacárido (LPS), proteína mayor de la membrana externa (MOMP) y otras dos proteínas ricas en cisteína (PRC): una proteína de envoltura de 62Kd y una lipoproteína de 12Kd (Fig. N° 1). Tanto la MOMP como el LPS, son los componentes antigénicos más importantes.

El LPS es un antígeno termoestable común a todos los miembros de la familia Chlamydiaceae. Nguyen et al 2011, establecieron la relación del LPS como factor de virulencia en *Chlamydia*, ya que en su ausencia, las *Chlamydia* no pueden realizar la transición de Cuerpo Reticulado (CR) a Cuerpo elemental (CE).

El LPS produce reacción cruzada en las pruebas serológicas, no sólo entre los distintos miembros de la familia Chlamydiaceae, también con algunos LPS de enterobacterias.

La MOMP es la principal proteína de membrana externa, representa el 60 % del peso seco de la membrana de *Chlamydia*. Es el antígeno dominante en *C. trachomatis* y *C. psittaci*, por estar expuesta en la superficie de la membrana. Por el contrario en *C. pneumoniae*, la MOMP tiene baja capacidad inmunogénica, debido a la existencia de una proteína de 54 kDa, denominada proteína polimórfica de la membrana externa (PMP) específica de esta especie que presenta una localización más externa que MOMP. La topología proteica de MOMP consta de 5 dominios transmembranarios conservados (CDI-V) y 4 dominios variables (VDI-IV) que están expuestos en la superficie externa. Las mutaciones en esta proteína están relacionadas con las estrategias de evasión del sistema inmune. Las proteínas juegan un papel importante en la diversificación antigénica para escapar del sistema inmune del huésped.

La MOMP es el antígeno específico de especie elegido en las pruebas directas de detección.



**Fig. N° 1:** Estructura de la pared celular de *Chlamydia* (tomado de Alonso et al, 2012) .

### 1.2.2 Características moleculares

El genoma de varias especies de *Chlamydia* ha sido ampliamente estudiado desde 1998 lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento de sus características moleculares (Bush y Everett, 2001; Kalma et al, 1999; Read et al, 2000; Read et al, 2003; Marakova et al, 2000; Mitchell et al, 2010; Mojica et al, 2011; Schöfl et al, 2011; Shirai et al, 2000; Thomson et al, 2005; Voigt et al, 2011).

El genoma cromosómico tiene desde 1.042.519 pares de bases (pb) en la especie *C. trachomatis* a 1.230.230 pb en *C. pneumoniae*. La reducción en el tamaño del genoma de algunas especies de *Chlamydia* es el resultado de la pérdida de genes. Las mutaciones puntuales y la pérdida de genes se consideran los únicos mecanismos de divergencia entre las *Chlamydia* (Stephens et al, 2009).

El contenido de genes y su orden (Sintenia) son extremadamente altos en estas bacterias. El 80 % de los genes son conservados y presentan el mismo orden de genes en las diferentes especies de *Chlamydia*, como por ejemplo, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, y *C. abortus*.

El genoma de *Chlamydia* codifica para 875 proteínas, que son necesariamente expresadas, de las cuales 70 aproximadamente son proteínas exclusivas de cada especie.

### 1.2.3 Plásmido Críptico

Algunas especies de *Chlamydia* presentan un plásmido extracromosomal de aproximadamente 7.500 pb, lo que sugiere que no son necesarios para el crecimiento, sin embargo aún se desconoce su funcionalidad.

Los plásmidos de *Chlamydia* tienen 22 pares de bases repetidas en tandem en la región intergénica entre ORF1 y ORF8. Todos los plásmidos aislados de humanos y animales son similares y presentan solo el 1% de variación en la secuencia de nucleótidos.

Si bien el número de copias de plásmido no se ha determinado con precisión, por métodos isotópicos se sugiere la presencia de entre siete y diez copias de plásmido por cromosoma bacteriano (Palmer y Falkow, 1986; Tam et al, 1992).



Las cepas de *C. psittaci* aisladas de aves Galliformes y Psittaciformes presentan plásmido críptico, sin embargo no todas las cepas de *C. psittaci* presentan plásmido (Storni et al, 2006).

*C. pneumoniae* N16, aislada de equinos, es la única cepa de esta especie bacteriana que presenta plásmido críptico (Pickett et al, 2005).

En cepas de *C. pecorum* de ganado bovino y de marsupiales se detectó la presencia de plásmido. Estos plásmidos, muestran hibridación cruzada y son distintos en su secuencia a los detectados en cepas *C. psittaci* y *C. trachomatis* (Hugall et al, 1989).

No todas las cepas de *C. pecorum* presentan plásmido, las cepas aisladas de rumiantes y de ganado porcino, no tienen plásmido (Anderson et al, 1996).

#### 1.2.4 Ciclo de Vida

*Chlamydia* experimenta un ciclo de desarrollo bifásico único, durante el cual se pueden hallar dos morfologías distintas: como CE o como CR (Fig. N° 2).

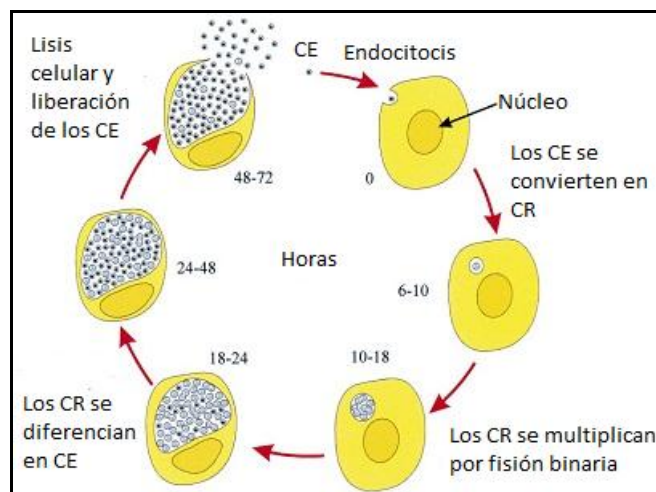
El CE es extracelular, de pequeño tamaño (300 nm de diámetro) y representa la partícula infectiva y el CR es no infeccioso, de mayor tamaño ( $500 \pm 1600$  nm), metabólicamente activo e intracelular.

El ciclo de desarrollo se inicia con la endocitosis mediada por receptores de naturaleza proteica o glucosaminoglucanos, de los CE por las células eucariotas. Los CE quedan dentro de vacuolas intracitoplasmáticas denominadas Inclusiones, las cuales no se fusionan a los lisosomas debido a un cambio en la membrana de los CE que bloquean este evento. Estas modificaciones no afectan a la MOMP.

Transcurridas 8 horas desde el ingreso de los CE a la célula, los mismos se diferencian y se transforman en CR. Los CR se multiplican por fisión binaria expandiendo el tamaño de la inclusión. A las  $24 \pm 48$  h, dependiendo de la especie, los CR se transforman en CE, metabólicamente inactivos e infecciosos. Luego de 72 horas post-infección, los CE son liberados por lisis celular para infectar las células vecinas (Fig. N° 2).

Los CE se caracterizan por su resistencia a los factores físicos y químicos en el medio extracelular. Esta resistencia es una consecuencia de la rigidez de la envoltura, que es osmóticamente estable y poco permeable, y también es una consecuencia de la

reducida área superficial de los CE en comparación con la de los CR. Por lo tanto, los CE se encuentran bien adaptados para la supervivencia extracelular prolongada, que en el caso de los agentes patógenos de origen animal, puede significar muchos meses fuera del huésped natural.

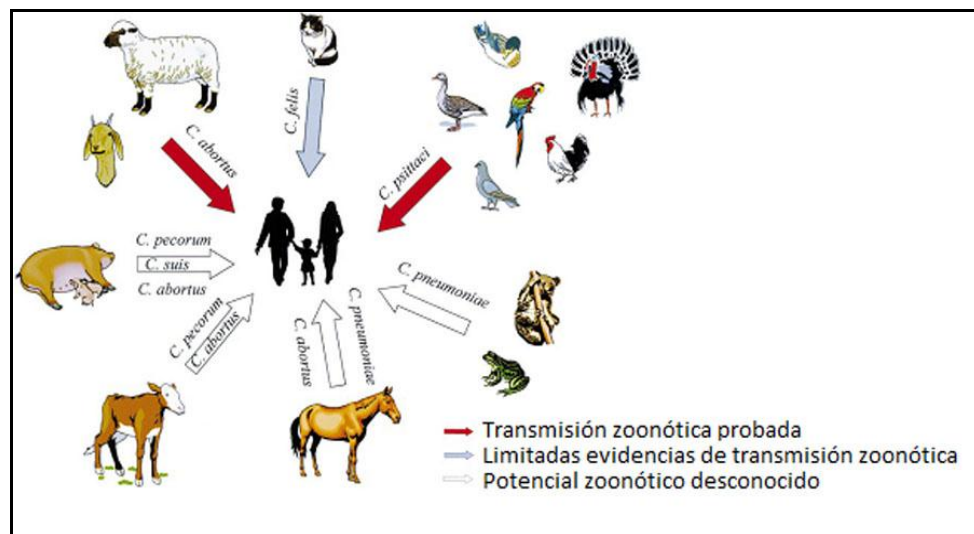


**Fig. N° 2:** Ciclo de Vida de *Chlamydia* (Tomado de Longbottom y Coulter, 2003).

### 1.3 Importancia Zoonótica

Las infecciones zoonóticas son una creciente amenaza para la salud mundial. *Chlamydia* es el microorganismo más frecuente en el reino animal (Jones et al, 2008), infectando mamíferos no humanos, reptiles y aves, causando una amplia gama de enfermedades. Varias de estas especies bacterianas son transmisibles al hombre (Fig. N° 3) y de importancia para la salud pública.

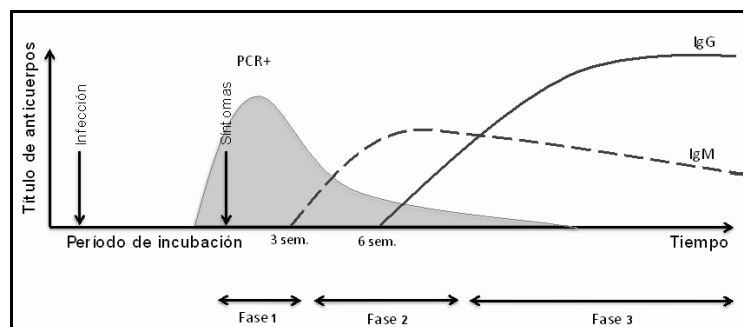
*C. abortus* y *C. psittaci* son causales de abortos y psitacosis, respectivamente, en los humanos. Las enfermedades causadas por estos dos microorganismos en los animales, y sus aspectos zoonóticos, se encuentran bien documentados (Beekman y Vanrompay, 2009; Essig et al, 1995; Harkinezhad et al, 2009a; Longbottom y Coulter, 2003; Moroney et al, 1998; Pannekoek et al, 2010; Vanrompay et al, 1995) sin embargo el potencial zoonótico de las restantes especies de *Chlamydia*, se encuentran en estudio en la actualidad.



**Fig. N° 3:** Potencial zoonótico de los patógenos animales (Tomado de Longbottom y Coulter, 2003).

#### 1.4 Diagnóstico

El diagnóstico diferencial de las *Chlamydia* es un tema de discusión entre los investigadores. Numerosos estudios han demostrado una pobre correlación entre los resultados obtenidos por cultivo, serología y técnicas de biología molecular (Normann et al, 1998, Hyman et al, 1995; Verkooyen et al, 1998; Wellinghausen et al, 2006), mientras que en otros estudios está correlación mejora (Boman et al, 1997; Thom et al, 1994). Estos resultados contradictorios indican la necesidad de definir con precisión la fase de infección o el tiempo en el que se obtiene la muestra, para saber qué técnica de referencia debe ser utilizada en cada caso o qué técnica ofrece el diagnóstico más preciso. En la fig. N° 4 se representa la dinámica de aparición de los anticuerpos y marcadores moleculares específicos.



**Fig. N° 4:** Dinámica de la aparición de títulos de anticuerpos y marcadores moleculares para ser detectado por técnicas de serología o de PCR (Tomado de Hvidsten, 2009).

El resultado de la prueba dependerá de la elección del método de diagnóstico. En fase 1 las técnicas de biología molecular es el método de elección para el diagnóstico diferencial, mientras que los anticuerpos de tipo IgM aparecen semanas más tarde de la aparición de la enfermedad. Las técnicas de biología molecular pueden resultar negativas después de transcurridos algunos meses (fase 3).

En la fase 2 es posible el diagnóstico por serología, anticuerpos IgM pueden estar presentes en el suero de fase aguda, mientras que anticuerpos de tipo IgG pueden alcanzar los niveles de detección 6-8 semanas después de la aparición de la enfermedad.

Sólo en la fase 2 el diagnóstico puede realizarse por técnicas de biología molecular y/o técnicas de serología.

En fase 3, la detección de anticuerpos de tipo IgG es recomendado, sin embargo solo es confirmatorio de infección la seroconversión.

El aislamiento en cultivos celulares o huevos embrionados son las técnicas de referencia, sin embargo, debido al tiempo necesario, la dificultad, el riesgo biológico y a la ausencia de disponibilidad de esta técnica en laboratorios de rutina, el cultivo no es recomendado para el diagnóstico.

## 1.5 *Chlamydia psittaci*

### 1.5.1 Antecedentes

El primer registro de *C. psittaci* fue en el año 1879 en Suiza, en una epidemia de neumonía en humanos asociada con la exposición a aves domésticas tropicales (Ritter, 1880; Harrison, 1989).

En 1892, Morange demostró que las aves Psittaciformes eran el reservorio y denominó a la enfermedad como psitacosis, según la palabra griega “psítakos” (loro) (Morange, 1895).

En 1929-1930, una epidemia de psitacosis humana asociada a aves Psittaciformes de Argentina, se registró en EE.UU. y Europa (Beeckman y Varompay, 2009). En 1939-1942 este agente fue aislado en aves Columbiformes en Sudáfrica y en EE.UU. en Anseriformes y Galliformes (Harkinezhad et al, 2009a). En 1950-1980, se registraron brotes epidémicos en trabajadores de la industria avícola en EE.UU. y Europa (Grimes y Wyrick, 1991; Meyer, 1967). Desde 1990-2003, 935 casos de psitacosis humana fueron informados en los EE.UU., la mayoría asociados con aves del orden Psittaciformes y Columbiformes.

Actualmente, unos 100 casos de psitacosis son registrados cada año en este país, con una mortalidad anual del 1% (Vanrompay et al, 2007).

En Argentina, los primeros casos clínicos de psitacosis fueron descritos en 1929. En 1939, se produjo un brote epidémico asociado a la exposición a aves Psittaciformes y a partir de entonces se han reportado casos todos los años. En 1977, una epidemia comprendió 180 casos, de los cuales en 71 de ellos se confirmó el diagnóstico, registrándose tres muertes. Estudios serológicos realizados en el período 1977-1981 determinó que el 41 % de las muestras presentaban conversión serológica contra *C. psittaci*. En la mayoría de los casos se observó una asociación con aves Psittaciformes (Planes et al, 1986).

Según el Organismo Internacional de Epizootia, psitacosis es una zoonosis del grupo 3 (G1-G4) que causa enfermedad humana severa y puede dispersarse en la población (OIE, 2013). Es una enfermedad de notificación obligatoria en muchos países (Ritchie et al, 1994), inclusive en el nuestro, por lo que los profesionales de la salud y médicos veterinarios deben reportar todos los casos sospechosos al Ministerio de Salud de la Nación (Bennu, 2003). La tasa de casos sospechosos de psitacosis permanece entre 0,21-0,25 por 100.000 habitantes en los últimos 5 años (Sistema Nacional de Vigilancia de Salud, SNVS).

Los últimos brotes se registraron en las provincias de Neuquén, Mendoza, Buenos Aires, Santa Fe, Jujuy, San Luis y Corrientes. En los últimos cinco años en Argentina se han reportado 918 casos de psitacosis, de los cuales se confirmaron 261, principalmente en Santa Fe, Buenos Aires, Jujuy, Entre Ríos y Córdoba (SNVS).

### **1.5.2 Epidemiología**

### **1.5.3 Genotipos y Serotipos**

*C. psittaci* comprende ocho serotipos, que se diferencian con anticuerpos específicos (Andersen, 1991; Andersen, 1997; Vanrompay et al, 1993). Los serotipos se corresponden con los genotipos obtenidos del análisis de gen *ompA* (Vanrompay et al, 1997). En el año 2005 surge un nuevo genotipo de modo que hay actualmente ocho serotipos y nueve genotipos (Geens et al, 2005).

Seis de los nueve genotipos (A-F; E/B) están asociados con hospedadores aviares (Pannekoek et al, 2010). El serotipo A está asociado principalmente con aves del orden Psittaciformes, el genotipo B es endémico de aves Columbiformes, de baja virulencia en Galliformes y también fue asociado a abortos en ganado bovino (Harkinezhad et al, 2007).

Hospedadores específicos no han sido identificados para los serotipos C y D. El serotipo C presenta baja virulencia en Anseriformes y Galliformes, mientras que el serotipo/genotipo D es de alta virulencia en Galliformes, Charadriiformes y Psittaciformes (Yin et al, 2013).

El serovar/genotipo E fue aislado por primera vez a partir de casos de neumonitis humanas y, posteriormente, ha sido identificado en una amplia variedad de especies de aves (Galliformes, Columbiformes, Rheiformes, Anseriformes y Struthioniformes). El serovar F también se lo asocia a aves Psittaciformes y Galliformes (Andersen, 1997; Van Loock et al, 2005).

Un nuevo genotipo E/B ha sido descrito de Anseriformes y su denominación se corresponde a que presenta reactividad cruzada con los serovars E y B (Geens et al, 2005).

Los genotipos WC y M56 han sido aislados de epizootias en ganado bovino (Bovidae) y roedores (Rodentia), respectivamente (Everett et al, 1999a).

Los genotipos A y D presentan mayor virulencia en aves y humanos, resultando en una presentación clínica mas exacerbada (Vanrompay et al, 1994; Gaede et al, 2008). Sin embargo, todos los genotipos aviares son productores de enfermedad en los humanos. Para los genotipos detectados en mamíferos se desconoce su potencial zoonótico.

#### **1.5.4 Patología Humana (Ornitosis o psitacosis)**

##### **Transmisión**

La mayoría de las infecciones por *C. psittaci* en los seres humanos es debido a la exposición a aves infectadas. El contagio humano se produce por la inhalación de aerosoles de las secreciones de aves infectadas, por contacto directo o por el manejo de productos derivados de éstas. La transmisión de esta infección de persona a persona no está confirmada (Harkinezhad et al, 2009a).

##### **Signos Clínicos y Síntomas**

El período de incubación es de 5-14 días. Esta bacteria puede producir una infección asintomática hasta neumonía grave y complicaciones clínicas por una distribución sistémica.

Las personas sintomáticas por lo general tienen aparición repentina de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, malestar general y mialgias. Pueden desarrollar tos no productiva que puede estar acompañada de dificultad respiratoria. Disociación pulso-temperatura (fiebre sin aumento de la frecuencia del pulso) y esplenomegalia. En ocasiones puede presentarse una erupción no específica.

Los hallazgos radiológicos incluyen infiltrados lobulares o intersticiales. Asimismo, han sido reportados síntomas no específicos gastrointestinales como vómitos, dolor abdominal y diarrea. Las complicaciones que pueden presentarse, por falta del tratamiento específico, son miocarditis, endocarditis, encefalitis, queratoconjuntivis, ictericia, linfomas oculares y fallas multiorgánicas que eventualmente producen la muerte del paciente.

En mujeres embarazadas puede manifestarse como neumonía, hepatitis, insuficiencia renal, sepsis, parto prematuro y muerte fetal (Longbottom y Coulter, 2003).

Ocasionalmente la enfermedad es fatal pero con el tratamiento adecuado la infección es erradicable.

### 1.5.5 Diagnóstico

El Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2010) define:

**Caso confirmado de psitacosis:** enfermedad clínica compatible con psitacosis y confirmado por al menos uno de los siguientes análisis diagnósticos:

- Aislamiento de *C. psittaci* a partir de muestras respiratorias o sangre.
- Aumento de cuatro veces o más de los títulos de anticuerpos tipo Inmunoglobulina G (IgG) específicos contra *C. psittaci* por Fijación del complemento (FC) o por Microinmunofluorescencia (MIF), de sueros correspondiente a las fases aguda y convaleciente.

**Caso probable de psitacosis:** clínica compatible con psitacosis y uno de los siguientes resultados de laboratorio:

- Detección de anticuerpos tipo Inmunoglobulina M  $\geq 32$  (IgM) por FC o MIF en una muestra de suero obtenido después de la aparición de los síntomas.
- Detección del ADN de *C. psittaci* en una muestra respiratoria por PCR.



El diagnóstico de *C. psittaci* se estableció mediante el uso de métodos serológicos en el que pares de sueros son analizados para detección de anticuerpos de tipo IgG. Sin embargo, los anticuerpos detectados por FC también pueden resultar de la infección por otra especie de *Chlamydia*.

Si la epidemiología del paciente y la historia clínica indican un posible diagnóstico de psitacosis, ensayos de MIF pueden ser utilizados para distinguir la infección por *C. psittaci* de la infección con otras especies de *Chlamydia*. Sin embargo solo altos títulos de *C. psittaci*, es confirmatorio de la infección por este agente, ya que también presenta reactividad cruzada con *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* y *C. felis*, por lo que un título menor a un título de 128 debe interpretarse con precaución.

Este agente infeccioso también se puede aislar de esputo, de líquido pleural, o de sangre del paciente durante la enfermedad aguda y antes del tratamiento con agentes antimicrobianos, sin embargo, el cultivo de *C. psittaci* se lleva a cabo por unos pocos laboratorios debido a la dificultad técnica y problemas de seguridad biológica.

Las técnicas de biología molecular (PCR, RT-PCR, secuenciación) permiten una detección específica de *C. psittaci* diferenciándolas de otras especies de *Chlamydia* y permiten caracterizar los diferentes genotipos, sin embargo aún no han sido validadas para su uso en muestras humanas (CDC, 2010).

### **1.5.6 Tratamiento**

Las Tetraciclinas son los fármacos de elección para el tratamiento de pacientes con psitacosis. La mayoría de las personas responden favorablemente a la terapia. El tratamiento se recomienda durante al menos 10 a 14 días.

La Eritromicina es la alternativa para los individuos para las cuales está contraindicada las Tetraciclinas (niños de <9 años y mujeres embarazadas).

### **1.5.7 Patología Aviar (Clamidiosis aviar, CA)**

#### **Transmisión**

Las aves constituyen el reservorio principal de transmisión de *C. psittaci*, existen más de 465 especies de aves en las que se reportó *C. psittaci*, incluyendo ornamentales, de corral, silvestres, acuáticas y urbanas.

Las aves enfermas eliminan esta bacteria en todas sus secreciones, las aves asintomáticas pueden desarrollar la enfermedad por factores de estrés, hacinamiento, destrucción de hábitat, captura y condiciones inadecuadas de comercialización. Además este agente patógeno es bastante resistente a la desecación y puede permanecer infeccioso por varios meses (Rodolakis y Yousef Mohamad, 2010).

#### **Signos Clínicos y Síntomas**

Para las aves enjauladas, el tiempo entre la exposición a *C. psittaci* y la aparición de la enfermedad varía desde 3 días hasta varias semanas. Sin embargo, las infecciones latentes son comunes entre las aves y la enfermedad activa puede aparecer años después de la exposición a *Chlamydia*.

Si bien las aves, por lo general, son persistentes asintomáticas u oligosintomáticas, los cuadros clínicos más comunes de Clamidiosis aviar (CA) afectan a los sistemas respiratorio y digestivo de las aves. Los signos clínicos más frecuentes son anorexia, diarrea amarillo-verdosa, dificultad respiratoria, sinusitis, conjuntivitis, rinitis y en ocasiones, trastornos del sistema nervioso central. Sin embargo, estas señales no son exclusivas de CA. En aves crónicamente infectadas pueden presentar cojera, tortícolis, opistótonos, temblores y convulsiones.

Las lesiones en las aves infectadas en la necropsia no son lo suficientemente características para distinguir CA de otras enfermedades bacterianas aviar, y asimismo, la presencia y extensión de las lesiones depende de la virulencia de la cepa, la susceptibilidad, la edad del ave, duración de la infección y la presencia de otra enfermedad concurrente. En la mayoría de los casos, las lesiones se limitan a bazo, hígado y sacos aéreos.

Las aves pueden transmitir el agente patógeno a sus crías. Los pichones son más susceptibles a la infección severa que las aves adultas y pueden morir en el nido o poco después del abandono del mismo. Las aves que comparten el agua contaminada también son susceptibles de infección, así como los depredadores que comen los cadáveres contaminados con *C. psittaci* (Vanrompay et al, 1995).

Los ectoparásitos como pulgas, ácaros y piojos también han sido también reportados como posibles vectores para la transmisión de la enfermedad de un animal a otro (Shewen, 1980).

Ciertas cepas de *C. psittaci* infectan ganado ovino, caprino y bovino, causando infecciones crónicas en el tracto reproductivo, insuficiencia placentaria y abortos en estos animales. Estas cepas de *C. psittaci* pueden transmitirse a las personas expuestas a los fluidos del parto y de la placenta de estos animales infectados (Longbottom y Coulter, 2003).

### 1.5.8 Diagnóstico

El CDC define

**Caso confirmado de CA:** infección con *C. psittaci* sobre la base de al menos uno de los siguientes resultados de laboratorio:

- \*Aislamiento de *C. psittaci* en una muestra respiratoria o de tejido de ave.
- \*Aumento de cuatro veces en el título serológico entre dos muestras de suero de aves, obtenidos al menos con 2 semanas de diferencia.
- \* PCR positiva en una muestra de tejido o hisopados.

**Caso probable de CA:** infección por *C. psittaci* en un ave con clínica compatible con CA y al menos uno de los siguientes resultados de laboratorio:

- \*Un solo título alto serológico en una o más muestras obtenidas después de la aparición de los signos de la enfermedad.
- \*Presencia del antígeno de *C. psittaci* identificado por Enzimoimmuno ensayo (ELISA) o Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en heces, frotis de cloaca, exudados respiratorios u oculares.

### **Caso sospechoso de CA:**

\*Enfermedad clínica compatible con CA que esté vinculado epidemiológicamente a otro caso (humano o ave), pero no confirmado por laboratorio.

\*Infección asintomática en un ave con un título serológico o la detección del antígeno de *Chlamydia*.

\*Enfermedad clínica compatible con CA que es sensible a la terapia antimicrobiana específica.

Un resultado positivo de laboratorio indica la presencia de la infección, incluso en aves con ningún signo clínico de enfermedad. Un resultado negativo no asevera que el ave no esté infectada, ya que las aves pueden eliminar el microorganismo de manera intermitente.

### **1.5.9 Tratamiento**

Existen diferentes métodos para el tratamiento de las aves con CA: Tetraciclinas oral o parenteral. Y en esquemas terapéuticos en experimentación con fluoroquinolonas y macrólidos de última generación inyectable.

Los tratamientos deben administrarse por al menos 45 días, para que sean efectivos. Aunque estos protocolos suelen tener éxito, no existe un protocolo de tratamiento único que garantice la eliminación completa de la infección por *C. psittaci* en todas las especies de aves.

## **1.6 *Chlamydia pneumoniae***

### **1.6.1 Antecedentes**

En la década de 1980, sólo se conocían dos especies de *Chlamydia*; *C. trachomatis* y *C. psittaci*.

Por métodos de clasificación basados en el análisis de secuencias de ADN, serología, análisis de restricción de endonucleasas y estudios ultraestructurales de los CE, permitió definir una nueva especie, denominada *Chlamydia pneumoniae*.

El primer aislamiento de *C. pneumoniae* fue la cepa denominada TW-183 en 1965, obtenida a partir de la conjuntiva de un niño taiwanés que participó en un ensayo

vacunal contra tracoma (Kuo et al, 1995). Sin embargo el rol del organismo como un patógeno humano no se definió hasta 1983, cuando se obtuvo el primer aislamiento respiratorio (AR-39) en EE.UU., de un estudiante universitario con faringitis (Grayston et al, 1986). En 1989, la cepa TWAR-183 se estableció como una tercera especie, *C. pneumoniae* (Grayston et al, 1989).

Esta bacteria presenta una distribución universal y es el agente responsable de infecciones respiratorias en adultos y niños, afectando al 70% de la población en todo el mundo al menos una vez durante su vida (Kuo et al, 1995).

La infección se presenta en niños de 5 a 14 años de edad, la mayoría de los adultos tienen evidencia serológica de infección pasada, sin embargo las reinfecciones son comunes principalmente en personas de edad avanzada, ya que los anticuerpos contra *C. pneumoniae* no protegen frente al desafío de una nueva infección.

*C. pneumoniae* constituye la tercera causa de Neumonías Adquiridas en la Comunidad (NAC) en adultos, con frecuencias que fluctúan entre 3,4 % y 15,0 %. Actualmente, ha sido asociada a enfermedades crónicas como el Asma, Alzheimer, Sarcoidosis, Esclerosis múltiple, Síndrome de Guillain-Barre, Artritis Reactiva y Aterosclerosis, Linfogranuloma, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aunque todavía estas relaciones son controvertidas entre los investigadores (Balin et al, 1998; Cuffini et al, 2006; Grayston, 2000; Haidl et al, 1992; Hahn et al, 2012; Micillo et al, 2000; Shen et al, 2006; Sriram et al, 1998).

El SNVS reportó en los últimos cinco años en Argentina, 1926 casos de infecciones respiratorias agudas clínicamente diagnosticadas, de los cuales se confirmaron 20 casos de *C. pneumoniae*, 14 de ellos en Córdoba (SNVS).

### **1.6.2 Epidemiología**

### **1.6.3 Biovariedades y Genotipos**

La clasificación en biovariedades se basa fundamentalmente en diferencias en las secuencias nucleotídicas de los genes *16S rRNA*, *23S rRNA*, *ompA* y rango de hospedero.

Las biovariedades: humana, equina y marsupial, cuyos hospederos naturales son el hombre, los caballos y el koala respectivamente (Everett et al, 1999a), esta última

también ha sido descrita en anfibios y reptiles del continente Australiano (Bodetti et al, 2002).

Los datos sobre la determinación del genotipo de las cepas humanas y animales de *C. pneumoniae* son limitados. Para los fines de genotipificación se utiliza como blanco a la región variable IV del gen *ompA*, por ser la región de mayor variabilidad logrando caracterizar a 4 genotipos (Bodetti et al, 2002; Cochrane et al, 2005; Kutlin et al, 2007).

El genotipo A, de distribución cosmopolita, aislado en humanos y animales (Reptilia y Amphibia). El genotipo B solo fue detectado en equinos (Equidae) en el Reino Unido en 1990. El genotipo C fue aislado en cuadros respiratorios de marsupiales (Marsupialia) y anfibios en Australia. El genotipo D solo detectado en anfibios en USA en el año 2000 (Bodetti et al, 2002).

Debido a la similitud entre las secuencias humanas y animales, Mitchell et al, 2010 sobre la base de 21 regiones polimórficas propuso que los aislamientos de *C. pneumoniae* se corresponden a cinco genotipos (A-E). Estos cinco genotipos mostraban una distribución geográfica distinta entre los aislamientos estudiados.

El genotipo A era común entre los animales australianos. Genotipo B fue detectado en los aislamientos africanos. El genotipo C de distribución mundial era el genotipo más comúnmente identificado. El genotipo D era exclusivo de los aislamientos indígenas australianos y el E era el genotipo de *C. pneumoniae* más variable y comprendía la única cepa detectada en equinos del Reino Unido. Sin embargo debido a la dificultad y costo de este ensayo, esta clasificación se la utilizó solo en este estudio.

#### **1.6.4 Patología Humana**

##### **Transmisión**

*C. pneumoniae* se trasmite de persona a persona por gotitas o fómites al estornudar o toser, por lo que constituye un patógeno de gran capacidad de dispersión (Rodolakis y Yousef Mohamad, 2010). No está confirmada la transmisión de animal a humano y viceversa.

*C. pneumoniae* comienza infectando las células epiteliales de las vías respiratorias y monocitos. La capacidad de infectar monocitos posibilita la diseminación a localizaciones anatómicas alejadas del aparato respiratorio.

No existe variación estacional en la incidencia de esta infección; se puede presentar en forma epidémica o endémica. Las epidemias afectan al 60 % al 80 % de la población, predominan en personas jóvenes y en particular en comunidades cerradas.

Inicialmente *C. pneumoniae* fue considerado un patógeno exclusivamente humano; sin embargo, varios estudios demostraron que esta bacteria también causa infecciones oculares, respiratorias y urogenitales en una amplia variedad de especies animales, incluyendo koalas (*Phascolarctidae*), equinos, anfibios y reptiles (Berger et al, 1999; Bodetti et al, 2002; Cochrane et al, 2005; Hotzel et al, 2001; Jacobson et al, 2004; Storey et al, 1993; Mitchell et al, 2010).

### **Signos Clínicos y Síntomas**

La mayoría de las infecciones son usualmente leves o asintomáticas, aunque puede causar enfermedad grave sobre todo en adultos mayores, personas inmunodeprimidas o con patologías cardiovasculares, aunque también se han descrito casos graves en pacientes inmunocompetentes sin factores de riesgo conocidos (Cuffini et al, 2006; Hahn et al, 2002).

Las neumonías primarias suelen presentarse en niños y adultos jóvenes. El período de incubación es de 1-4 semanas. Los síntomas inicialmente son respiratorios altos (odinofagia y disfonía), fiebre, compromiso general, tos con expectoración mucosa y cefalea. Por lo general los síntomas respiratorios altos desaparecen al iniciarse los síntomas de neumonía (Hahn et al, 2002; Kurz et al, 2009).

Las manifestaciones radiológicas son muy variables, sin un patrón radiológico característico que permita diferenciarla de otras bacterias (Kumar et al, 2011; Somer et al, 2006).

### 1.6.5 Diagnóstico

El CDC (Dowell et al, 2001) define:

**Caso confirmado de neumonía por *C. pneumoniae*:** Enfermedad clínica compatible y confirmado por al menos uno de los siguientes resultados de laboratorio:

- Aislamiento de *C. pneumoniae* en muestras respiratorias (hisopados nasofaríngeos u oro faríngeos, muestras de esputo, muestras de lavado bronco alveolar) y/o muestras de tejido de biopsia.
- Serología positiva para *C. pneumoniae* IgM >120 por FC o MIF.
- Aumento de cuatro veces o más del título serológico de dos muestras de suero de pacientes obtenidos en fase aguda y convaleciente (2-4 semanas) por FC o MIF.
- PCR positiva de muestra respiratoria.

**Caso probable de neumonía por *C. pneumoniae*:**

- Serología positiva en fase aguda; títulos de anticuerpos tipo IgG para *C. pneumoniae* > 512.

La infección por *C. pneumoniae* no induce una buena inmunidad protectora, y puede producirse una reinfección. En los casos de reinfección, la IgM puede no detectarse y el nivel de títulos de IgG aumenta rápidamente en 1-2 semanas. La seroconversión es confirmatoria de la enfermedad. Sin embargo, debido a dificultad de obtención de sueros pareados, la seroconversión no es comprobada. Por lo que las pruebas serológicas es un medio útil para determinar la causa de un brote o la prevalencia de la infección en los estudios epidemiológicos.

Los métodos de diagnóstico de referencia propuesto por el CDC son FC y MIF (Dowell et al, 2001). Varias advertencias en relación a las pruebas serológicas por MIF han sido reportadas, por lo que el diagnóstico de la infección aguda sobre la base de un único título de IgG no se recomienda de forma rutinaria.

Los pacientes de edad avanzada con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, presentan títulos persistentemente elevados de IgG en ausencia de enfermedad clínicamente evidente. La presencia de factor reumatoideo en el suero puede conducir a falsos resultados de IgM positivos. Debido a cruces serológicos con otras especies de *Chlamydia*, la infección detectada por serología debe ser confirmada por otra técnica.



### **1.6.6 Tratamiento**

Como todas las especies del género *Chlamydia* son sensibles a antibióticos específicos como Azitromicina, Eritromicina, Claritromicina, Tetraciclina y Levofloxacina.

Se recomienda la administración de Eritromicina/Clarithromicina en niños menores de 8 años, por 21 días. En niños mayores de 8 años y adultos las alternativas son Eritromicina/Doxiciclina por 21 días.

La duración del tratamiento puede provocar problemas de adherencia; sin embargo, las terapias abreviadas presentan el problema de reincidencia de los síntomas.

## **1.7 *Chlamydia pecorum***

### **1.7.1 Antecedentes**

Hasta el año 1993, las cepas de *C. pecorum* fueron consideradas como miembros de la especie *C. psittaci*, compartiendo muchas de las características fenotípicas, similar morfología de la inclusión, la ausencia de glucógeno en las inclusiones y resistencia a Sulfadiazina.

La palabra “pecorum” proviene del latín rebaños o manadas de ganado (Fukushi y Hirai, 1989). El primer aislamiento de *C. pecorum* fue reportado por McNutt y Waller, 1940 en un cuadro de encefalomiелitis esporádica en ganado bovino.

En 1993, Fukushi y Hirai basados en análisis inmunológicos y de hibridación de ADN sugirieron la separación de las especies *C. pecorum* de *C. psittaci*.

En nuestro país no existen antecedentes de circulación de este agente patógeno.

### **1.7.1 Epidemiología**

### **1.7.2 Serotipos y Genotipos**

Salinas et al 1996, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales mediante MIF, identificó 16 serotipos entre 18 cepas de *C. pecorum* aisladas de ganado ovino y bovino (Salinas et al, 1996).

Jackson et al 1997, basándose en el análisis de la región IV del gen *ompA*, clasificó a las cepas de *C. pecorum* en 5 genotipos (A-E). El genotipo A conformado por secuencias detectadas en muestras urogenitales y conjuntivales de marsupiales de Australia. El genotipo B agrupa secuencias aisladas de ganado porcino de EE.UU. El genotipo C detectado en muestras oculares de marsupiales de Australia. El genotipo D constituido por secuencias de ganado ovino asintomático y con poliartritis/encefalitis de EE.UU. y el genotipo E por aislamientos urogenitales de marsupiales de Australia.

Sin embargo debido a que las cepas de *C. pecorum* presentan muchas variaciones genéticas y antigénicas, actualmente esta clasificación se encuentra en desuso (Yousef Mohamad y Rodolakis, 2010).

#### **1.7.4 Patologías**

##### **Transmisión**

Este agente se encuentra en secreciones nasales, conjuntivales, respiratorias, placentarias y por materia fecal de ganado ovino, bovino y caprino. El contagio se produce por contacto y/o inhalación de estas secreciones.

En caso de abortos en ovinos y caprinos, *C. pecorum* es eliminada por placenta y fluidos uterinos, 2 semanas antes del aborto y hasta 2 ó 3 semanas después de producido el mismo.

En ganado bovino, *C. pecorum* puede producir infecciones genitales que pueden ser transmitidas por vía sexual (Kauffold et al, 2007). De la misma manera, *C. pecorum* se ha encontrado de manera esporádica en semen y muestras de heces de porcinos (Kauffold et al, 2006).

##### **Signos Clínicos y Síntomas**

*C. pecorum* es la especie de *Chlamydia* que infecta principalmente intestino y tracto genital de ganado asintomático.

En ganado bovino, *C. pecorum* está asociado a la producción de encefalomiелitis bovina esporádica, poliartritis, neumonía, enteritis, vaginitis y endometritis (Yousef Mohamad y Rodolakis, 2010). Las infecciones por *C. pecorum* pueden reducir

considerablemente la fertilidad del ganado bovino durante la época de reproducción (Kaltenboeck et al, 2005).

En Marruecos y Túnez, se han aislado cepas de *C. pecorum* asociadas a casos de abortos ovinos y caprinos (Rekiki et al, 2004). En estos ganados, *C. pecorum* originó primariamente cuadros de queratoconjuntivitis y conjuntivitis folicular, así como poliartritis. De la misma forma, establece infecciones subclínicas intestinales o infecciones locales limitadas a las células epiteliales de las mucosas (Shewan et al, 1978; Nietfeld, 2001). Las infecciones oculares pueden frecuentemente presentarse en asociación con afecciones articulares o con neumonías, lo que puede representar tanto una infección sistémica como infecciones locales concomitantes.

En ganado ovino y caprino adulto, la morbilidad es del 80% y la mortalidad es menor a 1%, mientras que en animales jóvenes la mortalidad es alta y puede presentarse de 2 a 10 días posteriores a la aparición de los signos clínicos (Nietfeld, 2001).

Los signos clínicos son fiebre, laminitis, reluctancia al movimiento, anorexia, engrosamiento de las articulaciones, acentuados en animales jóvenes más que en adultos (Rekiki et al, 2004).

En el ganado porcino, la infección por *C. pecorum* se ha asociado con neumonías, poliartritis, pleuritis, pericarditis y abortos (Kaltenboeck y Storz, 1992a; Kaltenboeck et al, 1992b; Kaltenboeck et al, 1993).

En koalas, *C. pecorum* causa conjuntivitis, enfermedad del tracto urinario, reproductivo e infertilidad (Cockram y Jackson, 1974; McColl et al, 1984). Este agente también fue detectado en marsupiales australianos con patologías conjuntivales (Warren et al, 2005).

En Japón Tanaka et al 2005, detectaron *C. pecorum* en muestras de heces de aves de plazas, de la misma manera en Alemania, Sachse et al, 2012 también detectaron este agente en aves Columbiformes de plazas.

*C. pecorum* también ha sido detectado en infecciones múltiples en búfalos de Italia (Greco et al, 2008).

En infecciones respiratorias en humanos este agente bacteriano aún no ha sido reportado.

### 1.7.5 Diagnóstico

El diagnóstico serológico se realiza por FC, MIF, ELISA o Neutralización (NT), sin embargo, debe realizarse otra técnica de identificación, ya que se detecta la presencia del LPS presente en todas las especies de *Chlamydia* y puede presentar reactividad cruzada.

También puede realizarse el diagnóstico por técnicas de biología molecular dirigida al gen *ompA*, *16S*, *incA* y genes housekeeping. Sin embargo por ser el gen más polimórfico se utiliza para el diagnóstico de rutina el gen *ompA*.

El diagnóstico por aislamiento puede realizarse en cultivos de células o en animales, sin embargo no se realiza por ser muy dificultoso.

### 1.7.6 Tratamiento

En casos de aborto enzootico o procesos de poliartritis en hatos, se administra vía intramuscular de Oxitetraciclina en las hembras gestantes y los animales afectados pueden reducir la severidad de la afección (Aitken et al, 1990).

Actualmente, existen dos vacunas comerciales de administración parenteral disponibles para el control del aborto clamidial en pequeños rumiantes (Longbottom y Coulter, 2003). Su administración es previa a la época de empadre, siendo suficiente una dosis para proteger 3 gestaciones subsecuentes. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual dichas vacunas inducen protección, y existe un riesgo de salud pública inherente porque una de las vacunas es una fórmula con cepa viva. Asimismo, a la fecha se siguen realizando diversos estudios dirigidos a la elaboración de vacunas de subunidades o acelulares que proteja contra el aborto y la excreción del microorganismo durante el parto (Rodolakis et al, 1998, Meeusen et al, 2004).

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo General

- Profundizar en el conocimiento eco-epidemiológico de las especies de *Chlamydia* de importancia médico-veterinaria presentes en la provincia de Córdoba, Argentina.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la prevalencia de anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido (LPS) clamidial en muestras de sangre obtenidas de individuos sanos de la población general y comparar con las obtenidas de personas con síntomas respiratorios y/o inespecíficos y que tuvieran nexo epidemiológico para *C. psittaci*.
- Efectuar una búsqueda de *Chlamydia* en muestras clínicas de pacientes con síndromes respiratorios agudos o neumonías atípicas.
- Detectar la circulación de estas bacterias en muestras cloacales de aves de zoológicos y silvestres, capturadas en diferentes regiones de la provincia de Córdoba.
- Detectar la presencia de *Chlamydia spp.* en muestras conjuntivales de equinos y muestras cloacales de reptiles obtenidos en diferentes regiones de la provincia.
- Detectar la presencia de *Chlamydia spp.* en muestras vaginales y anales de mamíferos no humanos obtenidos en las diferentes regiones de la provincia de Córdoba.
- Caracterizar por secuenciación nucleotídico y análisis filogenéticos las cepas detectadas y correlacionar estos resultados con los hallados en otras regiones.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Ante la imposibilidad de obtener dos muestras (faríngea y suero) del mismo paciente se presenta un número diferente de individuos en los grupos en estudio.

#### **3.1 Estudios serológicos en humanos**

##### **3.1.1 Muestras analizadas**

###### **Grupo control**

En el período de marzo 2010 a marzo 2013 fueron procesadas en el Instituto de Virología 314 muestras de sueros o plasma de individuos sanos (156 mujeres y 158 hombres, con una media de edad de 50 años y un rango etario de 21 a 89 años); sin nexo epidemiológico para *C. psittaci*, para la realización de estudios seroepidemiológicos.

Se subdividió al grupo control en tres rangos etarios para su análisis:

21-40 años: adultos jóvenes (n=97).

41-60 años: adultos (n=109).

≥61 años: adultos mayores (n=108).

El grupo control fue constituido siguiendo la fórmula de seroprevalencia de Mateu y Casal, 2003.

###### **Grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci***

En el período de mayo 2010 a marzo 2013 se estudiaron 44 personas (22 mujeres y 22 hombres, con una edad media de 42 años y un rango etario de 21 a 90 años), con nexo epidemiológico para *C. psittaci* denunciados por médicos de diferentes regiones de la provincia de Córdoba y seleccionados por médicos de la Dirección de Epidemiología de Córdoba.

Se subdividió a este grupo en tres rangos etarios para su análisis:

21-40 años: adultos jóvenes (n=14).

41-60 años: adultos (n=23).

≥61 años: adultos mayores (n=7).

Los cuadros clínicos que presentaron los integrantes de este grupo al momento de ingreso al estudio seroepidemiológico, fueron:

Neumonía Atípica (n=30)

Neumonía Típica (n=8)

Enfermedad tipo Influenza (n=5)

Síndrome Febril (n=1)

El diagnóstico presuntivo fue determinado por el médico tratante y obtenido por medio de la ficha de notificación obligatoria para psitacosis.

### **Grupo cuidadores de reptiles**

En el contexto de un estudio en colaboración con la Secretaría de Ambiente y a raíz de investigar un caso de cuadro respiratorio en un reptil, en mayo de 2011 en un centro recreativo de la provincia de Córdoba, se estudiaron muestras de suero de 5 personas que correspondían a personal en contacto directo con reptiles en cautiverio.

En diciembre de 2011 se repitió el estudio de suero de 4 de los cuidadores y en un nuevo trabajador que se había incorporado al centro recreativo en el mes de septiembre y relató que en el mes de octubre había presentado un cuadro de neumonía.

En dichos muestreos se le preguntó al personal sobre el uso de protección al manipular los reptiles y/o sus excretas.

En todos los individuos de los grupos anteriormente descriptos, la muestra de suero fue obtenida en ayuna y por venipunción, la cual fue conservada a -4 °C.

El proyecto y sus respectivos consentimientos informados fueron presentados en el Comité de Bioética del Hospital Nacional de Clínicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Anexo I). El mismo fue aprobado el 6 de mayo del 2010, libro de actas del Comité N°1, acta 86, foja 79.

Para el estudio de casos también se confeccionó una ficha epidemiológica (Anexo II).

### 3.1.2 Métodos serológicos para la detección de anticuerpos anti-LPS de *Chlamydia*

#### Cepa de *Chlamydia* utilizada y suspensión bacteriana

Se preparó un stock bacteriano de la cepa MoPn<sup>T</sup> de *Chlamydia muridarum* a partir de células LLCMK2 inoculadas, la cual se empleó para la detección de anticuerpos anti-*Chlamydia* por la técnica de Neutralización (NT). Dicha cepa almacenada en el laboratorio de *Chlamydia* del Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, fue la de elección, debido a que comparte determinantes antigénicos (LPS) y existen reacciones inmunológicas cruzadas entre las especies de *Chlamydia*. Dicha cepa no presenta riesgo de infección para el operador, ya que no infecta humanos.

Las células infectadas fueron cosechadas con perlas de vidrio estériles y por acción de vortex, fueron desprendidas y lisadas en medio esencial mínimo (MEM) Gibco (New York, USA). El stock fue cosechado cuando presentaron inclusiones visibles al microscopio óptico (48 horas post inoculación) y se fraccionó en alícuotas que fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### Titulación del stock bacteriano

El stock de *Chlamydia muridarum* cepa MoPn<sup>T</sup> fue titulado en células LLCMK2 por el método de unidades formadoras de inclusión (UFI) bajo medio líquido y la concentración bacteriana fue expresada como número de UFI por mililitro (UFI/ml) (Cuffini et al, 2006).

A partir de una botella de  $25\text{ cm}^3$  con células LLCMK<sub>2</sub> cultivadas con MEM y 10% de Suero fetal bovino (SFB) Gibco, se preparó una placa de 96 pocillos con una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ml, realizando los siguientes pasos:



- 1) Se lavó 3 veces la monocapa de células con solución tamponada fosfato (PBS).
- 2) Se agregó 0,5 ml de tripsina-versene (0,25 %) en PBS (T-V), cubriendo toda la monocapa por unos segundos y descartando el exceso, se incubó 5 min a estufa a 37 °C.
- 3) Se resuspendieron y homogeneizaron las células con 1 ml de MEM.
- 4) Se contaron las células con azul Evans en una cámara de Neubauer.
- 5) Se diluyeron las células hasta conseguir una concentración de  $1 \times 10^4$  céls/ml, en MEM y 10 % SFB.
- 6) Se sembraron 0,1 ml en cada pocillo de la placa.
- 7) Se colocó la placa en la estufa a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.
- 8) Se realizó diluciones seriadas, en base 10 del stock bacteriano.
- 9) A las 24 horas de incubación de la placa con la monocapa de células, se sembraron 0,1 ml de cada dilución del stock bacteriano.
- 10) Se centrifugaron por 1 hora a 1.200 g a 37 °C.
- 11) Se dejó reposar 2 horas en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5 %.
- 12) Se reemplazó el sobrenadante de cada pocillo por 0,1 ml de MEM suplementado con 10 % SFB, cicloheximida 1ug/ml, gentamicina 50 ug/ml, 25 mM de Hepes, 56 mM de glucosa, 1 % de aminoácidos no esenciales y se incubó en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 horas.

Cada dilución fue infectada por duplicado. A las 72 horas postinfección se retiró el sobrenadante y se fijó la monocapa con 0,1 ml de metanol frío por 30 min. Se descartó el metanol y se dejó reposar unos minutos para secarla completamente.

Para la visualización se evaluaron tres formas de revelado: tinción con Giemsa al 10%, con anticuerpo anti-LPS FITC-clamidial (Cellabs Brookvale, Australia), acorde a las instrucciones del fabricante y con Naranja Acridina al 1%. Se eligió la Naranja Acridina al 1% ya que permitió una rápida y fácil visualización (Anexo IV).

Se observaron las placas con las células en Microscopio Invertido de Inmunofluorescencia con un aumento de 200x y 400x. Se determinó la solución de trabajo como aquella dilución que contenía 100 UFI/ml.

### Neutralización de placas bajo medio líquido

La detección de anticuerpos en sueros del grupo control y de pacientes con epidemiología positiva para *C. psittaci*, fue realizada por la técnica de Neutralización (NT) de UFI en células LLCMK2 (Carey et al, 2010). El stock bacteriano utilizado fue *C. muridarum* cepa MoPn<sup>T</sup> y las células LLCMK2 fueron mantenidas por pasajes cada 5 días en MEM con 10 % de SFB. Se utilizaron monocapas celulares de 24 horas, sembradas en microplacas de 96 pocillos, con un 70-80 % de confluencia ( $1 \times 10^4$  céls/ml) y mantenidas a 37 °C en estufa con ambiente de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Previo a su utilización, los sueros se inactivaron a 56 °C durante 30 min en baño de agua, para eliminar inhibidores inespecíficos. Luego se centrifugaron durante 30 min a 11.400 g para su descontaminación. Las muestras se diluyeron 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. Volúmenes iguales de diluciones de sueros y bacterias conteniendo 100 UFI, se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se retiró el medio de la monocapa celular y se sustituyó por la mezcla suero-bacteria. Posteriormente la placa con células se centrifugó durante 1 hora a 1.200 g. Luego se incubó durante 2 horas. La mezcla suero-bacteria se retiró y se sustituyeron con 0,1 ml de medio fresco suplementado con 10 % SFB, Cicloheximida 1 µg/ml, Gentamicina 50ug/ml, 25 mM de Hepes, 56 mM de glucosa y 1 % de aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % y luego se fijaron con 100 % de metanol. Se descartó el metanol y se dejó reposar unos minutos hasta lograr que se sequen completamente.

Para la visualización se utilizó 0,1 ml de Naranja Acridina al 1 % durante 10 minutos y posteriormente se descartó.

Se realizó 3 lavados consecutivos con PBS y se observaron las placas con las células en microscopio invertido de inmunofluorescencia con un aumento de 200x y 400x.

Se consideró positivo todo aquel suero que neutralizó el 80 % o más de las UFI inoculadas y los títulos se expresaron como la inversa de la máxima dilución que reduce el 80 % de las UFI incluidas en la prueba.

### **Detección de inmunoglobulinas M y G por Microinmunofluorescencia**

La detección de anticuerpos en sueros del grupo de cuidadores de reptiles en cautiverio del centro recreativo de la provincia de Córdoba, fue realizada por el ensayo comercial microinmunofluorescencia (MIF) Bion Enterprises®, France. La técnica fue realizada e interpretada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los resultados se expresaron en títulos de inmunoglobulinas M y G. Los spots con cuerpos elementales para *C. pneumoniae*, fueron observados en Microscopio Invertido de Inmunofluorescencia con un aumento de 200x y 400x.

### **3.2 Estudios moleculares en humanos**

#### **3.2.1 Muestras analizadas para la detección de ADN de *Chlamydia***

En el período de marzo 2010 a diciembre del 2012 fueron procesadas en el Instituto de Virología 76 muestras de hisopados faríngeos (40 mujeres y 36 hombres, con una media de edad de 43 años y un rango etario de 1 a 90 años); que ingresaron con epidemiología compatible con psitacosis. El 65 % de las personas analizadas procedían de la ciudad Capital de la provincia de Córdoba.

Se subdividió al grupo en cuatro rangos etarios:

≤20 años: niños y jóvenes adolescentes (n=12).

21-40 años: adultos jóvenes (n=22).

41-60 años: adultos (n=34).

≥61 años: adultos mayores (n=8).

Los cuadros clínicos que presentaron los integrantes de este grupo al momento de ingreso al estudio, fueron:

Neumonía Atípica (n=53)

Neumonía Típica (n=6)

Enfermedad tipo Influenza (n=10)

Síndrome Febril (n=7)

Los hisopados faríngeos se colocaron en 1 ml de sacarosa-fosfato-glutamato y divididos en dos alícuotas, de una de ellas se utilizó 200 µl para la detección de *Chlamydia* por técnicas de biología molecular y la restante fue almacenada a -80 °C.

### **3.2.2 Métodos moleculares para la detección de ADN de *Chlamydia***

Para la implementación de todos los ensayos de biología molecular, previamente se seleccionaron los oligonucleótidos iniciadores en base al análisis de secuencias nucleotídicas de aislamientos de todas la especies de *Chlamydia*.

#### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó utilizando el equipo comercial de extracción de Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Alameda, CA, USA) de acuerdo al siguiente protocolo.

- 1) A cada tubo de reacción de 1,5 ml que contenía 200 µl de la muestra, se le adicionó 20 µl de Proteinasa K.
- 2) Las muestras fueron homogeneizadas una a una por agitación con vortex durante 1 minuto.
- 3) Luego se las colocó en baño de agua a 60 °C durante 1 hora.
- 4) Luego de la incubación, se inactivó la enzima por adición de 100 µl de alcohol isopropílico absoluto y se homogeneizó suavemente con el tips de extracción.
- 5) La fase acuosa se transfirió a un tubo de reacción de 2 ml que contenía la columna de extracción y se sometió a centrifugación por 1 minuto a 5.900 g.
- 6) Posteriormente, se transfirió la columna a un tubo de reacción de 2 ml para el lavado de la columna.
- 7) Se adicionó 500 µl de buffer de lavado 1, previamente suplementado con 80 ml de alcohol etílico absoluto.
- 8) Se centrifugó a 5900 g durante 1 minuto.
- 9) Se descartó el alcohol precipitado, se agregó 500 µl de buffer de lavado 2, previamente suplementado con alcohol etílico absoluto y se repitió el paso N°8.
- 10) Se descartó el alcohol precipitado y se centrifugó la columna sola a 13.400 g durante 1 minuto, para eliminar restos de alcohol que puedan inhibir la enzima Gotaq polimerasa de la PCR.
- 11) Se transfirió la columna a un nuevo tubo de reacción de 1,5 ml y se adicionó 200 µl del buffer de elución TE.
- 12) Se centrifugó durante 1 minuto a 5.900 g.
- 13) Se descartó la columna y se almacenó el extracto de ADN a 4 °C hasta su utilización.

**Observación:** la técnica de separación de la muestra y hasta el paso 3 de la extracción de ADN se realizó bajo cabina de seguridad biológica, descontaminando previa y posteriormente la superficie de trabajo con luz ultravioleta.

### **Técnica de PCR genérica para la amplificación de un fragmento genómico de los dominios II, III y IV del gen *ompA* de *Chlamydia***

Se implementó la técnica de PCR genérica para la detección de un fragmento de 576 pb de los dominios variables II, III y IV del gen *ompA* de *Chlamydia*.

Los oligonucleótidos se seleccionaron de acuerdo al protocolo previamente descrito por Sachse and Hotzel, 2003.

Los oligonucleótidos externos seleccionados fueron 191CHOMP (GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC) y 371 CHOMP (TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC).

Los fragmentos de ADN (5 µl) fueron amplificados en presencia de 0,2 mM de los respectivos oligonucleótidos, de 0,8 mM de dNTPs y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa (PROMEGA, Madison, WI USA) en volumen final 50 µl.

La reacción constó de una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 segundos, 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos, seguido por una etapa de extensión final a 94 °C por 10 minutos.

La cepa L2/434/Bu de *C. trachomatis* (CP002024) utilizada como control positivo de reacción, fue cedida por el Dr. Marcelo Rodríguez Fermepín de la Universidad Nacional de Buenos Aires.

### **Nested-PCR para la determinación específica de *C. psittaci* y *C. pecorum***

La segunda etapa de amplificación (nested-PCR) se realizó solo a las muestras que resultaron positivas por PCR genérica, a partir de 2 µl del producto de la PCR genérica en presencia de 0,2 mM de los respectivos oligonucleótidos internos, [siendo el oligonucleótido antisense el mismo para los dos sense (Tabla N°1)], de 0,8 mM de dNTPs y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa (PROMEGA, Madison, WI USA) en volumen final 50 µl.

Luego de una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, el ADN fue sometido a 20 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C por 30 segundos, seguido por una etapa de extensión final a 94 °C por 10 minutos.

La cepa VS225 de *C. psittaci* (CP003793) se adquirió de manera comercial y la cepa 2047 de *C. pecorum* (GQ228191) fue cedida por el Dr. Marcelo Rodríguez Fermepín de la Universidad Nacional de Buenos Aires. Ambas cepas fueron utilizadas como controles positivos de reacción.

**Tabla N° 1:** Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación de fragmentos de 389 pb y 441 pb del dominio IV del gen *ompA* del genoma de *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia pecorum*, respectivamente.

Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del fragmento
218 PSITT (S)	GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG	389 pb
204 PECOR (S)	CCA ATA YGC ACA ATC KAA ACC TCG C	441 pb
336 CHOMP (A)	CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT	

<sup>a</sup> Código de oligonucleótido, la letra entre paréntesis indica la polaridad (S, “sense”; A “antisense”).

### PCR para la determinación específica de *C. pneumoniae*

Se estableció la técnica de PCR para la determinación de 437 pb del fragmento PstI del gen *rpoβ* de *C. pneumoniae*.

Los fragmentos de ADN (10 µl) fueron amplificados en presencia de cebadores externos HL1/HR1 (Tabla N° 2) descriptos previamente por Campbell et al, 1998; y por adición de 0,8 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa.

Luego de una etapa de desnaturalización 4 minutos a 95 °C, el ADN fue sometido a 35 ciclos de desnaturalización 1 minuto a 94 °C, hibridación 1 minuto a 53 °C, elongación 1 minuto a 72 °C y una etapa de elongación final 7 minutos a 72 °C.

La cepa de referencia AR39 de *C. pneumoniae* (ATCC 53592), que se encontraba almacenada en el laboratorio de *Chlamydia* del Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, fue utilizada como control positivo de reacción.

### Reacción de nested-PCR

La segunda etapa de amplificación se realizó a partir de 2 µl de la PCR I, en presencia de los cebadores internos N1/N2 (Tabla N° 2), descritos previamente por Maass et al, 1998; en las mismas condiciones de la primera amplificación, para la obtención de un amplicón de 128 pb.

**Tabla N° 2:** Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación de fragmentos de 437 pb y 128 pb del gen *rpoβ* del genoma de *C. pneumoniae*.

Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia (5'→3')	Tamaño del fragmento
HL1 (S)	GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT	437 pb
HR1(A)	TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT	
N1(S)	AGT TGA GCA TAT TCG TGA GG	128 pb
N2(A)	TTT ATT TCC GTG TCG TCC AG	

<sup>a</sup> Código de oligonucleótido, la letra entre paréntesis indica la polaridad (S, “sense”; A “antisense”).

### Reacción de heminested-PCR para la determinación del fragmento PstI del gen *rpoβ* de *C. pneumoniae*

Con el fin obtener un fragmento de mayor tamaño y lograr su secuenciación, se implementó una heminested-PCR obteniendo 522 pb del fragmento PstI del gen *rpoβ* de *C. pneumoniae*. Para esto se implementaron dos reacciones de heminested-PCR con los cebadores ya descritos por Campbell et al, 1998 y Maass et al, 1998.

Diez microlitros de ADN fueron amplificados en presencia de cebadores HL1/N2; 0,8 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa (273 pb) y otros 10 µl fueron amplificados en presencia de cebadores N1/HR1; en presencia de 0,8 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa (249 pb).



Luego de una etapa de desnaturalización de 4 minutos a 95 °C, el ADN fue sometido a 35 ciclos de desnaturalización 1 minuto a 94 °C, hibridación 1 minuto a 53 °C, elongación 1 minuto a 72 °C y por último una etapa de elongación final de 7 minutos a 72 °C.

#### **Nested-PCR para la determinación del genotipo de *C. pneumoniae* (dominio variable IV del gen *ompA*)**

Con la finalidad de obtener el genotipo de las muestras que resultaron positivas para *C. pneumoniae*, se implementó una nested-PCR desarrollada por Bodetti et al, 2002. Este ensayo está dirigido al dominio variable IV del gen *ompA* de *C. pneumoniae*.

Así, 10 µl de ADN fueron amplificados en presencia de cebadores externos Cpn5P/Cpn3P (Tabla N° 3) y en 0,8 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa.

Luego de una etapa de desnaturalización de 5 min a 95 °C, el ADN fue sometido a 45 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, y extensión 45 segundos a 72 °C, y por último una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

La segunda etapa de amplificación se realizó a partir de 2 µl de la PCR I, en presencia de los cebadores internos Cpn5N/Cpn3N (Tabla N° 3), descritos previamente por Bodetti et al, 2002; en las mismas condiciones de la primera amplificación, para la obtención de un amplicón de 279 pb.

**Tabla N° 3:** Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación de fragmentos de 419 pb y 279 pb del gen *ompA* del genoma de *C. pneumoniae*.

Oligonucleótido <sup>a</sup>	Secuencia (5'→3')	Tamaño del fragmento
Cpn5P (S)	CCAATATGCACAGTCCAAACCTAAAA	419pb
Cpn3P (A)	CTAGATTTAAACTTGTTGATCTGACAG	
Cpn5N (S)	CTCTGTAAACAAACCGGGC	279 pb
Cpn3N (A)	GATCTGACAGGAAACAATTTGCAT	

<sup>a</sup> Código de oligonucleótido, la letra entre paréntesis indica la polaridad (S, “sense”; A “antisense”).

### **Nested-PCR para la determinación de otras especies de *Chlamydia***

Con la finalidad de determinar la especie de *Chlamydia* presente en aquellas muestras que resultaron negativas para *C. psittaci*, *C. pecorum* y *C. pneumoniae* se implementó una nested-PCR para la determinación de un fragmento de 420 pb correspondiente al género *Chlamydia*.

A partir del producto de 576 pb de la PCR genérica, de 2 µl se utilizaron en 0,2 mM de los oligonucleótidos internos 201 CHOMP (GGI GCW GMI TTC CAA TAY GCI CAR TC) y 336 CHOMP (CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT), 0,8 mM de dNTPs y 1 unidad de enzima Gotaq polimerasa en volumen final 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las anteriormente descritas para la PCR genérica.

### **Visualización de los fragmentos obtenidos por nested-PCR**

La detección de los productos de nested-PCR y heminested-PCR, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % conteniendo 0,5 µl/ml de bromuro de etidio. Para la determinación del peso molecular de los amplicones detectados se utilizó un marcador de peso molecular (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), donde cada banda de los fragmentos de ADN corresponde a 100 pb y en incremento de 100 pb hasta 1100 pb. La banda más nítida se corresponde al fragmento de 500 pb que posee una triple masa de ADN.

La visualización de los productos amplificados se examinó mediante el uso de un transiluminador ultra-violeta (Sigma).

### **Determinación del límite de detección de la técnica de PCR genérica**

Con el fin de determinar el límite de detección de la PCR genérica, se utilizaron diluciones preparadas del stock de *Chlamydia muridarum* cepa MoPn<sup>T</sup>, de concentración conocida y se realizó extracción de ADN con el protocolo previamente descrito.

A cada dilución se realizó PCR genérica en las condiciones de amplificación previamente descritas.

### **Determinación cuantitativa del ADN de *Chlamydia***

Para la implementación de este ensayo, previamente se cuantificó la cepa de *C. muridarum* MoPn<sup>T</sup> que fue utilizada como control positivo de reacción, mediante titulación del stock en células LLCMK2 por el método de unidades formadoras de inclusión (UFI) bajo medio líquido. La concentración de ADN bacteriana fue expresada como número de UFI por mililitro (UFI/ml) (Cuffini et al, 2006).

Para la realización de la curva de calibración para estandarizar el ensayo, se realizó la extracción a las mismas alícuotas del stock anteriormente descrito.

Este ensayo amplificó un fragmento del gen 23S ARNr de Chlamydiaceae, y se realizó a partir de 5 µl de ADN, en presencia de los primers TQF, TQR y probe (tabla N° 4), en un volumen final de 25 µl, usando un termociclador ABI Prism7000 (Applied Biosystems). El límite de detección (Ct) fue previamente fijado en 0,2 y mantenido en todos los ensayos (Ehricht et al, 2006).

La eficiencia de reacción se calculó utilizando la fórmula,  $E: 10(-1/m)-1$ , siendo E, la eficiencia de la corrida y m, la pendiente de la curva de calibración. La eficiencia aceptada se fijó entre 90-110 %.

Para la conversión de las copias de genomas de *Chlamydia* en UFI se utilizó la relación formulada por Everett et al, 1999b.

Cada muestra fue realizada por duplicado y en todos los ensayos se utilizó curva de calibración.

**Tabla N° 4:** Secuencia de nucleótidos de los cebadores y sonda utilizados en la amplificación de un fragmento de 26 pb del gen 23S ARNr de Chlamydiaceae.

Oligonucleótidos <sup>a</sup> y sonda	Secuencia (5' → 3')
TQF(S)	GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG
TQR(A)	CTTAACTCCCTGGCTCATCATG
Sonda	FAM-CAAAAGGCACGCCGTCAAC-TAMRA

<sup>a</sup> Código de oligonucleótido, la letra entre paréntesis indica la polaridad (S, "sense"; A "antisense").

### **Caracterización genómica de los amplicones de *Chlamydia* mediante secuenciación directa**

Los productos de las nested-PCR y heminested-PCR de tamaño esperado fueron extraídos del gel y purificados a partir de la banda, utilizando el equipo comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Posteriormente el ADN (4 µl) purificado fue sometido a una nueva corrida electroforética conjuntamente con un marcador de peso molecular -Low DNA MASS<sup>TM</sup> ladder (Life-Technologies, USA)- que permite establecer la cantidad (ng/µl) aproximada de ADN presente en la muestra pre-secuenciación.

El ADN purificado (150 ng/µl) fue sometido a la reacción de secuenciación en ambas direcciones utilizando los cebadores de las respectivas nested-PCR y heminested-PCR (Macrogen, Inc. Seúl, Corea).

Una vez obtenida las secuencias de los fragmentos amplificados las mismas fueron editadas utilizando el programa ClustalX (Conway Institute UCD Dublin, Dublin, Irlanda). Posteriormente las secuencias consenso obtenidas se compararon mediante BLASTn 2.2.19 -Basic Local Alignment Search Tool- (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Zheng Zhang et al, 2000) contra el conjunto completo de fragmentos genómicos de *Chlamydia* obtenidos del banco de datos GenBank, mediante un corte E-value de 5<sup>10</sup>.

Mediante el programa MEGA versión 4 (Tamura et al, 2007) se realizó el alineamiento de todas las secuencias disponibles en el banco de datos GenBank. El modelo de sustitución nucleotídica fue seleccionado acorde al Criterio de Akaike implementado el programa ModelTest 3.7 (Universidad de Vigo, Galicia, España) (Posada y Crandall, 1998) y se procedió a su análisis mediante la implementación del programa PhyML 3.0 (Université de Montpellier, Montpellier, Francia) (Guindon y Gascuel, 2003).

A fin de obtener un dendograma consenso con soporte estadístico se procedió a realizar un “bootstrap” o generación de pseudoréplicas de la matriz original de ADN (2000 veces).

La edición final de los dendogramas obtenidos se realizó utilizando el programa Dendroscope (Universidad de Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) (Huson et al, 2007).

### **3.2.3 Análisis estadísticos**

Los resultados del estudio de serología fueron calculados con intervalos de confianza exacto binomial (IC) de 95 %. La prevalencia de las poblaciones fue analizada como proporciones independientes en dos poblaciones con el programa para análisis epidemiológicos de datos tabulados Epidat, Versión 3.1 (Xunta de Galicia, OPS, 2006).

## **3.3 Estudios moleculares en animales**

### **3.3.1 Muestras analizadas**

Con la finalidad de investigar la situación de los animales silvestres y en cautiverio en la provincia de Córdoba, se firmó un acuerdo de trabajo de mutua colaboración entre el Instituto de Virología y Secretaría de Ambiente de la provincia de Córdoba.

Los animales en cautiverio ilegal fueron incautados por la patrulla Ambiental y derivados al Zoológico de Córdoba para su evaluación y tratamiento, pasando a ser parte del establecimiento.

### **Colecta de aves, área de estudio y recolección de las muestras**

Las colectas de aves se realizaron con una frecuencia anual durante los años 2009-2012 en 4 sitios de la provincia de Córdoba (Reserva Provincial de Uso Múltiple “Baños del Río Dulce y Laguna Mar Chiquita”, zona rural de Vicuña Mackenna, zona rural de Deán Funes y aves incautadas por la Patrulla Ambiental).

Detalles sobre la caracterización biológica y antropomórfica de los sitios fueron registrados. Los detalles de los sitios de las capturas se encuentran en el Anexo III.

La captura de aves silvestres, se realizó mediante la utilización de redes de niebla japonesa de nylon negro adquiridas en AFO Supplies (American Field Ornithologist Supplies) (<http://www.afonet.org/banding/index.html>). Se utilizó redes de 2,5 m de alto por 6 m y 12 m de largo. Con el objetivo de coleccionar una amplia gama de especies de aves se utilizaron redes de dos diámetros de entramado (36 mm y 62 mm).

Se dispusieron un total de 6 redes por sitio de colecta las cuales se abrieron antes del amanecer hasta las 11 horas y al atardecer hasta aproximadamente las 21 horas. Las redes se recorrieron cada 30 minutos dependiendo de las condiciones climáticas. En días fríos, con llovizna o muy calurosos las redes se revisaban cada 15 minutos para evitar la muerte de las aves por hipotermia o deshidratación. Los individuos coleccionados fueron trasladados en bolsas de tela hasta el lugar de toma de muestras donde fueron identificados, anillados, pesados y se les determinó sexo y edad cuando fue posible.

Se utilizaron anillos metálicos propios y del Centro Nacional de Anillado de Aves (Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán) de numeración continua.

Las aves fueron hisopadas por la cloaca. Se utilizaron hisopos de dacron y metálicos para individuos de menor tamaño.

Los hisopos fueron coleccionados en 1 ml de buffer de sacarosa-fosfato-glutamato suplementado al 10 % SFB, 1 % con Gentamicina, 1 % Anfotericina.

Las muestras fueron conservadas refrigeradas y se trasladaron al laboratorio donde fueron resuspendidas por agitación con vortex, se retiró el hisopo y se las fraccionó en dos alícuotas. Una alícuota de 200 µl se reservó para la determinación por técnicas de biología molecular y la restante alícuota se la almacenó -80 °C.

Para las aves incautadas por la Patrulla ambiental se realizó el mismo procedimiento que para la toma de muestra de aves silvestres.

Las aves estudiadas asintomáticas, se clasificaron en tres grupos diferentes:

- a) 505 aves silvestres (aves del Santuario de Aves y Fauna Silvestre).
- b) 212 aves incautadas mantenidas como mascotas.
- c) 76 aves en cautiverio de zoológicos.

Las especies estudiadas se detallan en la tabla N° 5.

**Tabla N° 5:** Especies de aves colectadas y detalle del lugar de captura en el período 2009-2012, en la provincia de Córdoba utilizados en el ensayo de detección de *Chlamydia*.

Clasificación de las aves analizadas			Procedencia de las muestras				
Orden* (n)	Familia* (n)	Género*	Aves CZ (n)	Aves CM (n)	Aves SA (n)	Total	
Anseriformes (2)	Anatidae (2)	<i>Anser</i>	1	1	0	2	
Caprimulgiformes (1)	Caprimulgidae (1)	<i>Caprimulgus</i>	0	0	1	1	
Columbiformes (170)	Columbidae (170)	<i>Columba</i>	0	0	6	6	
		<i>Columbina</i>	0	0	160	160	
		<i>Zenaida</i>	0	0	4	4	
		<i>Coccyzus</i>	0	0	1	1	
Cuculiformes (1)	Cuculidae (1)	<i>Coccyzus</i>	0	0	1	1	
Falconiformes (7)	Cathartidae (1)	<i>Coragyps</i>	0	1	0	1	
	Falconidae (6)	<i>Falco</i>	0	3	2	5	
		<i>Polyborus</i>	1	0	0	1	
Galliformes (81)	Cracacidae (1)	<i>Crax</i>	1	0	0	1	
	Phasianidae(80)	<i>Gallus</i>	0	41	38	79	
		<i>Meleagris</i>	0	1	0	1	
Passeriformes (433)	Cinclidae (6)	<i>Troglodytes</i>	0	0	6	6	
	Corvidae (1)	<i>Cyanocorax</i>	0	1	0	1	
	Dendrocolaptidae (2)	<i>Lepidocolaptes</i>		0	0	2	2
				0	0	1	1
	Emberizidae (220)	<i>Aimophila</i>	<i>Catamenia</i>	0	2	2	4
			<i>Coryphospingus</i>	0	0	4	4
			<i>Cyanocompsa</i>	1	36	5	42
			<i>Diuca</i>	0	1	0	1
			<i>Embernagra</i>	0	1	0	1
			<i>Gubernatrix</i>	0	2	0	2
			<i>Lophospingus</i>	0	0	6	6
			<i>Paroaria</i>	0	16	3	19
			<i>Pheucticus</i>	0	9	0	9
			<i>Poospiza</i>	0	0	24	24
			<i>Saltator</i>	2	13	24	39
			<i>Saltatricula</i>	2	4	4	10
			<i>Serinus</i>	1	0	0	1
			<i>Sicalis</i>	0	21	2	23
			<i>Sporophila</i>	0	4	3	7
			<i>Volatinia</i>	0	0	1	1
<i>Zonotrichia</i>	0	2	24	26			
Estrildidae (2)	<i>Padda</i>	2	0	0	2		
Formicariidae (1)	<i>Taraba</i>	0	0	1	1		
Fringillidae (1)	<i>Carduelis</i>	0	1	0	1		
Furnariidae (20)	<i>Asthenes</i>		0	0	2	2	
			0	0	15	15	
			0	0	2	2	
			0	0	1	1	
Icteridae (10)	<i>Agelaius</i>		0	1	0	1	
			0	1	0	1	



		<i>Dolichonyx</i>	0	2	0	2
		<i>Molothrus</i>	0	0	7	7
	Mimidae (7)	<i>Mimus</i>	0	0	7	7
	Parulidae (1)	<i>Geothlypis</i>	0	0	1	1
	Phytotomidae (7)	<i>Phytotoma</i>	0	0	7	7
	Ploceidae (56)	<i>Passer</i>	0	0	56	56
	Sturnidae (1)	<i>Acridotheres</i>	0	1	0	1
	Thraupidae (15)	<i>Piranga</i>	0	1	0	1
		<i>Thraupis</i>	0	11	3	14
	Turdidae (24)	<i>Turdus</i>	1	19	4	24
	Tyrannidae (58)	<i>Coryphistera</i>	0	0	9	9
		<i>Cranioleuca</i>	0	0	2	2
		<i>Hymenops</i>	0	0	1	1
		<i>Knipolegus</i>	0	0	1	1
		<i>Elaenia</i>	0	0	26	26
		<i>Empidonomus</i>	0	0	1	1
		<i>Pitangus</i>	0	0	11	11
		<i>Stigmatura</i>	0	0	6	6
		<i>Tyrannus</i>	0	0	1	1
		Vireonidae (1)	<i>Cyclarhis</i>	0	0	1
Phoenicopteriformes (3)	Phoenicopteridae (3)	<i>Phoenicopterus</i>	3	0	0	3
Piciformes (9)	Bucconidae (1)	<i>Nystalus</i>	0	0	1	1
	Picidae (4)	<i>Colaptes</i>	0	0	3	3
		<i>Picoides</i>	0	0	1	1
Psittaciformes (76)	Ramphastidae (4)	<i>Ramphartor</i>	4	0	0	4
	Psittacidae (76)	<i>Agapornis</i>	6	0	0	6
		<i>Amazona</i>	1	1	0	2
		<i>Aratinga</i>	1	0	0	1
		<i>Cyanoliseus</i>	1	3	0	4
		<i>Melopsittacus</i>	24	2	0	26
		<i>Myopsitta</i>	2	11	12	25
		<i>Nymphicus</i>	8	0	0	8
<i>Psittacula</i>	4	0	0	4		
Rheiformes (9)	Rheidae (9)	<i>Rhea</i>	9	0	0	9
Strigiformes (1)	Tytonidae (1)	<i>Tyto</i>	1	0	0	1
<b>TOTAL</b>			<b>76</b>	<b>212</b>	<b>505</b>	<b>793</b>

\* Narosky e Yzurieta, 2007, clasificación utilizada para la identificación de las aves.

CZ: en cautiverio en zoológicos.

CM: en cautiverio como mascotas.

SA: silvestres asintomáticas.

### **Colecta de los hisopados conjuntivales de equinos para estudios moleculares**

La colecta de muestras conjuntivales de equinos se realizó en forma conjunta con la colecta de aves. Seis de los equinos muestreados (2 hembras y 4 machos) correspondieron a la región N-E (Punto 1, Anexo III) de la provincia y 24 a la región S (18 hembras y 6 machos) (Punto 3, Anexo III).

Las muestras fueron identificadas y se registró la edad, sexo y los antecedentes clínicos de cada animal. Los hisopados fueron tomados en región conjuntival, en forma rotatoria, con hisopodos de dacron.

Los hisopados conjuntivales se procesaron de igual manera que las muestras de aves.

### **Colecta de los hisopados cloacales de reptiles en cautiverio**

Se colectaron muestras mediante hisopados cloacales de 5 reptiles en cautiverio incautados por tenencia ilegal por la Patrulla Ambiental y derivados al Zoológico de Córdoba, durante el período 2010-2012.

En un centro recreativo de la provincia se colectaron 27 muestras de reptiles en cautiverio en dos muestreos sucesivos. En el mes de mayo del 2011, se colectaron muestras mediante hisopados cloacales de 19 reptiles en cautiverio; se repitió el muestreo en el mes de diciembre y se colectaron 8 muestras.

Las muestras fueron colectadas y procesadas de la misma manera que los hisopados cloacales de aves.

Las especies estudiadas se detallan en la tabla N° 6.

**Tabla N° 6:** Especies de reptiles colectadas en el período 2009-2012, en la provincia de Córdoba utilizados en el ensayo de detección de *Chlamydia*.

Clasificación de los reptiles		Reptiles en cautiverio (n)
Género	Especie	
<i>Pythom</i>	<i>molurus bivittatus</i>	8
	<i>reticulatus</i>	4
	<i>regius</i>	3
<i>Tupinambis</i>	<i>merianae</i>	1
<i>Iguana</i>	<i>iguana</i>	1
<i>Bothrops</i>	<i>alternatus</i>	1
	<i>mewiedii</i>	1
<i>Crotalus</i>	<i>derisus terrificus</i>	1
	<i>atrox</i>	1
<i>Micrurus</i>	<i>pirracryptus</i>	1
<i>Trachemys</i>	<i>scripta elegans</i>	4
<i>Phrynops</i>	<i>hilaris</i>	4
TOTAL		30

#### **Colecta de hisopados anales y vaginales de mamíferos no humanos**

Las muestras de hisopados anales y vaginales de mamíferos no humanos se obtuvieron de animales incautados por tenencia ilegal por Patrulla Ambiental y derivados al Zoológico de Córdoba. Además se colectó muestras de animales de zoológicos o centros recreativos de la provincia, durante el período 2010-2012.

Las muestras fueron colectadas y procesadas de la misma manera que los hisopados cloacales de aves.

Las muestras de mamíferos no humanos fueron clasificadas en dos grupos:

- a) mamíferos no humanos mantenidos en cautiverio como mascotas.
- b) mamíferos no humanos en cautiverio de zoológicos.

Las especies estudiadas se detallan en la tabla N° 7.

**Tabla N° 7:** Características de los mamíferos no humanos en cautiverio colectados en el período 2009-2012, en la provincia de Córdoba.

Clasificación de los mamíferos no humanos		Sitio de obtención de la muestra	
Género	Especie	Mamíferos en cautiverio de zoológicos (n)	Mamíferos en cautiverio como mascotas (n)
<i>Alouatta</i>	<i>carayá</i>	1	0
<i>Suricata</i>	<i>suricata</i>	1	0
<i>Atelerix</i>	<i>albiventris</i>	0	2
<i>Ovis</i>	<i>aries</i>	6	0
<i>Mustela</i>	<i>putorius furo</i>	2	0
TOTAL		10	2

## 4. RESULTADOS

### 4.1.1 Detección de anticuerpos anti- LPS de *Chlamydia* por neutralización (NT)

#### Grupo control

La prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-LPS de *Chlamydia* de la población control fue de **14,7 % (46/314)** (Tabla N° 8).

Si bien la mayor seroprevalencia se observó en el rango etario de los adultos (41-60 años), no existieron diferencias significativas entre los rangos etarios, el género, el título de anticuerpos detectado y la seroprevalencia en el grupo control.

Respecto al título de anticuerpos, de 46 voluntarios seropositivos 40 (87,0 %) poseían anticuerpos neutralizantes contra *Chlamydia* en títulos de 10, con una similar distribución respecto al género y en títulos de 20 en el 13,0 % (n=6) de los integrantes del grupo control. No se detectaron anticuerpos neutralizantes contra *Chlamydia* en títulos iguales o mayores de 40.

Con respecto a los títulos de anticuerpos vs el rango etario en ambos géneros, no se detectaron anticuerpos neutralizantes contra *Chlamydia* en títulos de 20 en individuos menores de 40 años (Tabla N° 8).

**Tabla N° 8:** Títulos de anticuerpos contra *Chlamydia* en relación al género y rango etario de los integrantes del grupo control.

Rango etario	% TOTAL (n)	% Masculino (n)		% Femenino (n)	
		Títulos de anticuerpos neutralizantes		Títulos de anticuerpos neutralizantes	
		10	20	10	20
21-40	11,3 (11/97)	10,2 (5/49)	0,0 (0/49)	12,5 (6/48)	0,0 (0/48)
41-60	17,4 (19/109)	15,4 (10/65)	3,0 (2/65)	11,4 (5/44)	4,5 (2/44)
≥61	14,8 (16/108)	13,6 (6/44)	0,0 (0/44)	12,5 (8/64)	3,1 (2/64)
% TOTAL (n)	14,7 (46/314)	13,3 (21/158)	1,3 (2/158)	12,2 (19/156)	2,6 (4/156)

### **Grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci***

La prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-LPS de *Chlamydia* de la población con nexo epidemiológico para *C. psittaci* fue de **68,2 % (30/44)**.

La prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra *Chlamydia* en el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci* con respecto a los rangos etarios de los integrantes se detallan en la tabla N°9. La mayor seroprevalencia se observó en el rango etario de la tercera edad ( $\geq 61$  años), en ambos sexos.

Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre edad, el género, los títulos de anticuerpos detectados y la seroprevalencia en el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*.

De los 30 individuos seropositivos, el 26,6 % (n=8) poseían anticuerpos neutralizantes contra *Chlamydia* en títulos de 10. Se encontraron títulos de 20 en el 16,7 % (n=5) de los individuos seropositivos, títulos de 40 en el 33,3 % (n=10) y títulos iguales o mayores a 80 en el 23,3 % (n= 7).

**Tabla N° 9:** Títulos de anticuerpos contra *Chlamydia* en relación al género y rango etario de los integrantes del grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*.

Rango etario	% TOTAL (n)	% Masculino (n)				% Femenino (n)			
		Títulos de anticuerpos neutralizantes							
		10	20	40	≥80	10	20	40	≥80
21-40	64,3 (9/14)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	25,0 (2/8)	12,5 (1/8)	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)
41-60	69,6 (16/23)	27,3 (3/11)	9,1 (1/11)	9,1 (1/11)	18,2 (2/11)	16,7 (2/12)	8,4 (1/12)	33,4 (4/12)	16,7 (2/12)
≥61	71,4 (5/7)	0,0 (0/3)	33,4 (1/3)	33,4 (1/3)	0,0 (0/3)	25,0 (1/4)	0,0 (0/4)	25,0 (1/4)	25,0 (1/4)
% TOTAL (n)	68,2 (30/44)	18,2 (4/22)	13,6 (3/22)	18,2 (4/22)	13,6 (3/22)	18,2 (4/22)	9,1 (2/22)	27,3 (6/22)	18,2 (4/22)



Se presentan en la tabla N° 10, los cuadros clínicos que exhibían los integrantes del grupo de personas con nexo epidemiológico para *C. psittaci* en relación a la respuesta serológica de las mismas.

Del total de individuos con serología positiva para *Chlamydia* el cuadro clínico más frecuente fue Neumonía Atípica y de ellos el 73,3 % presentó anticuerpos neutralizantes y con títulos elevados ( $Z=4,85$  [0,300-0,645]  $p=0,0001$ ).

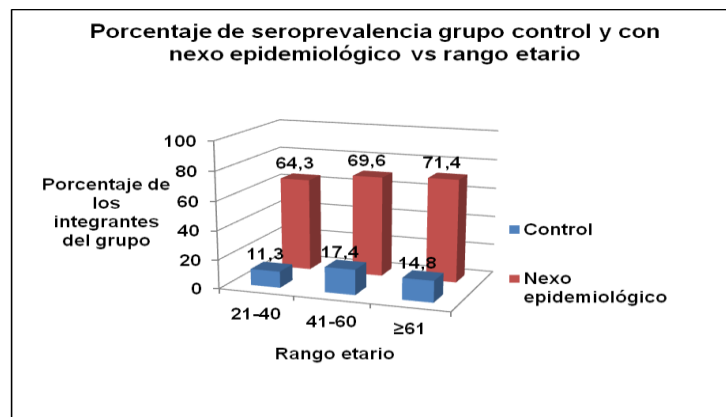
**Tabla N° 10:** Cuadros clínicos que presentaban los pacientes en relación a la respuesta serológica contra *Chlamydia*.

Cuadro clínico	% TOTAL (n)	Títulos de anticuerpos neutralizantes (n)			
		10	20	40	≥80
Neumonía atípica*	73,3 (22/30)	5	4	8	5
Neumonía típica	50,0 (4/8)	2	0	2	0
Enfermedad tipo Influenza	60,0 (3/5)	0	1	0	2
Síndrome febril	100,0 (1/1)	1	0	0	0

\*  $p=0,0001$ .

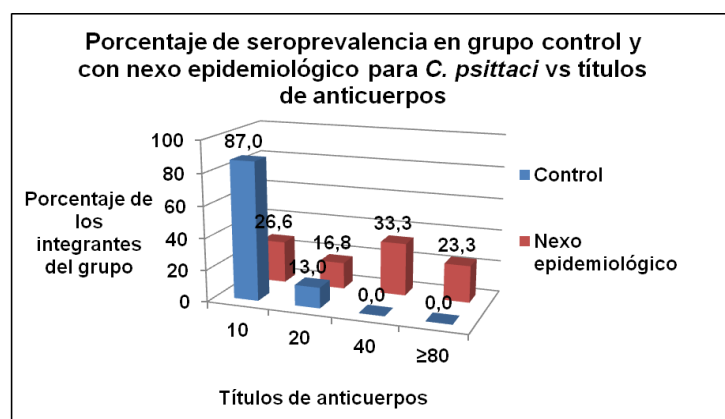
#### 4.1.2 Estudio comparativo de seroprevalencia detectada en el grupo control y en el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*

En la Fig. N° 5 se muestran la seroprevalencia de ambos grupos en función al rango etario. Se halló diferencia estadísticamente significativa entre la seroprevalencia de ambos grupos ( $Z= 8,04$  [-0,662; -0,366]  $p=0,0001$ ). Siendo más alta en el grupo con nexo epidemiológico en todos los rangos etarios (Fig. N° 5).



**Fig. N° 5:** Porcentaje de seroprevalencia del grupo control en comparación con el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*, en función del rango etario.

En la Fig. N° 6 se observa la seroprevalencia del grupo control vs el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*, en función de los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados. Se encontró diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos detectados entre el grupo control y el grupo con nexo epidemiológico ( $Z=6,21[-0.248;-0.032]$   $p=0,0001$ ).



**Fig. N° 6:** Porcentaje de seroprevalencia del grupo control en comparación con el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*, en función de los títulos de anticuerpos anti *Chlamydia*.

### Estudio serológico del grupo de cuidadores de reptiles en cautiverio

Los resultados obtenidos de las muestras de sueros de los cuidadores y sus características se muestran en la tabla N° 11.

**Tabla N° 11:** Características de los cuidadores de un centro recreativo de la provincia de Córdoba y resultados del estudio serológico anti-IgM y anti-IgG para *C. pneumoniae*.

Cuidador	Protección Laboral	Mayo		Diciembre		Contacto con animales
		Títulos Anticuerpos		Títulos Anticuerpos		
		IgM	IgG	IgM	IgG	
1	SÍ	-	-	-	-	Diario
2	NO	-	2048	-	4096	Diario
3	NO	-	2048	-	2048	Diario
4	NO	-	2048	-	1024	Diario
5	NO	-	512	S/D*	S/D*	Esporádico
6	NO	S/D**	S/D**	-	4096	Diario

- Negativo.

\* No determinado, renunció al centro recreativo.

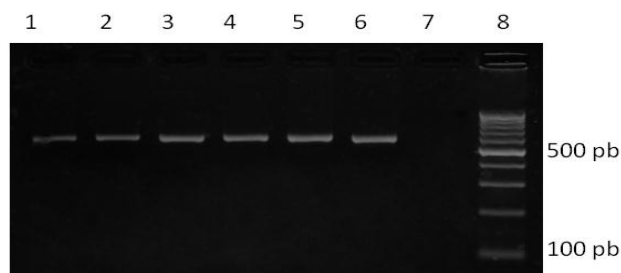
\*\* No determinado, se incorporó al centro recreativo.

No se detectó IgM en el personal analizado y en los cuidadores que no usaban protección laboral. Se detectaron títulos de anticuerpos tipo IgG de 512 a 4096. Los mayores títulos de anticuerpos se encontraron en los cuidadores que presentaban contacto diario con los animales y/o sus excretas. El cuidador que utilizaba protección laboral no presentó títulos de IgG específicos.

#### 4.2.1 Implementación de técnicas de amplificación genómica para la detección de *Chlamydia* y la determinación de la especie presente

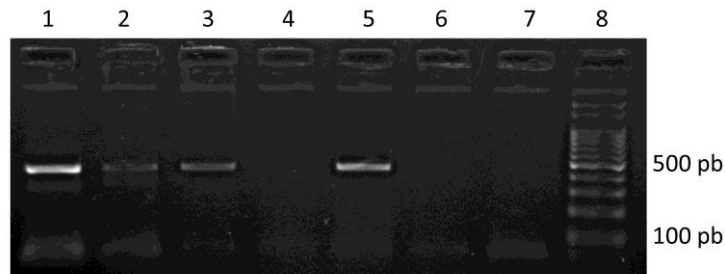
En la primera etapa de este estudio y con motivo de evaluar las diferentes técnicas de amplificación genómica, se realizaron ensayos con controles positivos comerciales obtenidos de cepas almacenadas en el Laboratorio de *Chlamydia* y muestras humanas positivas para *Chlamydia*.

En la Fig. N° 7 se observa una fotografía del gel de agarosa donde se revelan como bandas los fragmentos amplificados obtenidos por PCR genérica. Las líneas 1 a 6 se corresponden a los controles de *C. pecorum* 2047, *C. psittaci* VS225, *C. muridarum* MoPn<sup>T</sup>, *C. trachomatis* L2/434/Bu, *C. pneumoniae* AR 39 y *C. trachomatis* genotipo L1 (respectivamente). En la línea 7 (control negativo) no se observa amplificación. La línea 8 se corresponde al marcador de peso molecular (100 pb).



**Fig. N° 7:** Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR genérica del gen *ompA* de *Chlamydia*. En la línea 1 a 6 se visualizan las bandas de 576 pb correspondientes a cepas controles de *Chlamydia*. Línea 7: control negativo (H<sub>2</sub>O). Línea 8: marcador de peso molecular (100 pb).

El límite de detección de la PCR genérica optimizada en nuestro laboratorio fue de 10 UFI (Fig. N° 8).



**Fig. N° 8:** Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR genérica del gen *ompA* de *Chlamydia*. En la línea 1 a 3 se visualizan las bandas de 576 pb correspondientes a 1000, 100 y 10 UFI de *C. muridarum* cepa MoPn<sup>T</sup>. En la línea 4 se encuentra el producto correspondiente a 1 UFI donde no se observa amplificación. En la línea 5 control positivo correspondiente a *C. trachomatis* cepa L2/434/Bu. Línea 6 libre y en la línea 7 se encuentra el control negativo (H<sub>2</sub>O) no se observa amplificación. Línea 8 el marcador de peso molecular (100 pb).

Los resultados obtenidos de la amplificación genómica de las cepas utilizadas como controles de reacción se enviaron a secuenciar para corroborar la especie presente. Luego de la implementación y optimización de estas metodologías de amplificación genómica se prosiguió con el estudio epidemiológico.

#### **4.2.2 Detección y secuenciación de las especies de *Chlamydia* en pacientes con sospecha de psitacosis de la provincia de Córdoba**

Del total de muestras de hisopados faríngeos analizadas (n=76), el **53,9 %** (n=41) resultaron positivas por PCR genérica. El 56,1 % (n=23) fueron muestras de mujeres y el 43,9 % (n=18) de origen masculino.

### Detección de *C. psittaci* en individuos con sospecha de psitacosis de la provincia de Córdoba

De las 41 muestras positivas por PCR genérica, el **24,4 %** (n=10) resultaron positivas para *C. psittaci*.

En la tabla N°12 se detalla las características de los casos humanos positivos para *C. psittaci*.

**Tabla N° 12:** Características de los casos positivos para *C. psittaci*.

Muestra	Sexo	Contacto con aves	Diagnóstico clínico	Cuidados	Ocupación	Residencia	Genotipo	Código GenBank
Arg Hum 14	F	NO	NA	UTI	Ama de casa	Rural	WC	JQ308278
Arg Hum 30*	M	P	NA	A	Estudiante	Urbano	WC	JQ308279
Arg Hum 31*	F	P	ETI	UTI	Jubilado	Urbano	WC	JQ308280
Arg Hum 32*	F	P	NA	A	Ama de casa	Urbano	E/B	JQ308281
Arg Hum 39*+	M	P	NA	UTI	Empleado construcción	Rural	-	-
Arg Hum 40*+	F	P	NA	UTI	Médica	Urbano	-	-
Arg Hum 45+	M	P	ETI	UTI	Desempleado	Urbano	WC	JQ308282
Arg Hum 49+	F	PP	ETI	A	Vendedor	Urbano	A	JQ308283
Arg Hum 57	M	PC	NA	UTI	Abogado	Urbano	WC	JQ308284
Arg Hum 61	F	PG	NA	A	Trabajador rural	Rural	WC	JQ308285

NA = Neumonía Atípica; ETI = Enfermedad Tipo Influenza.

UTI= Unidad de Terapia Intensiva. A=Ambulatorio.

P: Psittaciformes. PP: Psittaciformes/Passeriformes. PC: Passeriformes/Columbiformes.

PG: Psittaciformes/Galliformes.

\*Coinfección con *C. pecorum*.

+ Coinfección con *C. pneumoniae*.

Se detectó *C. psittaci* en individuos de ambos sexos. La edad media de los pacientes infectados fue de 48 años (r = 21-73 años). El 50 % (n=5) de los infectados fueron trabajadores de 22 a 46 años.

No se encontró asociación significativa entre la edad, el género o el lugar de residencia y la detección de *C. psittaci*.

En ocho muestras positivas para *C. psittaci* se realizó el análisis de las secuencias, demostrando la presencia de genotipos A (n=1), E / B (n=1), y WC (n=6); los dos primeros derivados de genotipos aviáres y el último de mamíferos (Fig. N° 9).

El 90,0 % de los pacientes informó contacto con aves, especialmente con Psittaciformes 60,0 %, Passeriformes 20,0 %, Galliformes 10,0 % y Columbiformes 10,0 %.

*C. psittaci* fue detectada en todos los rangos etarios analizados y el genotipo más prevalente (WC) se detectó a partir de los 21 años. Los genotipos A y E/B se detectaron en el rango etario comprendido entre los 41 a 60 años.

El genotipo no se asoció significativamente con la edad, el género y el tipo de ave de contacto.

El análisis de los registros médicos mostró que la neumonía atípica fue la presentación clínica más frecuente (60,0 %, n=6), seguido de enfermedad tipo influenza (30,0 %, n=3) y síndrome febril (10,0 %; n=1). El 22,0 % de los pacientes presentó leucopenia, mientras que los restantes tenían un recuento normal de glóbulos blancos.

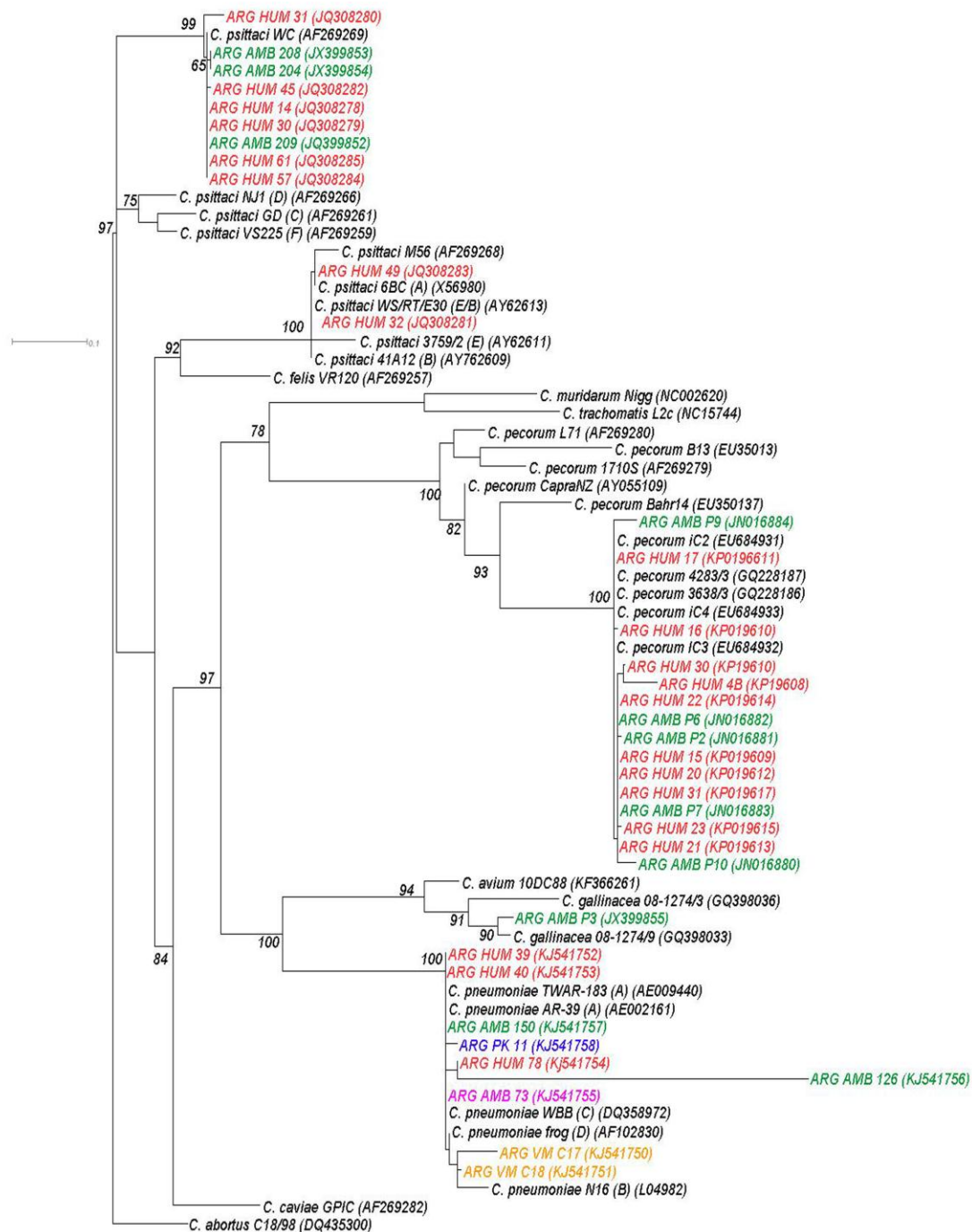
De los 10 pacientes positivos para *C. psittaci*, el 30,0 % (n=3) de los ellos presentó una infección mixta con *C. pecorum* y el 30,0 % (n=3) presentó coinfección con *C. pneumoniae*. En dos pacientes se detectó infección mixta con *C. pecorum* y *C. pneumoniae*.

Seis de los 10 pacientes positivos debieron ser hospitalizados y 3 de ellos, infectados con el genotipo WC, requirieron cuidados intensivos. El paciente infectado con genotipo E/B también requirió de cuidados intensivos, mientras que el que presentó genotipo A recibió tratamiento ambulatorio.

Todos los pacientes recibieron tratamiento antimicrobiano y antimicótico empírico, sin embargo cuando se confirmó el diagnóstico, se retiraron los demás tratamientos, sólo continuaron recibiendo el específico (Macrólidos o Tetraciclinas) y evolucionaron favorablemente.

Este estudio fue publicado: Frutos et al, 2012, Genotyping of *C. psittaci* in central area of Argentina, *Diagn Microbiol Infect Dis* 74(3): 320-322 (VER ANEXO VI) y las secuencias reportadas en este estudio fueron depositadas en la base de datos GenBank con los siguientes números de accesos JQ308278-JQ308285.





**Fig. N°9:** Dendrograma obtenido de un fragmento de 255 nt del dominio variable IV del gen *ompA* de *Chlamydia*, construido por Máxima Verosimilitud utilizando TIM2+I+G como modelo de sustitución de nucleótidos con parámetros sugeridos por ModelTest 3.7 (software PhyML). Las secuencias que pertenecen a este estudio son denominan ARG. En color rojo se indican las secuencias detectadas en humanos, en color verde se indican las secuencias detectadas en aves, en azul secuencias de reptiles, rosado secuencias de mamíferos no humanos y en amarillo las secuencias correspondientes a equinos. En paréntesis se indica el genotipo al cual corresponden las cepas patrones y códigos de acceso al banco de genes. La secuencia de *C. abortus* C18/98 se incluyó como grupo externo. Son indicados los valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) mayores a 50, en los nodos de las ramas.

### Detección de *C. pneumoniae* en pacientes con sospecha de psitacosis de la provincia de Córdoba

Mediante la técnica de nested-PCR para el gen *rpoB*, se identificó en el **46,3 %** (19/41) de los casos analizados la especie *C. pneumoniae*.

En la tabla N°13 se detalla las características de los casos positivos para *C. pneumoniae* de la provincia de Córdoba.

**Tabla N° 13:** Características de los casos positivos para *C. pneumoniae*.

Muestra	Sexo	Contacto con aves	Diagnóstico clínico	Cuidados	Ocupación	Residencia	Código GenBank
Arg Hum 2	M	G	NA	UTI	Trabajador avícola	Rural	-
Arg Hum 4*	M	PP	NA	A	Carpintero	Urbano	-
Arg Hum 12	F	PS	ETI	UTI	Ama de casa	Urbano	KC292040
Arg Hum 15*	F	PP	AA	A	Estudiante	Urbano	-
Arg Hum 18	F	NO	NA	A	Ama de casa	Urbano	-
Arg Hum 22*	F	P	NA	A	Ama de casa	Urbano	-
Arg Hum 23*	M	PS	NA	A	Empleado construcción	Urbano	-
Arg Hum 36	F	PP	NA	UTI	Ama de casa	Urbano	KC292041
Arg Hum 38	F	NO	NA	A	Estudiante	-	-
Arg Hum 39*+	M	P	NA	UTI	Empleado construcción	Rural	KC292042
Arg Hum 40*+	F	P	NA	UTI	Médica	Urbano	KC292043
Arg Hum 43	F	P	NA	UTI	Ama de casa	Rural	KC292044
Arg Hum 44	F	P	NA	UTI	Empleada	Urbano	-
Arg Hum 45+	M	P	ETI	UTI	Desempleado	Urbano	-
Arg Hum 49+	F	PP	ETI	A	Vendedor	Urbano	KC292045
Arg Hum 68	F	P	NT	A	Estudiante	Urbano	-
Arg Hum 78	F	P	NA	UTI	Ama de casa	Urbano	KC292046
Arg Hum 86	M	PP	NT	A	Veterinario	Rural	-
Arg Hum 90	M	PS	ETI	A	Estudiante	Rural	-

NA= Neumonía Atípica. NT= Neumonía Típica. ETI = Enfermedad Tipo Influenza.  
AA= Asintomático.

UTI= Unidad de Terapia Intensiva. A= Ambulatorio.

G: Galliformes. PP: Psittaciformes/ Passeriformes. PS: Passeriformes. P: Psittaciformes.

\*Coinfección con *C. pecorum*. + Coinfección con *C. psittaci*.

De los 19 pacientes positivos para *C. pneumoniae*, el 63,1 % (n=12) fueron mujeres. *C. pneumoniae* fue detectada en todos los rangos etarios analizados, sin embargo el mayor porcentaje de detección fue en el rango etario de adultos mayores. La edad media de los pacientes infectados fue de 47 años (r=8-63 años), el 63,1 % (n=12) fueron trabajadores de 41 a 60 años.

El análisis de los registros médicos mostró que la neumonía atípica fue la presentación clínica más frecuente (73,7 %, n=14), seguido de enfermedad tipo Influenza (15,8 %, n=3) y neumonía típica (5,3 %; n= 1).

El recuento de glóbulos blancos fue normal en el 73,7 % de los pacientes, y el resto de ellos presentó leucocitosis. El 31,6 % (n=6) de los pacientes positivos para *C. pneumoniae* requirió cuidados intensivos.

Los pacientes recibieron tratamiento rutinario antimicótico y antimicrobiano, sin embargo con el diagnóstico confirmatorio, se interrumpió los tratamientos inespecíficos; se continuó sólo con el tratamiento de Macrólidos y evolucionaron favorablemente.

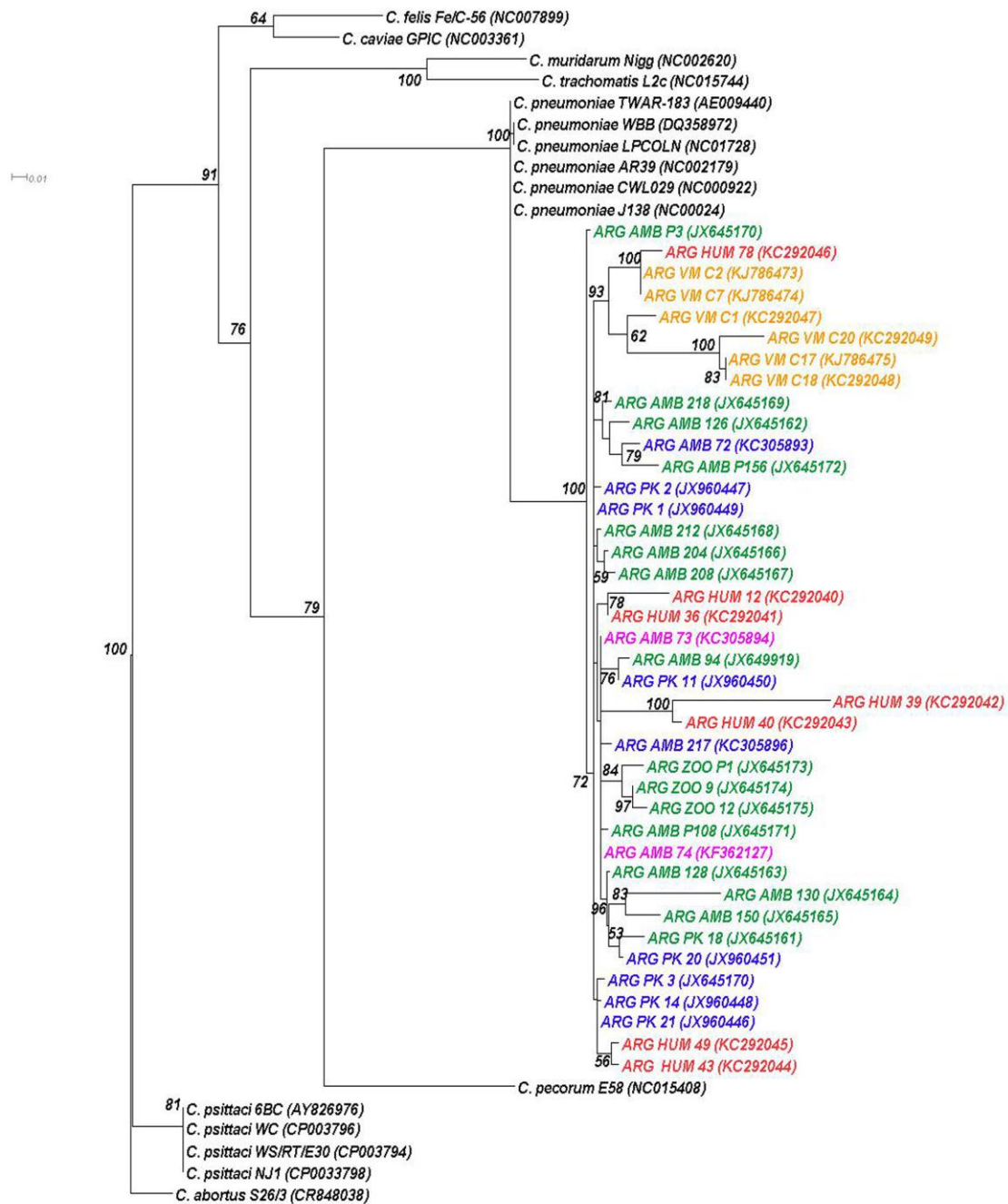
El ochenta y nueve por ciento de los pacientes informó contacto con aves, especialmente con Psittaciformes (42,1 %), solo con Passeriformes el 15,8 % y con ambas Psittaciformes y Passeriformes el 26,3 %; mientras que con Galliformes el 5,3 %. El 10,5 % de las personas analizadas no reportó contacto con aves.

El 63,2 % (n=12) de pacientes positivos para *C. pneumoniae* tenían lugar de residencia urbana. De los 19 pacientes positivos para *C. pneumoniae*, el 21,0 % (n=4) presentó una infección mixta con *C. pecorum* y el 10,5 % (n=2) presentó coinfección con *C. psittaci*.

Los resultados obtenidos a partir del dendograma muestran que las secuencias locales agruparon estrechamente entre sí y asociaron a secuencias de *C. pneumoniae* de origen humana y animal (Fig. N° 12).

El análisis nucleotídico de las secuencias de este gen (*rpoβ*) nos permitió detectar una deleción en la posición 402-433 (CCGTACGAAATA) y un cambio nucleotídico en la posición 435-440 (AAAGG por TGTGAA) que resultó en un cambio aminoacídico.

Las secuencias reportadas en este estudio han sido depositadas en la base de datos Gen Bank con los siguientes números de accesos KC292040-KC292046.



**Fig. N°10:** Dendrograma obtenido del análisis de un fragmento de 441 nt del gen *rpoB* de *Chlamydia*, construido por Máxima Verosimilitud utilizando GTR+G como modelo de sustitución de nucleótidos con los parámetros sugeridos por ModelTest 3.7 (software PhyML). Las secuencias que pertenecen a este estudio son denominan ARG. En color rojo se indican las secuencias detectadas en humanos, en color verde se indican las secuencias detectadas en aves, azul secuencias correspondientes a reptiles, rosado secuencias de mamíferos no humanos y en amarillo secuencias correspondientes a equinos. En paréntesis se indica el código de acceso al banco de genes. La secuencia de *C. abortus* S26/3 se incluyó como grupo externo. Son indicados los valores de *bootstrap* (2.000 pseudorélicas) mayores a 50, en los nodos de las ramas.

### Detección de *C. pecorum* en pacientes con sospecha de psitacosis de la provincia de Córdoba

De las 41 muestras que resultaron positivas por PCR genérica, en el **29,3 %** (n=12) resultaron positivos para *C. pecorum*.

En la tabla N° 14 se detalla las características de los casos positivos para *C. pecorum*.

**Tabla N° 14:** Características de los casos positivos para *C. pecorum*.

Muestra	Sexo	Contacto con aves	Diagnóstico clínico	Cuidados	Ocupación	Residencia	Código GenBank
Arg Hum 4*	M	PP	NA	A	Carpintero	Urbano	KP019608
Arg Hum 15*	F	PP	AA	A	Estudiante	Urbano	KP019609
Arg Hum 16	M	PS	NA	A	Guardia Cárcel	Rural	KP019610
Arg Hum 17	M	PS	NA	A	Empleado	Rural	KP019611
Arg Hum 21	M	PS	NA	A	Estudiante	Rural	KP019612
Arg Hum 22*	F	P	NA	A	Ama de casa	Urbano	KP019613
Arg Hum 23*	M	PS	NA	A	Constructor	Urbano	KP019614
Arg Hum 30+	M	P	NA	A	Estudiante	Urbano	KP019615
Arg Hum 31+	F	PP	NA	UTI	Jubilada	Urbano	KP019616
Arg Hum 32+	F	P	ETI	A	Ama de casa	Urbano	---
Arg Hum 39*+	M	P	NA	UTI	Empleado construcción	Rural	---
Arg Hum 40*+	F	P	NA	UTI	Médica	Urbano	---

NA = Neumonía Atípica. ETI = Enfermedad Tipo Influenza. AA= Asintomático. A=Ambulatorio.

G: Galliformes. PP: Psittaciformes/ Passeriformes. PS: Passeriformes. P: Psittaciformes.

\*Coinfección con *C. pneumoniae*. + Coinfección con *C. psittaci*.

De los 12 pacientes positivos para *C. pecorum*, el 58,3 % (n=7) fueron hombres. La edad media de los pacientes infectados fue de 37 años (rango etario = 10-73 años), el 41,7 % (n=5) fueron trabajadores adultos de 41 a 60 años.

El análisis de los registros médicos mostró que la neumonía atípica fue la presentación clínica más frecuente (83,3 %, n=10), seguido de enfermedad tipo influenza (8,3 %, n=1).

El recuento de glóbulos blancos fue normal en 83,4 % de los pacientes, y en el 16,6 % de ellos presentaron leucocitosis. Todos los pacientes continuaron con el tratamiento específico para la infección por *Chlamydia* y evolucionaron favorablemente.

El 100,0 % de los pacientes informó contacto con aves, especialmente con Psittaciformes 41,7 %, Passeriformes 33,3 %, Psittaciformes y Passeriformes 25,0 %.

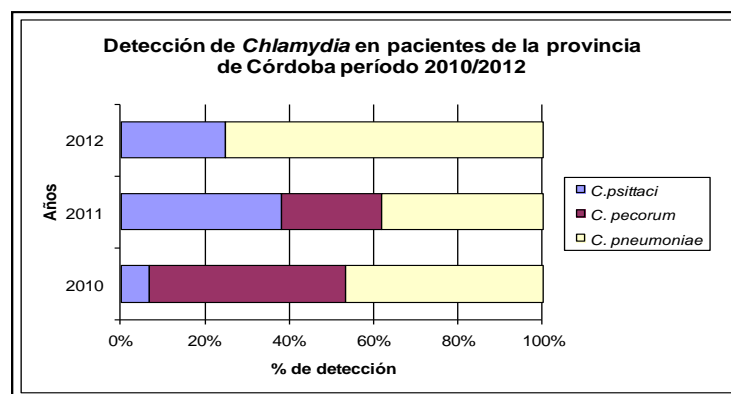
Con respecto a la procedencia, el 66,7 % (n=8) de los pacientes positivos para *C. pecorum* tenían lugar de residencia urbana.

De los 12 pacientes positivos para *C. pecorum*, el 33,3 % (n=4) presentó una infección mixta con *C. pneumoniae* y el 25,0 % (n=3) presentó una infección mixta con *C. psittaci*.

Los resultados obtenidos a partir del dendograma muestran que las secuencias de Córdoba agruparon estrechamente entre sí y se encontraron asociados a secuencias de *C. pecorum* 3638/3, *C. pecorum* 4283/3 y *C. pecorum* iC2 aisladas de pequeños rumiantes (cabras) en Francia (Yousef Mohamad, 2010) (Fig. N° 9).

### Distribución de las especies de *Chlamydia* detectadas en pacientes con nexo epidemiológico para *C. psittaci*, período 2010-2012

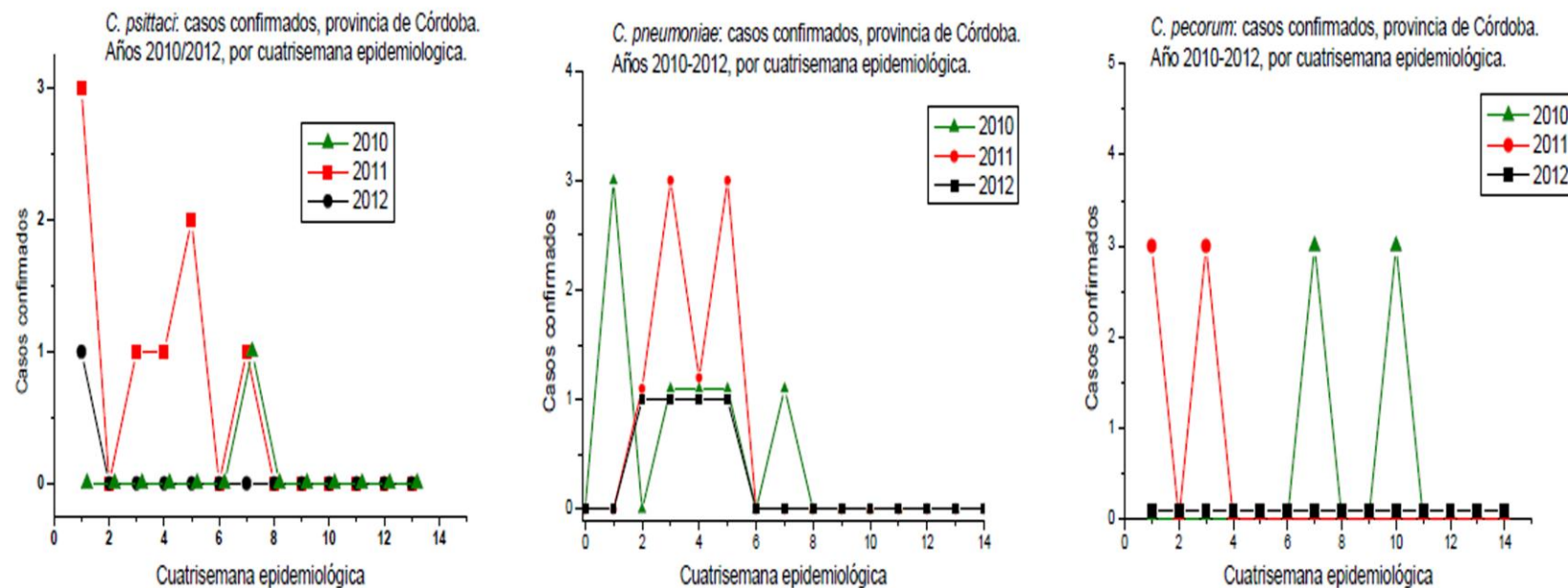
En la figura N° 11 se muestra la distribución de las especies de *Chlamydia* en los tres años estudiados. *C. pneumoniae* fue la más frecuente en los años analizados, mientras que *C. pecorum* sólo se detectó en los 2 primeros años de estudio.



**Fig. N° 11:** Distribución de las especies de *Chlamydia* detectadas en pacientes con nexo epidemiológico para *C. psittaci*, período 2010-2012.

Los casos de *C. psittaci* y *C. pneumoniae* fueron detectados en las primeras 8 semanas epidemiológicas, que se corresponde con la primera mitad del año, en los tres años analizados. Mientras que *C. pecorum* fue detectada de manera esporádica en la semana 1, 3, 5 y semana 10 en los años 2010-2011 y no fue detectado en el año 2012. En la figura N° 12 se detalla la distribución de los casos de *Chlamydia* detectados en el período 2010/2012 en función de las cuatrisesemanas epidemiológicas.





**Fig. N° 12:** Detección de las especies de *Chlamydia* estudiadas en el período 2010/2012 en función de las semanas epidemiológicas en la provincia de Córdoba.

#### 4.2.3 Detección y caracterización genética de las especies de *Chlamydia* en animales.

##### Estudios en aves.

En la tabla N° 15 se detalla las especies de *Chlamydia* detectadas, la clasificación taxonómica de las aves en las cuales se detectó *Chlamydia* y el sitio de procedencia de las mismas.

Se confirmó la presencia de ADN de *Chlamydia* en el **17,4 %** (n=50) de las aves en cautiverio analizadas, mientras que en aves silvestres no se detectó dicha bacteria.

En el **48,0 %** (n = 24) de las aves se detectó *C. pneumoniae*, seguido por *C. pecorum* en el **22,0 %** (n = 11) y *C. psittaci* en el **6,0 %** (n = 3) (Tabla N° 15).

*C. pneumoniae* se detectó en muestras de aves: 4 Passeriformes, 8 Psittaciformes, 5 Rheiformes, 2 Falconiformes, 2 Piciformes y 1 de Strigiformes, 1 Anseriformes y 1 Galliformes. *C. pecorum* se detectó en muestras de 5 aves Passeriformes, 5 Psittaciformes y 1 Rheiformes. Mientras que *C. psittaci* sólo se detectó en 3 muestras de aves Passeriformes. El **22,0 %** (n=11) de las aves en cautiverio presentó infección mixta por *C. pneumoniae* y *C. pecorum*, la cual se detectó en 7 aves Passeriformes, 2 Psittaciformes y 2 Rheiformes.

En aves cautivas de parques zoológicos se detectó *C. pneumoniae* en el 69,2 % (n=18) y *C. pecorum* en el 23,1 % (n=6). Asimismo, se detectó la presencia de infecciones mixtas por estas especies de *Chlamydia* en el 7,7 % (n=2).

En aves de tenencia ilegal incautadas de domicilios particulares se detectó *C. pneumoniae* en el 25,0 % (n=6), *C. pecorum* en el 20,8 % (n=5), *C. psittaci* en el 12,5 % (n=3) e infecciones mixtas por *C. pneumoniae/C. pecorum* en el 37,5 % (n=9).

Se halló *Chlamydia* en la familia Turdidae en el 8,3 % (n=2), Emberizidae en el 7,7 % (n=17) y Thraupidae en el 6,7 % (n=1). En aves Psittaciformes, detectamos *Chlamydia* en la familia Psittacidae en el 19,7 % (n=15).

Además, se detectó en el 28,6 % (n=2) en la familia Falconidae correspondiente al orden Falconiformes, en el 88,9 % (n=8) de las muestras de aves de la familia Rheidae, orden Rheiformes y en el 1,2 % (n=1) de las aves Phasianidae, orden Galliformes. El orden Piciformes, familia Ramphastidae, se halló en el 22,2 % (n=2) de las aves analizadas.

Sólo el 4,2 % (n=1) resultó negativa por nested-PCR específica para las especies estudiadas, para su identificación se implementó una nueva nested-PCR para la determinación de un fragmento de 420 pb correspondiente a los dominios variables II, III y IV del gen *ompA* de *Chlamydia*. La secuencia obtenida reveló la presencia de una nueva especie de *Chlamydia* denominada *C. gallinacea* y el análisis del dendograma mostró un alto grado de similitud con secuencias de *C. gallinacea* detectadas en aves de corral, involucradas en un brote de psitacosis en Francia (GQ398033 - GQ398036).

**Tabla N° 15:** Ocurrencia de detección de *Chlamydia* en 288 aves cautivas [de domicilios particulares (n = 212) y de parques zoológicos (n = 76)].

Habitat	Clasificación de la fauna aviar			Especie de <i>Chlamydia</i> (n)					TOTAL
	Orden	Familia	Genero	<i>C. ps.</i> <sup>1</sup>	<i>C. pn.</i> <sup>2</sup>	<i>C. pec.</i> <sup>3</sup>	<i>C. gall.</i> <sup>4</sup>	<i>C.pn/Cpec</i> <sup>5</sup>	
Aves incautadas de domicilios particulares	Anseriformes	Anatidae	<i>Anser</i>	0	1	0	0	0	1
	Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus</i>	0	1	0	0	0	1
	Passeriformes	Emberizidae	<i>Cyanocompsa</i>	0	1	1	1	3	6
			<i>Gubernatrix</i>	0	0	1	0	0	1
			<i>Diuca</i>	1	0	0	0	0	1
			<i>Paroaria</i>	1	1	1	0	3	6
			<i>Pheucticus</i>	0	1	0	0	0	1
			<i>Sicalis</i>	0	1	1	0	0	2
			<i>Piranga</i>	0	0	0	0	1	1
	Turdidae	Turdidae	<i>Turdus</i>	1	0	1	0	0	2
	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Melopsittacus</i>	0	0	0	0	2	2
TOTAL (n, %)			3 (12,5)	6 (25,0)	5 (20,8)	1 (4,2)	9 (37,5)	24 (11,3)	
Aves en cautiverio de parques zoológicos	Falconiformes	Falconidae	<i>Falco</i>	0	1	0	0	0	1
	Piciformes	Ramphastidae	<i>Polyborus</i>	0	1	0	0	0	1
			<i>Ramphartor</i>	0	2	0	0	0	2
	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Agapornis</i>	0	6	0	0	0	6
			<i>Cyanoliseus</i>	0	1	0	0	0	1
			<i>Nymphicus</i>	0	1	4	0	0	5
			<i>Psittacula</i>	0	0	1	0	0	1
	Rheiformes	Rheidae	<i>Rhea</i>	0	5	1	0	2	8
	Strigiformes	Tytonidae	<i>Tyto</i>	0	1	0	0	0	1
TOTAL (n, %)			0 (0,0)	18 (69,2)	6 (23,1)	0 (0,0)	2 (7,7)	26 (34,2)	

<sup>1</sup>*Chlamydia psittaci*. <sup>2</sup>*Chlamydia pneumoniae*. <sup>3</sup>*Chlamydia pecorum*. <sup>4</sup>*Chlamydia gallinacea*. <sup>5</sup>Infección mixta *Chlamydia pneumoniae/Chlamydia pecorum*.

La mayor diversidad de especies de *Chlamydia* se observó en aves localizadas en domicilios particulares. Cabe destacar que *C. psittaci* y la especie recientemente descrita (*C. gallinacea*) fueron detectadas en aves incautadas de domicilios particulares (Tabla N° 16).

**Tabla N° 16:** Ocurrencia de *Chlamydia* en función al hábitat de las aves analizadas de la provincia de Córdoba.

Hábitat	TOTAL (%; n)	Especie de <i>Chlamydia</i> detectada (n)
Aves incautadas de domicilios particulares	11,3 (24/212)	<i>C. psittaci</i> (3)
		<i>C. pecorum</i> (5)
		<i>C. pneumoniae</i> (6)
		<i>C. gallinacea</i> (1)
		<i>C. pecorum</i> + <i>C. pneumoniae</i> (9)
Aves de parques zoológicos	34,2 (26/76)	<i>C. pecorum</i> (6)
		<i>C. pneumoniae</i> (18)
		<i>C. pecorum</i> + <i>C. pneumoniae</i> (2)
Aves silvestres	0,0 (0/505)	-
<b>TOTAL (%; n)</b>	<b>6,3 (50/793)</b>	-

El dendograma obtenido por comparación con las secuencias patrones de diferentes genotipos de *C. psittaci*, indicó que las secuencias locales se asociaron con cepas de *C. psittaci* genotipo WC, el cual fue previamente detectado en mamíferos (Fig. N° 9).

Las secuencias de *C. psittaci* reportadas en este estudio han sido depositadas en la base de datos Gen Bank con los siguientes números de accesos JX399852-JX399854.

Los resultados obtenidos a partir del dendograma de las secuencias de *C. pecorum*, muestran que las secuencias locales agruparon estrechamente entre sí y se encuentran en la rama con las secuencias de *C. pecorum* 4283/3, *C. pecorum* iC2, *C. pecorum* iC3 y *C. pecorum* iC4, aisladas de pequeños rumiantes (caprinos) en Francia (Fig. N° 9).

Las secuencias de *C. pecorum* reportadas en este estudio han sido depositadas en la base de datos Gen Bank con los siguientes números de accesos JN016880-JN016884.



### Estudios en equinos (*Equus ferus*).

De los 24 hisopados conjuntivales de equinos colectados en la región S de la provincia de Córdoba, el **41,7 %** (n=10) resultaron positivos para *Chlamydia*. Se confirmó la presencia de *C. pneumoniae* en el 100 % (n=10) de las muestras, resultando negativas para *C. psittaci* y *C. pecorum* (Tabla N° 17).

Los seis equinos de la región NE de la provincia resultaron negativos por PCR genérica.

**Tabla N° 17:** Características clínico-epidemiológicas de los equinos analizados de la provincia de Córdoba.

Muestra	Edad (años)	Sexo	Sintomatología	Código de GenBank gen <i>rpoB</i>
ARG VM C1	7	Hembra	Asintomático	KC292047
ARG VM C2	3	Hembra	Asintomático	KJ786473
ARG VM C3	12	Macho	Asintomático	-
ARG VM C5	13	Hembra	Asintomático	-
ARG VM C7	1	Hembra	Asintomático	KJ786474
ARG VM C10	1	Macho	Asintomático	-
ARG VM C17	12	Hembra	Conjuntivitis recurrentes	KJ786475
ARG VM C18	12	Hembra	Asintomático	KC292048
ARG VM C20	1	Hembra	Conjuntivitis recurrentes	KC292049
ARG VM C21	14	Hembra	Asintomático	-

*C. pneumoniae* se detectó en equinos en un amplio rango etario (desde temprana edad hasta adultos) y se encontró principalmente en hembras (8/18).

Dos equinos; positivos para *C. pneumoniae*, presentaron historia clínica de conjuntivitis recurrentes.

Todos los equinos con conjuntivitis recibieron tratamiento antimicrobiano específico y evolucionaron favorablemente.

El dendograma mostró una agrupación de las secuencias locales con la secuencia N16 de *C. pneumoniae* genotipo B detectada en equinos con infección respiratoria en el Reino Unido, (Fig. N° 9). Asimismo, se observó un agrupamiento muy estrecho de todas las secuencias de equinos entre sí y con una secuencia amplificada (ARG HUM 78) a partir de una paciente con neumonía atípica diagnosticada en el presente estudio (Fig. N° 10).

Las secuencias reportadas en este estudio han sido depositadas en la base de datos Gen Bank con los siguientes números de accesos KC292047- KC292049 y de KJ786473- KJ786475.

## **Estudios en reptiles**

### **Reptiles incautados en domicilios particulares**

Se analizaron 5 muestras de hisopado cloacal de reptiles de domicilios particulares incautados por tenencia ilegal, por la Patrulla Ambiental y remitidos al zoológico de Córdoba.

El **80,0 %** (n=4) de las muestras resultó positivo por PCR genérica (muestras de 3 *Pythom molurus bivittatus* y 1 de *Tupinambis merianae*). Mediante la técnica de nested-PCR específica se confirmó la presencia de *C. pneumoniae* en todas las muestras (n=4) analizadas, resultando negativas para las especies *C. psittaci* y *C. pecorum*.

Las secuencias reportadas en este estudio han sido depositadas en la base de datos Gen Bank con los siguientes números de accesos KC305893 y KC305896.

### **Reptiles de un centro recreativo**

Del análisis de las muestras de reptiles que provenían del centro recreativo, en el primer muestreo, se detectó que el **57,9 %** (11/19) resultó positivo por PCR genérica. Mediante la técnica de nested-PCR específica se confirmó la presencia de *C. pneumoniae* en el 100 % de las muestras, resultando negativas para las restantes especies analizadas.



La reptil con neumonía resultó negativa para *Chlamydia* ya que había sido previamente aislada y tratada con antibióticos específicos incluidos en el tratamiento empírico.

Las especies de reptiles en las cuales se detectó *C. pneumoniae* fueron *Python reticulata* (n=2), *Python molurus bivittatus* (n=2), *Bothrops alternatus* (n=1), *Crotalus atrox* (n=1), *Trachemis scripta elegans* (n=2); *Phrynops hylaris* (n=2); *Micrurus pirracryptus* (n=1).

Los animales en los que se detectó *C. pneumoniae* recibieron tratamiento con antibióticos específicos.

En diciembre del mismo año se repitió el muestreo y el análisis arrojó resultados negativos para *Chlamydia* por PCR genérica.

El análisis de las secuencias del gen *rpoB* de *C. pneumoniae* mostró una asociación estrecha entre las secuencias locales y las secuencias patrones de *C. pneumoniae* (Fig. N° 10). Dichas secuencias se entremezclaron con secuencias de otras fuentes de origen y regiones geográficas.

Las secuencias reportadas en este estudio fueron depositadas en la base de datos Gen Bank con los siguientes números de accesos JX960446-JX960451.

Este estudio fue publicado: Frutos et al, 2014, Molecular evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection in reptiles in Argentina. Rev Arg Microbiol. 46(1):45-48 (VER ANEXO VII).

### **Estudio en mamíferos no humanos de la provincia de Córdoba**

El **41,7 %** (5/12) de las muestras resultó positivo para *Chlamydia* y se confirmó la presencia de *C. pneumoniae* en 3 de los individuos analizados y resultó negativo para las especies *C. psittaci* y *C. pecorum*.

Las especies de mamíferos no humanos en las cuales se detectó *C. pneumoniae* fueron *Suricata suricatta* (n=1) y en 2 muestras de *Atelerix albiventris* (n=2). En muestras de dos *Mustela putorius furo*, no fue posible determinar la especie de *Chlamydia* presente ya que las mismas resultaron negativas para las tres especies de *Chlamydia* analizadas y debido a la insuficiente concentración de ADN, no fue posible el análisis por secuenciación.

Los resultados obtenidos a partir del dendograma muestran que la secuencia local agrupó estrechamente con las secuencias de *C. pneumoniae* de otras fuentes de origen descriptas en este estudio (Fig. N° 10).

La secuencia reportada en este estudio ha sido depositada en la base de datos Gen Bank con el siguiente número de acceso KC305894.

### **Determinación de los genotipos de *C. pneumoniae* en pacientes, aves, mamíferos no humanos, reptiles y equinos**

Se realizó el análisis por secuenciación directa del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. pneumoniae*, de 9 muestras seleccionadas por contener óptima cantidad de ADN (3 hisopados faríngeos de humanos, 1 hisopado anal de mamífero, 2 hisopados cloacales de aves, 1 hisopado cloacal de reptil y 2 hisopados conjuntivales de equinos).

Según la clasificación descrita por Bodetti et al, 2002, se describió el genotipo A de *C. pneumoniae* en las muestras de humanos, reptiles, aves, y mamíferos no humanos, de diferentes regiones geográficas de la provincia de Córdoba. Las muestras de equinos se clasificaron en genotipo B (Fig. N° 9).

#### **4.2.4 Cuantificación de ADN bacteriano**

Se implementó una PCR en tiempo real que nos permitió obtener la cantidad de copias de genomas de *Chlamydia* presentes en las muestras analizadas y el consiguiente número de UFI/ml.

El umbral fue fijado en 0,02; el  $Ct \leq 39$  fue considerado positivo y la eficiencia fue calculada utilizando la siguiente fórmula:  $10^{-1/\text{pendiente de la curva}} - 1 = 99\%$ .

La mayor concentración de ADN bacteriano se halló en muestras de más de una especie de *Chlamydia*. En las aves que presentaron coinfección de *C. pneumoniae* y *C. pecorum*, también presentaron mayor excreción de *Chlamydia*.

En la especie *Pheucticus aureoventris* (Passeriformes) de amplia distribución en nuestra provincia, se detectó mayor concentración de ADN de *Chlamydia* ( $Ct=30$ ). En reptiles, en aves de parques zoológicos y en mamíferos no humanos fue menor la excreción de estas bacterias (tabla N° 18).

**Tabla N° 18:** Características de las muestras analizadas por la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN bacteriano.

Muestra analizada*	Hospedador	Especie de <i>Chlamydia</i> detectada	N° UFI/ml
ARG F15	<i>Homo sapiens</i>	<i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	5
ARG F16	<i>Homo sapiens</i>	<i>C. pecorum</i>	5
ARG F30	<i>Homo sapiens</i>	<i>C. psittaci</i> / <i>C. pecorum</i>	5
ARG F40	<i>Homo sapiens</i>	<i>C. psittaci</i> / <i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	85
ARG AMB 2	<i>Cyanocompsa brissonii</i>	<i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	45
ARG AMB 5	<i>Piranga flava</i>	<i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	85
ARG AMB 6	<i>Saltator aurantiirostris</i>	<i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	5
ARG AMB 7	<i>Pheucticus aureoventris</i>	<i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	190
ARG AMB 8	<i>Paroaria coronata</i>	<i>C. pneumoniae</i> / <i>C. pecorum</i>	85
ARG AMB 9	<i>Cyanocompsa brissonii</i>	<i>C. pecorum</i>	5
ARG AMB 10	<i>Saltator aurantiirostris</i>	<i>C. pecorum</i>	5
ARG AMB 18	<i>Gubernatrix cristata</i>	<i>C. pecorum</i>	5
ARG AMB 27	<i>Sicalis luteola</i>	<i>C. pecorum</i>	85
ARG AMB 212	<i>Pheucticus aureoventris</i>	<i>C. pneumoniae</i>	5
ARG ZOO 7	<i>Rhea americana</i>	<i>C. pneumoniae</i>	5
ARG PK 11	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>C. pneumoniae</i>	5
ARG PK 20	<i>Trachemis scripta elegans</i>	<i>C. pneumoniae</i>	5
ARG AMB 73	<i>Atelerix albiventris</i>	<i>C. pneumoniae</i>	5
ARG VM C18	<i>Equus ferus</i>	<i>C. pneumoniae</i>	5

\* En color rojo se indican las muestras de humanos, en color verde se indican las aves, en azul muestras de reptiles, en rosado mamíferos no humanos y en amarillo equinos.

## DISCUSIÓN

### Estudios de seroprevalencia

En la primera parte de nuestro estudio, analizamos la prevalencia de anticuerpos anti LPS para *Chlamydia* en individuos de población sana (grupo control) de la provincia de Córdoba, Argentina y la comparamos con la prevalencia detectada en personas con nexo epidemiológico para *C. psittaci*. Para tal fin implementamos la técnica de neutralización en monocapa de células LLCMK2 bajo medio líquido y optimizamos la coloración de revelado. Esta técnica nos permitió determinar la prevalencia de anticuerpos con actividad neutralizante para *Chlamydia* en ambos grupos en estudio.

Si bien el CDC recomienda para el diagnóstico humano la técnica de MIF (Dowell et al, 2001), se han reportado discrepancias en los resultados obtenidos por esta técnica en términos de sensibilidad y especificidad (Freidank et al, 1997; Kern et al, 1993; Wong et al, 1999) entre los criterios utilizados en su implementación (Kumar y Hammerschlag, 2007; Peeling et al, 2000; Tuuminen et al, 2000). Debido a esta heterogeneidad y a la imposibilidad de detectar anticuerpos neutralizantes es que para nuestro análisis utilizamos la técnica de neutralización dirigida al género *Chlamydia*.

El análisis de los resultados muestra una baja prevalencia de anticuerpos anti LPS para *Chlamydia* en el grupo control, lo cual revela que un alto porcentaje de la población en estudio carece de inmunidad protectora. Esta característica podría ser la causa de las reinfecciones bacterianas que un individuo sufre en el transcurso de su vida.

Existen sólo tres estudios reportados en la literatura que analicen la seroprevalencia de *Chlamydia* por la técnica de neutralización. Donatti et al, 1996 estudió en 230 personas asintomáticas la presencia de anticuerpos para *C. pneumoniae* en Italia por MIF y NT. La seroprevalencia por MIF fue del 53,9 %, mientras que por NT los investigadores encontraron una prevalencia del 25,8 %. Esta discrepancia en los resultados fue también observada por Tapia et al, 2002, que reportó por MIF una seroprevalencia del 96,0 % cuando analizó 331 muestras de sueros de pacientes neurológicos y población sana, sin embargo cuando estos sueros fueron probados por

NT sólo el 8,8 % presentó anticuerpos neutralizantes. Asimismo, Phoon et al, 2011 estudiaron un panel de 78 muestras de sueros de estudiantes universitarios asintomáticos en Singapur, por MIF y NT, reportando una seroprevalencia del 81,0 % y 22,2 %, respectivamente. Estos últimos autores además encontraron que el 6,7 % de los sueros negativos por MIF tenían capacidad neutralizante. Estos hallazgos sugieren que en una población asintomática, la presencia de anticuerpos IgG anti-*C. pneumoniae* por MIF, no implica presencia de inmunidad protectora. Por lo que la detección de anticuerpos neutralizantes sería un marcador útil de inmunidad protectora y se debería considerar como un ensayo “gold standard” (Phoon et al, 2011). Sin embargo, la prueba de neutralización requiere personal y equipamiento especializados y de mayor tiempo para la obtención del resultado, por lo que resulta poco práctica para ser usada rutinariamente. Si bien esta técnica no distingue entre especies de *Chlamydia*, es una herramienta útil para investigaciones epidemiológicas.

En concordancia con lo reportado por otros autores, cuando analizamos el grupo con nexo epidemiológico para *C. psittaci*, observamos una mayor prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-LPS de *Chlamydia* (Cuffini et al, 2006; Kanauchi et al, 2000; Kenina et al, 2011; Monno et al, 2010). Asimismo, esta diferencia significativa en la prevalencia en ambos grupos, también fue observada en los títulos de anticuerpos detectados. Por lo que podríamos inferir que los anticuerpos se encuentran en la fase de crecimiento de la curva serológica y que existe una mayor respuesta inmune en aquellas personas expuestas que cursan un cuadro clínico o quienes han tenido contacto con animales excretores de estas bacterias.

Cuando evaluamos el estado inmune de los cuidadores de reptiles en cautiverio, si bien no detectamos la presencia de IgM indicativa de infección aguda, los títulos de IgG (512-4096) fueron elevados en aquellos cuidadores que tenían contacto esporádico o diario con estos animales. Asimismo, el único cuidador que utilizaba protección laboral al manipular los animales y/o sus excretas, no presentó anticuerpos tipo IgG detectables. Cuando estos sueros fueron analizados por NT, detectamos títulos altos de anticuerpos neutralizantes en los cuidadores a excepción del cuidador que utilizó protección laboral. Resultados similares fueron observados por Raso et al, 2010, quienes analizaron la presencia de anticuerpos tipo IgG anti *C. psittaci* en 364 trabajadores de parques zoológicos y veterinarios y detectaron un 4,7 % de IgG por MIF, en títulos de 16 a 256.

Forsyth et al, 2012; reportaron la presencia de anticuerpos IgG anti-*C. psittaci* por MIF en 6,5 % de trabajadores de parques zoológicos en Nueva Zelanda, en títulos de 160. El porcentaje de detección reportado por estos autores fue menor al observado en nuestro estudio y los títulos de anticuerpos fueron menores a los obtenidos en nuestro trabajo. No obstante, si bien estos estudios sólo reportan la presencia de anticuerpos IgG anti-*C. psittaci*, son indicativos de la elevación de anticuerpos anti-*Chlamydia* frente a la exposición al agente.

La presencia de *C. pneumoniae* en reptiles posee grandes implicancias en salud, ya que la misma es una causa común de neumonía y bronquitis humana a nivel mundial; adicionalmente ha sido recientemente asociada con varias enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades coronarias, Alzheimer y Esclerosis Múltiple (Cuffini et al, 2006; Grayston 2000; Yucesan y Sriram, 2001).

Si bien no se pudo detectar ADN de *Chlamydia*, ni IgM específica en los cuidadores, la detección de ADN en los reptiles demuestra la circulación de *C. pneumoniae* en el centro recreacional y respalda la exacerbada respuesta inmune hallada en los manipuladores de los animales, lo cual sugiere un potencial ciclo zoonótico. La implementación de bioseguridad en los cuidadores es esencial para prevenir la transmisión, como fue demostrado por nuestros resultados (Frutos et al, 2014, ANEXO VII).

### **Detección y caracterización genética de *Chlamydia* en humanos**

En el presente estudio se implementó una técnica de PCR para la detección de un fragmento genómico de la región que codifica a MOMP. Este ensayo fue probado en muestras de hisopados faríngeos de personas con epidemiología compatible con psitacosis. La técnica resultó ser lo suficientemente sensible, capaz de detectar una región común a todo el género *Chlamydia* y pudo ser usada como paso previo a la implementación de la nested-PCR específica. Esta técnica desarrollada previamente por Sachse et al, 2003, amplifica una región parcial del gen *ompA*. Esta región ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la divergencia genética de *Chlamydia* (Batteiger et al, 1996; Longbottom y Coulter, 2003; Geens et al, 2005; Kaulfold et al, 2006; Laroucau et al, 2009; Pantchev et al, 2009). La cual nos permitió discriminar las

especies de *Chlamydia* presentes y detectar además la presencia de infecciones múltiples. El análisis del gen *ompA* posee motivos cepa/serovar/genotipo específicos en los 4 dominios genéticamente variables que posibilita una caracterización genética más detallada (Poole y Lamont, 1992; Longbottom y Coulter, 2003).

Para la detección molecular de *C. pneumoniae* usamos la amplificación del gen *rpoβ* que codifica para la región de la β polimerasa, recomendada por el CDC para el diagnóstico de este agente en humanos (Dowell et al, 2001).

La detección de ácidos nucleicos mediante las metodologías moleculares implementadas permitieron realizar la detección precoz del agente etiológico, mejorando así el manejo clínico del paciente. Asimismo, la técnica de nested-PCR permitió la obtención de material genómico para la caracterización genética de los agentes bacterianos circulantes.

Con estas estrategias de amplificación se examinó la presencia de *Chlamydia* en muestras humanas con sospecha de psitacosis, revelando la inesperada alta ocurrencia de *C. pneumoniae*, seguida de *C. pecorum* y por último *C. psittaci*; lo que demostraría que los estudios de *Chlamydia* en infecciones respiratorias en humanos, no deberían estar sólo confinados a la búsqueda de *C. psittaci*, sino que otras *Chlamydia* deberían ser investigadas.

El análisis de las historias clínicas y fichas epidemiológicas de casos sospechosos de psitacosis, reveló que los pacientes infectados correspondían a adultos jóvenes laboralmente activos. Esto concuerda con lo reportado por otros autores, quienes asocian la infección por *C. psittaci* con la edad laboral y el riesgo ocupacional (Fenga et al, 2007; Gaede et al, 2008; Heddema et al, 2006a; Rodolakis et al, 2010; Sting et al, 2006; Telfer et al, 2005; Varompay et al, 1995; Varompay et al, 2007). Por otra parte, si bien la infección por *C. psittaci* ha sido frecuentemente asociada con el ambiente rural (Gaede et al, 2008; McGuigan et al, 2012; Monsalve et al, 2011; Petrovay y Balla, 2008; Telfer et al, 2005), los pacientes analizados residían principalmente en zona urbana pero mantenían contacto directo con aves, especialmente Psittaciformes, Galliformes y Columbiformes.

Similares resultados fueron observados por diversos autores que han reportado casos de psitacosis asociado a estos órdenes de aves (Branley et al, 2008; Geigenfeind y Haag-Wackernagel, 2010; Grimes y Wyrick, 1991; Haag-Wackernagel y Moch, 2004;

Heddema et al, 2006a; Heddema et al, 2006b; Longbottom y Coulter, 2003; Magnino et al, 2009; Telfer et al, 2005; Van Droogenbroeck et al, 2009; Varompay et al, 1995; Varompay et al, 2007). Sin embargo, un pequeño porcentaje de los pacientes declaró contacto con canarios (Passeriformes), los cuales parecerían presentar un potencial riesgo zoonótico (Dovc et al, 2005; Gartrell et al, 2013; Harkinezhad et al, 2009b; Holzinger-Umlauf et al, 1997; Madani y Peighambari, 2013; Olsen et al, 1998). La presencia de *C. psittaci* en un paciente sin contacto con aves, podría deberse al contacto esporádico con palomas silvestres o con otros animales, ya que existe no existen suficientes evidencias que avalen la transmisión interhumanos de *C. psittaci* (McGuigan et al, 2012).

El análisis de ocho secuencias nucleotídicas de *C. psittaci*, reveló la presencia de 3 genotipos (A, E/B y WC). El genotipo A originalmente aislado en aves del orden Psittaciformes, posteriormente detectado en pacientes hospitalizados con psitacosis que requirieron cuidados intensivos (Harkinezhad et al, 2009b). Este genotipo se ha asociado a una presentación clínica más exacerbada y a una mayor virulencia. Sin embargo, el individuo portador de este genotipo en nuestro estudio, no requirió hospitalización y evolucionó favorablemente con el tratamiento ambulatorio antimicrobiano específico.

La infección en humanos por *C. psittaci* genotipo E/B, se reportó por primera vez en Bélgica, en pacientes que no presentaron síntomas clínicos graves (Varompay et al, 2007). Por el contrario, en nuestro estudio el paciente requirió ser hospitalizado en la unidad de cuidados intensivos. Sorprendentemente, el genotipo WC fue el más prevalente. Este genotipo fue aislado originalmente en un cuadro de enteritis bovina (Everett y Andersen, 1997) y posteriormente en Nepal, detectado en células de la conjuntiva de individuos con tracoma (Dean et al, 2008). Sin embargo no existen reportes previos de detección en cuadros respiratorios. Aunque la mitad de los individuos infectados con este genotipo requirieron cuidados intensivos, todos evolucionaron favorablemente con el tratamiento antimicrobiano específico.

Nuestros resultados indican una alta prevalencia de genotipos obtenidos de mamíferos en Córdoba, sugiriendo que los animales pueden representar una fuente de origen subestimada o que las aves pueden dispersar cepas asociadas a mamíferos, y como consecuencia la clasificación de los genotipos de *C. psittaci* debería ser revisada.



Como se expresó anteriormente, *C. pneumoniae* fue la bacteria más frecuentemente detectada en todas las muestras analizadas, incluyendo las muestras de humanos con sospecha de psitacosis.

*C. pneumoniae* es un agente bacteriano conocido como un importante factor causal de una amplia gama de enfermedades que afectan al tracto respiratorio; se estima que alrededor del 70 % de las infecciones de las vías respiratorias causadas por este agente son asintomáticas. El 20 % de las infecciones del tracto respiratorio superior presentan síntomas y el 10 % restante son casos de neumonía adquirida en la comunidad (Blasi et al, 2000; Choroszy-Król et al, 2014; Cunha, 2006).

A pesar de que inicialmente fue identificada como un patógeno respiratorio agudo, la mayoría de los estudios sobre *C. pneumoniae* se han centrado en el papel de este agente patógeno en infecciones persistentes y crónicas. Además, las neumonías causadas por *C. pneumoniae* pueden ser esporádicas y ocurren generalmente en epidemias (Oktem et al, 2007; Sevketbeyoglu, 2012, Roulis et al, 2013); por lo tanto los reportes de este patógeno en cuadros agudos son muy dispares y su detección dependiente de la técnica de diagnóstico utilizada. En nuestro estudio, *C. pneumoniae* estuvo presente en más del 40 % de las muestras de los individuos analizados durante los tres años. Este resultado es similar a lo reportado en Turquía por Okten et al, 2007 en pacientes con neumonía. Sin embargo, otros autores reportaron frecuencias de detección de *C. pneumoniae* en neumonías agudas que varían de 6,0 al 38,0 % (Almirall et al, 2000; Arnold et al, 2007; Fernández et al, 2003; Hammerschlag, 2000; Lieberman et al, 1996; Luna et al, 2000; Marrie et al, 2003; Miyashita et al, 2002a; Miyashita et al, 2002b; Nomanpour et al, 2012).

Los casos de *C. pneumoniae* detectados en nuestro estudio se presentaron, al igual que *C. psittaci*, en las primeras semanas epidemiológicas de los tres años analizados, sin embargo Porath et al, 1997, se refiere a *C. pneumoniae* como una infección no estacional.

El análisis de las secuencias del gen *rpoB*, reveló que las secuencias locales humanas y animales agruparon juntas formando un solo grupo, exhibiendo una alta clonalidad y conservación genética. Esta alta clonalidad ha sido previamente observado por otros autores (Rattei et al, 2007; Roulis et al, 2013). Asimismo, el análisis del gen *ompA* mostró que el genotipo presente en los pacientes fue el mismo que se detectó en

una amplia gama de animales de nuestro medio, con excepción de los equinos que presentaron otro genotipo, mostrando su potencial zoonótico por la baja divergencia genética de estas cepas entre hospedadores.

Cabe destacar que, en las secuencias locales encontramos un cambio genético característico que podría ser definido como marcador de cepas locales y un posible blanco de estudio para profundizar en la caracterización e identificación de polimorfismos del gen *rpoB* y sus implicancias genéticas.

*C. pneumoniae* se registró más en mujeres que en hombres a diferencia de lo observado por otros autores (Almirall et al, 2007; Cassiere y Niederman, 1998; Marrie et al, 1996; Marrie et al, 2003; Schneeberger et al, 2004), sin embargo la comparación puede no ser clara debido a que el tamaño muestral utilizado en los estudios fue disímil.

En concordancia con otros autores (File et al, 1999; Marrie et al, 2003; Porath et al, 1997; Schneeberger et al, 2004), la presencia de este agente bacteriano fue detectada con mayor frecuencia en adultos mayores.

El mayor porcentaje de los pacientes tenía lugar de residencia urbana, este resultado se encuentra en relación a lo informado por otros autores, quienes asocian la infección con *C. pneumoniae* al contacto con otras personas y a grupos cerrados o al hacinamiento (Blasi et al, 1994; Chirgwin et al, 1991; Conklin et al, 2013; Ekman et al, 1993; Grayston et al, 1986; Lee et al, 2006; Miyashita et al, 2005b; Nakashima et al, 2006; Ngeow et al, 2005; Soda et al, 1997). Sin embargo, los animales en los que se registró la presencia de esta bacteria fueron mantenidos en cautiverio en domicilios particulares, por lo que podrían ser la posible fuente de infección.

Un amplio porcentaje de los pacientes de nuestro estudio requirió hospitalización y cuidados intensivos, sin embargo todos los pacientes evolucionaron de manera favorable cuando sólo se indicó el tratamiento antimicrobiano específico. Este porcentaje fue mayor que el detectado para *C. psittaci*, esto puede ser debido a que en las personas en la que se detectó *C. pneumoniae* tenían una edad más avanzada y quizás presentaban complicaciones clínicas asociadas con la edad. No obstante, esta bacteria es notificada más frecuentemente en individuos ambulatorios que en aquellos que requieren ingreso hospitalario (Arancibia y Díaz 2005; Michetti et al, 1995; Miyashita et al, 2005a; Wattanathum et al, 2003).

En nuestra región, la detección de *C. pneumoniae* no se encuentra incluida en el algoritmo diagnóstico de infecciones respiratorias, por lo que el diagnóstico diferencial no es realizado rutinariamente. Así, las técnicas moleculares implementadas en este estudio demostraron ser herramientas útiles para la identificación y caracterización de *C. pneumoniae* y podrían ser transferidas a laboratorios que lo requieran, contribuyendo así al mejoramiento diagnóstico y tratamiento precoz de estas infecciones en nuestro medio.

*C. pecorum* es un patógeno de importancia clínica veterinaria descrito en ganado doméstico y en fauna silvestre (Jelocnik et al, 2013), sin embargo la infección puede ser subclínica y asintomática (Jee et al, 2004; Poudel et al, 2012). Este agente no es investigado en infecciones respiratorias humanas, esto podría ser debido a que no se ha considerado, hasta el momento, su potencial zoonótico. En nuestro estudio encontramos material genético de *C. pecorum* en un importante porcentaje de los individuos con clínica y epidemiología compatible con psitacosis. Este agente fue hallado los dos primeros años de muestreo, sin embargo en el año 2012 no fue detectado. Esta intermitencia en la detección podría estar asociada a la ocurrencia de brotes esporádicos en animales (Funnell et al, 2013; Jackson et al, 1999; Longbottom, 2004; Warren et al, 2005). El análisis del dendograma mostró que las secuencias locales agruparon estrechamente entre sí y se asociaron con secuencias detectadas en pequeños rumiantes en Europa (Mohamad et al, 2014; Yousef Mohamad et al, 2008). Nuestra provincia posee un extenso porcentaje de su territorio con producción ganadera, por lo que quizás el contacto con el ganado podría ser una fuente de infección. Asimismo, el ganado convive con aves, ya que las mismas se alimentan de insectos que se encuentran sobre el ganado, también comparten bebederos de agua de los animales, por lo que, esta coexistencia podría ser un nicho ecológico adecuado para la transferencia de *C. pecorum* entre ambos hospedadores. En este estudio, *C. pecorum* fue detectada en aves asintomáticas, extendiendo así su rango de hospedadores con potencial excretor de dicha bacteria.

Debido a que estos pacientes ingresaban al Instituto con un diagnóstico presuntivo de psitacosis, es que sólo figura en la ficha epidemiológica, información sobre su residencia urbana por el contacto con aves, principalmente con Psittaciformes.

Cabe destacar que en los casos en los que fue el único agente patógeno presente, los pacientes evolucionaron favorablemente sólo con el tratamiento antimicrobiano específico. El hallazgo de este patógeno asociado a cuadros respiratorios en humanos resalta la necesidad de profundizar la investigación en pacientes con estos cuadros clínicos en especial en aquellos individuos convivientes tanto de aves como animales de granja.

Sorprendentemente, un importante porcentaje presentaba más de una especie de *Chlamydia*. En animales son frecuentes las infecciones mixtas (De Graves et al, 2003; Jee et al, 2004; Reinhold et al, 2008), sin embargo en humanos existen pocos informes que las reporten. Esto es debido a que las diferentes especies de *Chlamydia* se encuentran relacionadas con una patología en particular y por lo tanto no se suele investigar la presencia de otras. Mahmoud et al, 1994 reportó por primera vez la presencia de anticuerpos contra múltiples especies de *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*) en pacientes con tracoma residentes de una región endémica de Sudán. Resultados similares fueron observados por Dean et al, 2008 que reportó estas especies de *Chlamydia* en pacientes con tracoma en Nepal. Asimismo Dean et al, 2013 encontró además la presencia de *C. pecorum* en pacientes con tracoma.

Sin embargo cuando se investigan cuadros respiratorios, se enfatiza en la búsqueda de *C. psittaci* dejando de lado la búsqueda de otras especies de *Chlamydia*. Debido a que aún no se conoce si existe un posible sinergismo entre las especies implicadas en la patogénesis de la enfermedad o si existe una competencia entre las mismas por los receptores celulares, o si la coinfección podría causar una enfermedad de gravedad variable según si estuviera presente solo una o varias especies bacterianas; es que la detección de rutina de todas las especies de *Chlamydia* permitiría dilucidar el papel que las infecciones mixtas pueden desempeñar en la patogenia de la enfermedad y/o en la terapéutica. Asimismo permitiría realizar el control sanitario del hospedador, ya sea ave, reptil o mamífero, para evitar el contacto con la fuente de infección que podría continuar excretando el agente al medio. En este sentido nuestros resultados aportan los primeros datos acerca de la existencia de infecciones mixtas, lo que se debería profundizar con el fin de estudiar su real implicancia en salud pública.

## Estudio en aves

Con las estrategias de amplificación anteriormente descritas examinamos un gran panel de muestras aviares, revelando la presencia de *Chlamydia* en un amplio rango de aves mantenidas cautivas (20 especies de Passeriformes y no Passeriformes). Sin embargo, no se halló estas bacterias en las aves silvestres.

Si bien, tanto las aves silvestres como las aves en cautiverio, sufrieron stress en el momento de su captura y obtención de la muestra, posiblemente la interrupción de la preservación ecológica y ambiental en las aves en cautiverio podría ser la causa de la excreción de *Chlamydia*.

En aves mantenidas en cautiverio en domicilios particulares o de parques zoológicos de nuestra provincia, se detectó una mayor incidencia de *C. pneumoniae*, seguido de *C. pecorum* y *C. psittaci*. Además, se encontró *C. gallinacea* e infecciones mixtas de *C. pneumoniae/C. pecorum*. Estas aves no presentaban signos clínicos de enfermedad por *Chlamydia*, sin embargo, el desarrollo de enfermedad en las aves depende de la virulencia de la cepa de *Chlamydia* involucrada y de la especie de ave infectada. No obstante, las infecciones asintomáticas pueden ocurrir en cepas de baja y alta virulencia, y numerosas cepas pueden permanecer en latencia en las aves hasta que se activan por factores de stress (Rodolakis et al, 2010). Asimismo, la edad puede afectar el desarrollo de enfermedad, ya que por lo general las aves adultas suelen presentar infecciones asintomáticas, mientras que las aves jóvenes suelen cursar la enfermedad de forma aguda (Herrmann et al, 2006).

En nuestro estudio, *C. pneumoniae* fue detectada en un amplio rango de órdenes de aves, principalmente Psittaciformes y Passeriformes. Estas aves son de extensa distribución y abundancia en nuestra provincia (Giraudó et al, 2006), por lo que probablemente la abundancia de estas aves pudo haber influenciado la frecuencia de detección.

En aves del orden Passeriformes, principalmente *Paroaria*, encontramos una alta ocurrencia y diversidad de especies de *Chlamydia*. Es probable que estas aves actúen como reservorio de *Chlamydia* en nuestra región. Sin embargo, la detección de *Chlamydia* en Passeriformes es controvertida. Algunos investigadores no han podido demostrar la presencia de *Chlamydia* en Passeriformes (Chahota et al, 2006; Prukner-

Radovic et al, 2005), mientras que otros autores han reportado frecuencias de detección que van desde 0,8 % hasta el 54,0 % (Celebi y Ak, 2006; Dovic et al, 2005; Hirai et al, 1983; Holzinger-Umlauf et al, 1997; Kaleta y Taday, 2003; Madani y Peighambari, 2013; Olsen et al, 1998).

Aunque muchos autores han demostrado que las aves Columbiformes son portadoras naturales de *C. psittaci* y posiblemente fuente de infección para el humano (Chahota et al, 2006; Fukushi et al, 1983; Haag-Wackernagel y Moch, 2004; Yousef Mohamad y Rodolakis, 2010), en nuestro análisis las muestras de estas aves resultaron negativas para *Chlamydia*.

*C. psittaci* sólo se detectó en aves del orden Passeriformes, familia Emberizidae y Turdidae. La infección por este agente bacteriano no parece estar asociada con signos clínicos de Clamidiosis aviar, indicando que posiblemente estas aves sean portadores subclínicos de *C. psittaci* en nuestro medio. Asimismo, este hallazgo sugiere que las aves no Psittaciformes pueden representar una fuente subestimada de *C. psittaci*.

El genotipo que presentaban estas aves fue WC, el mismo genotipo que presentaron los pacientes con infección por *C. psittaci*, sin embargo en las aves no produjo enfermedad mientras que los pacientes cursaron la infección de manera sintomática, por lo que quizás esta diferencia en la capacidad de desarrollar la enfermedad esté asociada a alguna característica intrínseca del hospedador y no del genotipo infectante.

Estos resultados indican una importante circulación de genotipos obtenidos de mamíferos en nuestra región, lo que sugiere que los mamíferos pueden representar una fuente subestimada de *C. psittaci* o que las aves podrían llevar genotipos asociados a mamíferos.

El hallazgo de *C. pecorum* en aves mantenidas en cautiverio proporciona una prueba más de la circulación de esta especie bacteriana en aves asintomáticas en nuestra región; sin embargo, la importancia epidemiológica de *C. pecorum* aún no ha sido dilucidada. Se necesitan más estudios para estimar el rol zoonótico de este patógeno.

*C. pneumoniae* fue la especie detectada más frecuentemente, lo que refleja su circulación endémica en la avifauna local. Además, el análisis de las secuencias amplificadas mostró una asociación estrecha con secuencias *C. pneumoniae* previamente detectadas en humanos. Aunque *C. pneumoniae* ha sido descrita en varias

especies animales, su implicancia zoonótica sigue siendo enigmática (Bodetti et al, 2002; Mitchell et al, 2010; Myers et al, 2009).

Otro hallazgo destacable fue la primera detección de *C. gallinacea* en aves asintomáticas de orden Passeriformes en nuestra región; esta nueva especie de *Chlamydia* fue recientemente descrita por Sachse et al, 2014 en aves Galliformes.

Además, es importante señalar que nuestro estudio proporciona evidencia de la aparición de infecciones mixtas en aves. Este hecho fue previamente reportado por Tanaka et al, 2005 y Sachse et al, 2012.

La presencia de *Chlamydia* en aves en cautiverio podría representar una potencial fuente de infección para los cuidadores, por lo que sería necesaria la implementación de medidas de bioseguridad para mitigar los efectos de una posible propagación de la infección.

Algunas limitaciones de nuestro estudio deben ser consideradas. El aislamiento en cultivos celulares (CDC, 1998) es la técnica recomendada para confirmar y corroborar los resultados obtenidos; sin embargo, en el caso de *C. psittaci*, no es recomendable debido a los riesgos biológicos. Por otro lado, no pudimos aislar *C. pecorum* y *C. pneumoniae*, debido a la falta de condiciones estériles y refrigeración en el lugar donde se recolectaron las muestras.

En la literatura descrita hasta el momento, los estudios de las infecciones por *Chlamydia* en aves por lo general se han limitado a la búsqueda de *C. psittaci*, por lo que poco se conoce sobre la situación de otros agentes clamidiales. Nuestros resultados indican que el conocimiento de la variedad de *Chlamydia* presente en aves es aún incompleto y que un buen número de especies todavía podrían estar esperando por su detección e identificación.

Como se expresó, las muestras de aves positivas para *Chlamydia* se encontraron principalmente en dos órdenes, Passeriformes y Psittaciformes; por lo tanto, estas aves deberían ser consideradas a fin de evaluar su importancia epidemiológica.

Nuestros resultados fueron el primer aporte a la identificación y caracterización molecular de *Chlamydia* en aves de Argentina, y contribuyó a mejorar nuestra comprensión de la abundancia de *Chlamydia* en el reino animal.

## Estudio en equinos

Además de las infecciones en los seres humanos, las infecciones por *C. pneumoniae* han sido reportadas en una amplia variedad de animales e igualmente en una diversa gama de tejidos del cuerpo, incluyendo mucosas de las vías respiratorias (anfibios, reptiles, marsupiales y equinos) hígado y bazo (anfibios, reptiles), corazón (reptiles y anfibios), conjuntiva y tracto urogenital (marsupiales) (Berger et al, 1999; Bodetti et al, 2002; Hotzel et al, 2001; Kutlin et al, 2007; Mair y Wills,1992; Wills et al, 1990).

Existen pocos y desactualizados reportes de *C. pneumoniae* en equinos; sólo la cepa N16 de *C. pneumoniae* ha sido descrita (Mair y Wills,1992; Wills et al, 1990) y hasta el momento ninguno a nivel local. En este estudio y en consonancia a lo previamente reportado por Mair y Wills 1992, detectamos *C. pneumoniae* en equinos asintomáticos y asociada a conjuntivitis.

Los dos equinos que presentaron cuadros conjuntivales al momento de la obtención de la muestra fueron madre y su cría, por lo que es posible que haya ocurrido el contagio de un animal a otro debido al contacto cercano entre ambos, por encontrarse en el mismo corral. No obstante, debido a que este agente patógeno se encuentra comúnmente presente en humanos, algunos autores postulan la posibilidad de una antropozoonosis (Roulis et al, 2013). Sin embargo, el análisis de las secuencias locales nos mostró asociación con la secuencia N16 de *C. pneumoniae* aislada de equinos y se diferenció de las demás secuencias detectadas en humanos y animales en nuestra región, por lo que quizás este agente se encuentre asociado a epizootias.

Todos los equinos en los que se detectó la infección sólo recibieron tratamiento antimicrobiano específico y evolucionaron favorablemente. Por lo que estas cepas, como todas las especies de *Chlamydia* descritas hasta el momento, son erradicables con la implementación del tratamiento antimicrobiano específico.



## Estudio en reptiles

*C. pneumoniae* fue detectada en varias especies de reptiles tanto del centro recreativo como en aquellas incautadas de domicilios particulares. Estos reptiles no presentaban sintomatología compatible con infecciones por *Chlamydia*, por lo que podrían ser considerados como portadores naturales de este agente.

En nuestro estudio, un reptil presentaba un cuadro de neumonía proliferativa y si bien no detectamos *C. pneumoniae*, probablemente debido a que previo al momento de la obtención de la muestra, este animal se encontraba aislado y había recibido una batería de tratamientos antimicrobianos, entre los cuales se había incluido el específico para *Chlamydia*. Cabe destacar que de igual manera los reptiles en los que se detectó esta bacteria en el muestreo de marzo, luego de recibir el tratamiento antimicrobiano específico resultaron negativos en el muestreo de diciembre. Esto indicaría que *C. pneumoniae* es capaz de infectar a varias especies de reptiles y que causa una infección erradicable con el tratamiento antimicrobiano adecuado.

Estos animales en cautiverio se encontraban mantenidos en condiciones ambientales desfavorables, estas circunstancias puede reprimir el sistema inmunológico y favorecer la invasión de patógenos oportunistas. El hallazgo de altos porcentajes de ocurrencia de *C. pneumoniae* en reptiles fue reportado previamente (Soldati et al, 2004).

El análisis de las secuencias detectadas en los reptiles confirmó que las mismas pertenecían a *C. pneumoniae*, y a pesar que se analizó una cantidad limitada de secuencias, observamos que todas presentaban una alta homología entre ellas, indicando la alta clonalidad de esta especie bacteriana.

Aunque la transmisión entre los humanos ocurre de persona a persona a través de las secreciones respiratorias (Cuffini et al, 2006; Yucesan y Sriram, 2001), hasta que se amplíe el conocimiento sobre la epidemiología, patogenia y vías de transmisión de las cepas de *C. pneumoniae* recuperadas de poblaciones cautivas y silvestres de animales de sangre fría, su potencial zoonótico debe ser considerado. En este sentido considerando el aumento de la tenencia de reptiles como mascotas, es necesario implementar un sistema de vigilancia en la tenencia, cuidados y comercialización de estos nuevos animales de compañía, en cuyo protocolo de control debería ser incluido el estudio de *Chlamydia*; ya que como se demostró en los cuidadores del centro recreativo, la

exposición de manera continua al antígeno produjo una respuesta inmune elevada y sostenida en el tiempo, lo que nos permitiría inferir el potencial zoonótico de esta cepa.

### **Estudios en mamíferos no humanos**

*C. pneumoniae* también se detectó en mamíferos no humanos de la provincia de Córdoba, si bien es limitada la cantidad de muestras analizadas, detectamos la ocurrencia de esta bacteria en animales en los que no había sido previamente descrita. Debido a la ubicuidad de este agente patógeno en los diferentes hospedadores de nuestro medio es que seleccionamos muestras con óptima calidad de ADN y se logró secuenciar el dominio variable IV del gen *ompA* para determinar el genotipo presente. El genotipo más frecuentemente encontrado fue el A al igual que en humanos y en otros animales. Este resultado se encuentra en concordancia con la alta clonalidad observada en el análisis del dendograma del gen *rpoB* en cada hospedador analizado.

Los resultados amplían el conocimiento previo acerca de la abundancia de *Chlamydia* en el reino animal.

### **Cuantificación del ADN bacteriano**

Al cuantificar la carga bacteriana en los individuos y en los animales estudiados, encontramos una baja excreción de *Chlamydia* por parte de los individuos infectados, con excepción del paciente que presentó triple infección clamidial. En aves se observó diferentes niveles de excreción de *Chlamydia*. Las aves del orden Passeriformes (*Piranga*, *Paroaria* y *Sicalis*) mostraron un mayor nivel de excreción mientras que en otras aves del orden Passeriformes y Rheiformes (*Rhea*, *Gubernatrix* y *Pheucticus*) la excreción fue menor. Quizás algunas especies de aves sean más eficientes en la excreción que otras, o se encuentren sometidas a un mayor grado de stress que otras especies del mismo orden. Asimismo se observó en aves una mayor excreción cuando encontramos más de una especie de *Chlamydia* presente. Mientras que en reptiles y en mamíferos no humanos, la misma fue menor en concordancia con la detectada en humanos.

Estos resultados son similares a los encontrados por Branley et al, 2008, quien detectó una baja carga bacteriana (*C. psittaci*) excretada por parte de los humanos y una mayor excreción en aves.

No encontramos una asociación entre el nivel de excreción, la especie de *Chlamydia* involucrada en la infección y el tipo de hospedador. Quizás por el limitado número de muestras analizadas, se dificulta la interpretación de los resultados. Sin embargo, este estudio proporciona datos interesantes que podrán ser profundizados en un futuro.

## CONCLUSIONES

Gracias a la implementación de nuevas técnicas moleculares logramos ampliar el conocimiento de las *Chlamydia* de importancia médico-veterinaria.

Pudimos identificar y caracterizar diversas especies de *Chlamydia* zoonóticas y potencialmente zoonóticas, en muestras de un amplio rango de hospedadores, siendo los primeros registros de estos patógenos en animales de nuestra provincia. Estos resultados avalaron el Decreto de Ley Provincial N° 1751 de Tenencia y Comercialización de Animales promovido por la Secretaría de Ambiente de la provincia de Córdoba.

Se logró identificar en aves en cautiverio, no sólo la tradicionalmente estudiada *Chlamydia psittaci*, sino también *C. pneumoniae* y *C. pecorum*, cuyo rol zoonótico aún no ha sido claramente establecido. Sin embargo el hallazgo de *C. pneumoniae* en muestras clínicas de individuos con cuadros respiratorios agudos y contacto estrecho con aves, sería el primer indicio de la necesidad de ampliar el espectro diagnóstico diferencial y evaluar la incorporación de la detección de otras especies de *Chlamydia* en el algoritmo de infecciones respiratorias en nuestra región.

De la misma forma, la ubicuidad de *C. pneumoniae* en diferentes hospedadores, el hallazgo de este agente en reptiles y el alto título de anticuerpos hallados en sus cuidadores, nos permite inferir su amplio potencial zoonótico y por tanto enfatizar en la necesidad de la implementación de normas de bioseguridad laboral en el personal en contacto con animales. La importancia de la implementación de controles más estrictos de la tenencia y comercialización ilegal de aves y nuevos animales de compañía, tiene como objeto final disminuir su diseminación.

Finalmente el hallazgo de una nueva especie de *Chlamydia*, *C. gallinacea*, en aves de nuestra región abre las puertas a nuevas investigaciones tendientes a dilucidar sus implicancias médico-veterinarias.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

-Desarrollar e impulsar un sistema médico-veterinario de vigilancia epidemiológica para el estudio de estos agentes bacterianos en nuestra provincia, de manera de constituir una red de trabajo dinámica que permita tener un mejor acceso al diagnóstico en humanos y su posible fuente de infección animal y por tanto mejorar el control de las infecciones producidas por *Chlamydia* en nuestro medio.

-Estudiar los casos y/o brotes en humanos y animales de manera conjunta a fin de determinar con mayor exactitud la fuente de infección y el rol zoonótico de *C. pneumoniae* y *C. pecorum*.

-Analizar la importancia epidemiológica de las aves Passeriformes con el fin de evaluar su rol particular en la transmisión de *Chlamydia* en Córdoba.

-Evaluar la participación de otros hospedadores como caprinos y bovinos en la transmisión de *C. pecorum* y otras especies en nuestro medio.

-Analizar el genoma completo de estos agentes patógenos para identificar posibles sitios “hotspots” de recombinación para determinar los patrones de microevolución de dichas especies.

-Estudiar la presencia de otras especies de *Chlamydia* zoonóticas, como *C. abortus* en bovinos y caprinos de nuestra provincia y evaluar su impacto en la población de mujeres embarazadas de Córdoba.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken ID, Clarkson MJ, Linklater K. Enzootic abortion of ewes. *Vet Rec* 1990; 126(6):136-138.
2. Alonso R, Galán JC, Gutiérrez Fernández J, Rodríguez Domínguez M, Salinas J, Sanbonmatsu Gámez S. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por *Chlamydia spp.* y especies relacionadas. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. SEIMC 2012. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Almirall J, Bolívar I, Vidal J, Sauca G, Coll P, Niklason B, Bartolomé B. Epidemiology of community acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Eur Respir J* 2000; 15:757-763.
4. Almirall J, Boixeda R, Bolívar I, Bassa J, Sauca G, Vidal J, Serra-Prat M, Balanzó X. Differences in the etiology of community-acquired pneumonia according to site of care: a population-based study. *Respir Med* 2007; 101(10):2168-2175.
5. Arancibia H F, Díaz P O. Severe community-acquired pneumonia in adults. *Rev Chilena Infectol* 2005; 22(1):46-51.
6. Andersen AA. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J Clin Microbiol* 1991; 29:707-711.
7. Andersen AA. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9:159-164.
8. Anderson IE, Baxter SI, Dunbar S, Rae AG, Philips HL, Clarkson MJ, Herring AJ. Analyses of the genomes of Chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:245-251.
9. Arnold FW, Summersgill JT, Lajoie AS, Peyrani P, Marrie TJ, Rossi P, Blasi F, Fernandez P, File TM Jr, Rello J, Menendez R, Marzoratti L, Luna CM, Ramirez JA; Community-Acquired Pneumonia Organization (CAPO)

- Investigators. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1086-1093.
10. Balin BJ, Gérard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol* 1998; 187: 23-42.
  11. Batteiger BE, Lin PM, Jones RB, Van Der Pol, BJ. Species, serogrup, and serovar-specific epitopes are juxtaposed in variable sequence region 4 of the major outer membrane proteins of some *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect Immun* 1996; 64: 2839-2841.
  12. Beeckman DSA, Vanrompay DCG. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:11-17.
  13. Bennu DAN. Some facts about psittacosis. 2003. Disponible en: <http://research.amnh.org/users/nyneve/psittacosis.html>.
  14. Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P. *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2378-2380.
  15. Blasi F, Cosentini R, Denti F, Allegra L. Two family outbreaks of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J* 1994; 7:102-104.
  16. Blasi F, Cosentini R, Tarsia P. *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis* 2000; 13(2):161-164.
  17. Bodetti T, Jacobson E, Wan C. Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst Appl Microbiol* 2002; 25:146-152.
  18. Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J Infect Dis* 1997; 175(6):1523-1526.

19. Branley JM, Roy B, Dwyer DE, Sorrell TC. Real-time PCR Detection and quantitation of *Chlamydophila psittaci* in human and avian specimens from a veterinary clinic cluster. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(4): 269-273.
20. Bush RM, y Everett KDE. Molecular evolution of Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Micr* 2001; 51:203-220.
21. Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 571-579.
22. Carey AJ, Timms P, Rawlinson G, Brumm J, Nilsson K, Harris JM, Beagley KW. A Multi-Subunit Chlamydial Vaccine Induces Antibody and Cell-Mediated Immunity in Immunized Koalas (*Phascolarctos cinereus*): Comparison of Three Different Adjuvants. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 161-172.
23. Cassiere HA, Niederman MS. Community-acquired pneumonia. *Dis Mon* 1998; 44(11):613-675.
24. Chahota R, Ogawa H, Mitsuhashi Y, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H. Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 663-678.
25. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). *MMWR* 1998; 47:1-15. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr4710.pdf>.
26. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). *MMWR*. 2010. Disponible en: <http://www.nasphv.org/documentsCompendiaPsittacosis.html>.
27. Celebi BS, Ak S. A comparative study of detecting *Chlamydophila psittaci* in pet birds using isolation in embryonated egg and polymerase chain reaction. *Avian Dis* 2006; 50: 489-493.



28. Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Hammerschlag MR, Schachter J. Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. *J Infect Dis* 1991; 163:757-761.
29. Choroszy-Król I, Frej-Mądrzak M, Hober M, Sarowska J, Jama-Kmiecik A. Infections caused by *Chlamydophila pneumoniae*. *Adv Clin Exp Med* 2014; 23(1):123-126.
30. Cochrane M, Walker P, Gibbs H, Timms P. Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiol* 2005; 151:2285-2290.
31. Cockram FA, Jackson AR. Isolation of a *Chlamydia* from cases of keratoconjunctivitis in koalas. *Aust Vet J* 1974; 50:82-83.
32. Conklin L, Adjemian J, Loo J, Mandal S, Davis C, Parks S, Parsons T, McDonough B, Partida J, Thurman K, Diaz MH, Benitez A, Pondo T, Whitney CG, Winchell JM, Kendig N, Van Beneden C. Investigation of a *Chlamydia pneumoniae* outbreak in a Federal correctional facility in Texas. *Clin Infect Dis* 2013; 57(5):639-647.
33. Cuffini C, Guzmán LA, Villegas N, Alonso CE, Martínez Riera L, Rodríguez Fermepín M, Entrocassi A, Adamo MP, Pedranti M, Zapata M. Isolation of *Chlamydophila pneumoniae* from Atheromas of the Carotid Artery and their antibiotics susceptibility profile. *Rev Enf Infecc y Microbiol Clín* 2006; 24:81-85.
34. Cunha BA. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (3):12-24.
35. Dean D, Kandel RP, Adhikari HK, Hessel T. Multiple Chlamydiaceae species in trachoma: implications for disease pathogenesis and control. *PLoS Med* 2008; 5(1):e14. doi: 10.1371/journal.pmed.0050014.
36. Dean D, Rothschild J, Ruettinger A, Prasad Kandel R, Sachse K. Zoonotic Chlamydiaceae Species Associated with Trachoma, Nepal. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(12). doi:10.3201/eid1912.130656.

37. De Graves FJ, Gao D, Hehnen HR, Schlapp T, Kaltenboeck B. 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* 2003; 41(4):1726-1729.
38. Dovc A, Dovc P, Kese D, Vlahovic K, Pavlak M, Zorman-Rojs O. Long-term study of chlamydophilosis in Slovenia. *Vet Res Commun* 2005; 29(1):23-36.
39. Donatti M, Rumpianesi F, Pavan G, D'Apote L, Cevenini R. Detection of serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* by in vitro neutralization and microimmunofluorescence assays. *Zentralbl Bakteriol* 1996; 284(1):52-57.
40. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33: 92-503.
41. Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probe* 2006; 20: 60-63.
42. Ekman MR, Grayston JT, Visakorpi R, Kleemola M, Kuo CC, Saikku P. An epidemic of infections due to *Chlamydia pneumoniae* in military conscripts. *Clin Infect Dis* 1993; 17:420-425.
43. Essig A, Zucs P, Susa M, Wasenauer G, Mamat U, Hetzel M, Vogel U, Wieshammer S, Brade H, Marre R. Diagnosis of ornithosis by cell culture and polymerase chain reaction in a patient with chronic pneumonia. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1495-1497.
44. Everett KD, Andersen AA. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(2):461-473.

45. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov. each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the order Chlamydiales, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999a; 49:415-440.
46. Everett KD, Hornung LH, Andersen AA. Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *J Clin Microbiol* 1999b; 37:575-580.
47. Fenga C, Cacciola A, Di Nola C, Calimeri S, Lo GD, Pugliese M, Niutta PP, Martino LB. Serologic investigation of the prevalence of *Chlamydophila psittaci* in occupationally-exposed subjects in eastern Sicily. *Ann Agric Environ Med* 2007; 14: 93-96.
48. Fernández MR, Zagolin MB, Ruiz MC, Martínez MA, Díaz JC. Neumonía adquirida en la comunidad que se hospitalize: estudio etiológico. *Rev méd Chile* 2003; 131 (5): 498-504.
49. File TM, Plouffe JF Jr, Breiman RF, Skelton SK. Clinical characteristics of *Chlamydia pneumoniae* infection as the sole cause of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29(2):426-428.
50. Forsyth MB, Morris AJ, Sinclair DA, Pritchard CP. Investigation of zoonotic infections among Auckland Zoo staff: 1991-2010. *Zoonoses Public Hlth* 2012; 59(8):561-567.
51. Freidank HM, Vogeles H, Eckert K. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:685-688.
52. Fukushi H, Itoh K, Ogawa Y, Hayashi Y, Kuzuya M, Hirai K, Shimakura S. Isolation and serological survey of *Chlamydia psittaci* in feral pigeons from Japan. *Nippon Juigaku Zasshi* 1983; 45: 847-848.

53. Fukushi H, Hirai K. Genetic diversity of avian and mammalian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. *J Bacteriol* 1989; 171:2850-2855.
54. Fukushi H, Hirai K. *Chlamydia pecorum* – the fourth species of genus *Chlamydia*. *Microbiol Immunol* 1993; 37:516-522.
55. Funnel O, Johnson L, Woolford L, Boardman W, Polkinghorne A, McLelland D. Conjunctivitis associated with *Chlamydia pecorum* in three koalas (*Phascolarctos cinereus*) in the Mount Lofty Ranges, South Australia. *J Wildl Dis* 2013; 49(4):1066-1069.
56. Gaede W, Reckling KF, Dresenkamp B, Kenklies S, Schubert E, Noack U, Irmischer HM, Ludwig C, Hotzel H, Sachse K. *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses Public Hlth* 2008; 55(4):184-188.
57. Gartrell BD, French NP, Howe L, Nelson NJ, Houston M, Burrows EA, Russell JC, Anderson SH. First detection of *Chlamydia psittaci* from a wild native passerine bird in New Zealand. *N Z Vet J* 2013; 61(3):174-176.
58. Geens T, Desplanques A, Van Loock M, Bonner BM, Kaleta EF, Magnino S, Andersen AA, Everett KD, Vanrompay D. Sequencing of *Chlamydia psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and need for a rapid discriminatory genotyping method. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2456-2461.
59. Geigenfeind I, Haag-Wackernagel D. Detection of *Chlamydophila psittaci* from feral pigeons in environmental samples: problems with currently available techniques. *Integr Zool* 2010; 5: 63-69.
60. Giraudo L, Kufner M, Torres R, Amburini D, Briguera V, Gavier G. Avifauna del bosque chaqueño oriental de la provincia de Córdoba, Argentina. *Ecol Apl* 2006; 5(1,2): 127-136.
61. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52(5):696-704.
62. Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 1986; 15:161-168.

63. Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int J Syst Bacteriol 1989; 39:88-90.
64. Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. J Infect Dis 2000; 181(3): 402-410.
65. Greco G, Corrente M, Buonavoglia D, Campanile G, Di Palo R, Martella V, Bellacicco AL, D'Abramo M, Buonavoglia C. Epizootic abortion related to infections by *Chlamydophila abortus* and *Chlamydophila pecorum* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 2008; 69:1061-1069.
66. Grimes JE, Wyrick PB. Chlamydiosis (Ornithosis). In: Clenk, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (Eds.) Diseases of Poultry. Ninth ed. Iowa State University Press, Ames, I A, 1991; pp. 311-325.
67. Haag-Wackernagel D, Moch H. Health hazards posed by feral pigeons. J Infect 2004; 48:307-313.
68. Hahn DL, Azenabor AA, Beatty WL, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen. Front Biosci 2002; 7:66-76.
69. Hahn DL, Schure A, Patel K, Childs T, Drizik E, Webley W. *Chlamydia pneumoniae*-Specific IgE Is Prevalent in Asthma and Is Associated with Disease Severity. PLoS ONE 2012; 7(4): e35945. doi:10.1371/journal.pone.0035945.
70. Haidl S, Ivarsson S, Bjerre I, Persson K. Guillain-Barre syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. N Engl J Med 1992; 326:576-577.
71. Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and the lung. Eur Respir J 2000; 16(5):1001-1007.
72. Harkinezhad T, Verminnen K, Van Droogenbroeck C, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. J Med Microbiol 2007; 56(8):1097-1100.
73. Harkinezhad T, Genns T, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. Vet Microbiol 2009a; 135:68-77.

74. Harkinezhad T, Verminnen K, De Buyzere M, Rietzschel E, Bekaert S, Vanrompay D. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J Med Microbiol* 2009b; 58:1207-1212.
75. Harrison GJ. A practitioner's view of the problem of avian chlamydiosis. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1525-1528.
76. Heddema ER, van Hannen EJ, Duim B, de Jongh BM, Kaan JA, van Kessel R, Lumeij JT, Visser CE, Vandenbroucke-Grauls CM. An outbreak of psittacosis due to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *J Med Microbiol* 2006a; 55:1571-1575.
77. Heddema ER, Van Hannen EJ, Duim B, Vandenbroucke-Grauls CMJ, Pannekoek Y. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. *Emerg Infect Dis* 2006b; 12:1989-1990.
78. Herrmann B, Persson H, Jensen JK, Joensen HD, Klint M, Olsen B. *Chlamydophila psittaci* in Fulmars, the Faroe Islands. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 330-332.
79. Hirai K, Itoh K, Tamashita T, Fukushi H, Hatashi Y, Kuzuya M, Shimakura S, Hashimoto A, Akiyama A. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in pet birds maintained in public places or in close human contact. *Jpn J Vet Sci* 1983; 45: 843-845.
80. Holzinger-Umlauf HAM, Marschang RE, Gravendyck M, Kaleta EF. Investigation on the frequency of *Chlamydia* spp. infections in tits (*Paridae*). *Avian Pathol* 1997; 26: 779-789.
81. Hotzel H, Grossmann E, Mutschmann F, Sachse K. Genetic characterization of a *Chlamydophila pneumoniae* isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24:63-66.
82. Hugall A, Timms P, Girjes AA, Lavin MF. Conserved DNA sequences in Chlamydial plasmids. *Plasmid* 1989; 22:91-98.

83. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 2007; 8(1):460.
84. Hvidsten D, Halvorsen DS, Berdal BP, Gutteberg TJ. *Chlamydophila pneumoniae* diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 42-49.
85. Hyman CL, Roblin PM, Gaydos CA, Quinn TC, Schachter J, Hammerschlag MR. Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis* 1995; 20(5):1174-1178.
86. Jackson M, Giffard P, Timms P. Outer membrane protein A gene sequencing demonstrates the polyphyletic nature of koala *Chlamydia pecorum* isolates. *Syst Appl Microbiol* 1997; 20:187-200.
87. Jackson M, White N, Giffard P, Timms P. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol* 1999; 65(4):255-264.
88. Jacobson ER, Heard D, Andersen AA. Identification of *Chlamydophila pneumoniae* in an emerald tree boa, *Corallus caninus*. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16:153-154.
89. Jee J, Degraives FJ, Kim T, Kaltenboeck B. High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5664-5672.
90. Jelocnik M, Frentiu FD, Timms P, Polkinghorne A. Multilocus sequence analysis provides insights into molecular epidemiology of *Chlamydia pecorum* infections in Australian sheep, cattle, and koalas. *J Clin Microbiol* 2013; 51(8):2625-2632.
91. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451:990-993.

92. Kalma S, Mitchell W, Marathe R, Lammel C, Fan J, Hyman RW, Olinger L, Grimwood J, Davis RW, Stephens RS. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genet* 1999; 21:385-389.
93. Kaleta EF, Taday E. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol* 2003; 32: 435-462.
94. Kaltenboeck B, Storz J. Biological properties and genetic analysis of the *ompA* locus in *Chlamydiae* isolated from swine. *Am J Vet Res* 1992a; 53:1482-1487.
95. Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate *ompA* DNA of *Chlamydia* spp. *J Clin Microbiol* 1992b; 30:1098-1104.
96. Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four Chlamydial species. *J Bacteriol* 1993; 175:487-502.
97. Kaltenboeck B, Hehnen HR, Vaglenov A. Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Vet Res Commun* 2005; 29:1-15.
98. Kanauchi M, Kawano T, Dohi K. Association of *Chlamydia pneumoniae* infection with diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47(1):45-48.
99. Kauffold J, Melzer F, Henning K, Schulze K, Leiding C, Sachse K. Prevalence of *Chlamydiae* in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 2006; 65:1750-1758.
100. Kauffold J, Henning K, Bachmann R, Hotzel H, Melzer F. The prevalence of *Chlamydiae* of bulls from six bull studs in Germany. *Anim Reprod Sci* 2007; 102:111-121.
101. Kenina V, Auce P, Millers A. The relationship between seropositivity against *Chlamydia pneumoniae* and stroke and its subtypes in a Latvian population. *Medicina (Kaunas)* 2011; 47 (12): 657-660.



102. Kern DG, Neill MA, Schachter J. A seroepidemiologic study of *Chlamydia pneumoniae* in Rhode Island. Evidence of serologic cross-reactivity. *Chest* 1993; 104(1):208-213.
103. Kurz H, Göpfrich H, Wabnegger L, Apfalter P. Role of *Chlamydophila pneumoniae* in children hospitalized for community-acquired pneumonia in Vienna, Austria. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44(9):873-876.
104. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2007; 44(4):568-576.
105. Kumar S, Saigal SR, Sethi GR. Detection of IgM and IgG antibodies to *Chlamydophila pneumoniae* in pediatric community-acquired lower respiratory tract infections. *Indian J Pathol Microbiol* 2011; 54(4):782-785.
106. Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:451-461.
107. Kuo CC, Stephens RS, Bavoil PM, Kaltenboeck B. Genus *Chlamydia*. Jones, Rake and Stearns 1945, 55, in: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, 2nd ed., Springer, Heidelberg 2011; 846-865.
108. Kutlin A, Roblin PM, Kumar S, Kohlhoff S, Bodetti T, Timms P, Hammerschlag MR. Molecular characterization of *Chlamydophila pneumoniae* isolates from Western barred bandicoots. *J Med Microbiol* 2007; 56:407-417.
109. Laroucau K, Vorimore F, Aaziz R, Berndt A, Schubert E, Sachse K. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect Genet Evol* 2009; 9 (6):1240-1247.
110. Lee KJ, Kwon SJ, Choi BR, Bae SM, Kishimoto T, Ando S, Mashida C, Lee YH, Oh HB, Kim KS. Outbreak of respiratory tract infections on an islet

- in Korea: possible *Chlamydia pneumoniae* infection. Jpn J Infect Dis 2006; 59(5):294-298.
111. Lieberman D, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Porath A, Schlaeffer F, Lieberman D, Leinonen M, Saikku P, Horovitz O, Boldur I. *Chlamydia pneumoniae* community-acquired pneumonia: a review of 62 hospitalized adult patients. Infection 1996; 24: 109-114.
112. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. J Comp Pathol 2003; 128:217-244.
113. Longbottom D. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. Vet J 2004; 168: 9-11.
114. Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Diaz Fuenzalida A, Gene RJ. Community-Acquired Pneumonia. Etiology, Epidemiology, and Outcome at a Teaching Hospital in Argentina. Chest 2000; 118:1344-1354.
115. Maass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 1998; 31(4):827-832.
116. Madani SA, Peighambari SM. PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. Avian Pathol 2013; 42(1):38-44.
117. Magnino S, Haag-Wackernagel D, Geigenfeind I, Helmecke S, Dovc A, Prukner-Radocvcic E, Residbegovic E, Ilieski V, Laroucau K, Donati M, Martinov S, Kaleta EF. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health. Vet Microbiol 2009; 135 (1-2): 54-67.
118. Mahmoud E, Elshibly S, Mardh PA. Seroepidemiologic study of *Chlamydia pneumoniae* and other chlamydial species in a hyperendemic area for trachoma in the Sudan. Am J Trop Med Hyg 1994; 51(4):489-494.
119. Mair TS, Wills JM. *Chlamydia psittaci* infection in horses: results of a prevalence survey and experimental challenge. Vet Rec 1992; 130(19):417-419.

120. Marakova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. Trends Biochem Sci 2000; 25(2):50-52.
121. Marrie TJ, Peeling RW, Fine MJ, Singer DE, Coley CM, Kapoor WN. Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. Am J Med 1996; 101:508-515.
122. Marrie TJ, Peeling RW, Reid T, De Carolisz E. *Chlamydia* species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada. Eur Respir J 2003; 21: 779-784.
123. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. Rev Epidem Med Prev 2003; 1: 8-14.
124. McColl KA, Martin RW, Gleeson LJ, Handasyde KA, Lee AK. *Chlamydia* infection and infertility in the female koala (*Phascolarctos cinereus*). Vet Rec 1984; 115-655.
125. McGuigan CC, McTntyre PG, Templeton K. Psittacosis outbreak in Tayside, Scotland, December 2001 to February 2012. Euro Surveill 2012; 17 (22): 20186.
126. McNutt SH, Waller EF. Sporadic bovine encephalomyelitis (Buss disease). Cornell Vet 1940; 30:437-448.
127. Meeusen EN, Scheerlinck JP, Wattedegera S, Entrican G. Advances in mucosal vaccination. Anim Health Res Rev 2004; 5:209-217.
128. Meyer KF. The host spectrum of psittacosis-lymphogranuloma venereum (PL) agents. Am J Ophthalmol 1967; 63: 1225-1246.
129. Micillo E, Bianco A, D'Auria D, Mazzarella G, Abbate GF. Respiratory infections and asthma. Allergy 2000; 55: 42-45.
130. Mitchell C, Hutton S, Myers G, Brunham R, Timm P. *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions. PLoS Pathog 2010; 6(5):e1000903. doi:10.1371/journal.ppat.1000903.

131. Michetti G, Pugliese C, Bamberg M, Ori Belometti M, Villa R, Maggi L, Ranzanici S, Perani V, Farina C, Moioli F. Community-acquired pneumonia: is there difference in etiology between hospitalized and out-patients? *Minerva Med* 1995; 86(9):341-351.
132. Miyashita N, Fukano H, Okimoto N, Hara H, Yoshida K, Niki Y, Matsushima T. Clinical presentation of community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in adults. *Chest* 2002a; 121: 1776-1781.
133. Miyashita N, Saito A, Kohno S, Oizumi K, Yamaguchi K, Watanabe A, Oda H, Fukano H, Yoshida K, Niki Y, Matsushima T. Community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in Japan: a prospective multicenter community-acquired pneumonia study. *Intern Med* 2002b; 41: 943-949.
134. Miyashita N, Fukano H, Mouri K, Fukuda M, Yoshida K, Kobashi Y, Niki Y, Oka M. Community-acquired pneumonia in Japan: a prospective ambulatory and hospitalized patient study. *J Med Microbiol* 2005a; 54: 395-400.
135. Miyashita N, Ouchi K, Shoji H, Obase Y, Fukuda M, Yoshida K, Niki Y, Oka M. Outbreak of *Chlamydophila pneumoniae* infection in long-term care facilities and an affiliated hospital. *J Med Microbiol* 2005b; 54(12):1243-1247.
136. Mohamad KY, Kaltenboeck B, Rahman KS, Magnino S, Sachse K, Rodolakis A. Host Adaptation of *Chlamydia pecorum* towards Low Virulence Evident in Co-Evolution of the *ompA*, *incA*, and *ORF663* Loci. *PLoS ONE* 2014; 9(8): e103615. doi:10.1371/journal.pone.0103615.
137. Mojica S, Huot Creasy H, Daugherty S, Read TD, Kim T, Kaltenboeck B, Bavoil P, Myers GS. Genome sequence of the obligate intracellular animal pathogen *Chlamydia pecorum* E58. *J Bacteriol* 2011; 193(14):3690.
138. Monno R, Fumarola L, Trerotoli P, Giannelli G, Correale M, Brunetti D, Di Biase M. Seroprevalence of *Chlamydophila pneumoniae* in ischaemic heart disease. *New Microbiol* 2010; 33(4):381-385.

139. Monsalve S, Miranda J, Mattar S. First evidence of *Chlamydophila psittaci* circulation in Colombia: a possible public health risk. Rev Salud Pública (Bogotá) 2011; 13(2):314-326.
140. Morange A. De la psittacose, ou infection spéciale déterminée par des perruches. PhD Thesis, Academie de Paris, Paris, France. 1895.
141. Moroney JF, Guevara R, Iverson C, Chen FM, Skelton SK, Messmer TO, Plikaytis B, Williams PO, Blake P, Butler JC. Detection of chlamydiosis in a shipment of pet birds, leading to recognition of an outbreak of clinically mild psittacosis in humans. Clin Infect Dis 1998; 26: 1425-1429.
142. Myers GS, Mathews SA, Eppinger M, Mitchell C, O'Brien KK, White OR, Benahmed F, Brunham RC, Read TD, Ravel J, Bavoil PM, Timms P. Evidence that human *Chlamydia pneumoniae* was zoonotically acquired. J Bacteriol 2009; 191:7225-7233.
143. Nakashima K, Tanaka T, Kramer MH, Takahashi H, Ohyama T, Kishimoto T, Toshima H, Miwa S, Nomura A, Tsumura N, Ouchi K, Okabe N. Outbreak of *Chlamydia pneumoniae* infection in a Japanese nursing home, 1999-2000. Infect Control Hosp Epidemiol 2006; 27(11):1171-1177.
144. Narosky T, Yzurieta D. En: Vázquez Mazzini, editors. Guía para la identificación de aves de Argentina y de Uruguay. 15th Edición. Buenos Aires Argentina, Vazquez Mazzini Press, 2007; pp. 1-345.
145. Ngeow YF, Suwanjutha S, Chantarojanasriri T, Wang F, Sanieel M, Alejandria M, Hsueh PR, Ping-Ing L, Park SC, Sohn JW, Aziah AM, Liu Y, Seto WH, Ngan CC, Hadiarto M, Hood A, Cheong YM. An Asian study on the prevalence of atypical respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. Int J Infect Dis 2005; 9(3):144-153.
146. Nguyen BD, Cunningham D, Liang X, Chen X, Toone EJ, Raetz CR, Zhou P, Valdivia RH. Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(25):10284-10289.

147. Nietfeld JC. Chlamydial infections in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001; 17(2):301-314.
148. Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei T, Jafari S, Feizabadi MM. Single tube real time PCR for detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* and *Legionella pneumophila* from clinical samples of CAP. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2012; 59(2):171-184.
149. Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H, Wettergren B. *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections. *Acta Paediatr* 1998; 87(1):23-27.
150. OIE (Office International des Epizooties). Avian Chlamydiosis. In Manual of standards for diagnostic test and vaccines 2013. Office International des epizooties, Paris. Disponible en: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A>.
151. Oktem IM, Ellidokuz H, Sevinc C, Kilinc O, Aksakoglu G, Sayiner A, Ucan ES, Sezgin S, Ozdemir H, Yuksel B. PCR and serology were effective for identifying *Chlamydophila pneumoniae* in a lower respiratory infection outbreak among military recruits. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60:97-101.
152. Olsen B, Persson K, Broholm KA. PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds in Sweden. *Epidemiol Infect* 1998; 121: 481-483.
153. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986; 16: 52-62.
154. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DS, Jolley KA, Keijzers WC, Vretou E, Maiden MC, Vanrompay D, van der Ende A. Multi Locus Sequence Typing of *Chlamydia* Reveals an Association between *Chlamydia psittaci* Genotypes and Host Species. *PLoS ONE* 2010; 5(12): e14179. doi:10.1371/journal.pone.0014179.
155. Pantchev A, Sting R, Tyczka J, Bauerfeind R, Sachse K. New real-time PCR test for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet J* 2009; 181:145-150.

156. Peeling RW, Wang SP, Grayston JT, Blasi F, Boman J, Clad A, Freidank H, Gaydos CA, Gnarp J, Hagiwara T, Jones RB, Orfila J, Persson K, Puolakkainen M, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 2000; 181:426-429.
157. Petrovay F, Balla E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *J Med Microbiol* 2008; 57 (10): 1296-1298.
158. Phoon MC, Yee GW, Koh WP, Chow VT. Comparative Seroepidemiologic Analysis of *Chlamydophila pneumoniae* Infection using Microimmunofluorescence, Enzyme Immunoassay and Neutralization Test: Implications for Serodiagnosis. *Indian J Microbiol* 2011; 51(2): 223-229.
159. Pickett MA, Everson JS, Pead PJ, Clarke IN. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curind agents. *Microbiol* 2005; 151: 893-903.
160. Planes N, Grela ME, Carballal G, López L, Barrera Oro L. Psittacosis human in Argentine 1977-1981. *Medicina (Bs. As.)* 1986; 46: 287-290.
161. Porath A, Schlaeffer F, Lieberman D. The Epidemiology of Community-acquired Pneumonia among Hospitalized Adults. *J Infect* 1997; 34:41-48.
162. Poole E, Lamont I. *Chlamydia trachomatis* serovars differentiation by direct sequence analysis of the variable segment 4 region of the major outer membrane protein gene. *Infec Inmun* 1992; 60: 1089-1094.
163. Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998; 14(9):817-818.
164. Poudel A, Elsasser TH, Rahman KhS, Chowdhury EU, Kaltenboeck B. Asymptomatic endemic *Chlamydia pecorum* infections reduce growth rates in calves by up to 48 percent. *PLoS One* 2012; 7:e44961.doi:10.1371/journal.pone.0044961.
165. Prukner-Radovic E, Hortvatek D, Gottstein Z, Grozdanic I, Mazija H. Epidemiological investigation of *Chlamydophila psittaci* in pigeons and free-living birds in Croatia. *Vet Res Commun* 2005; 29(1): 17-21.

166. Raso TF, Carrasco AO, Silva JC, Marvulo MF, Pinto AA. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. *Zoonoses Public Hlth* 2010; 57(6):411-416.
167. Rattei T, Ott S, Gutacker M, Rupp J, Maass M, Schreiber S, Solbach W, Wirth T, Gieffers J. Genetic diversity of the obligate intracellular bacterium *Chlamydophila pneumoniae* by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms: evidence for highly clonal population structure. *BMC Genomics* 2007; 8:355-366.
168. Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R, Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser CM. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(6):1397-1406.
169. Read TD, Myers GS, Brunham RC, Nelson WC, Paulsen IT, Heidelberg J, Holtzapple E, Khouri H, Federova NB, Carty HA, Umayam LA, Haft DH, Peterson J, Beanan MJ, White O, Salzberg SL, Hsia RC, McClarty G, Rank RG, Bavoil PM, Fraser CM. Genome sequence of *Chlamydophila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the *Chlamydiaceae*. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(8):2134-2147.
170. Reinhold P, Jaeger J, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Bachmann R, Schubert E, Melzer F, Elschner M, Sachse K. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet J* 2008; 175(2):202-211.
171. Rekiki A, Bouakane A, Hammami S, El Idrissi AH, Bernard F, Rodolakis A. Efficacy of live *Chlamydophila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydophila pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet Microbiol* 2004; 99:295-299.
172. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing, Inc. 1994, p: 984-996.



173. Ritter J. Beitrag zur Frage des Pneumotyphus [Eine Hausepidemie in Uster (Schweiz) betreffend]. Deutsches Archiv für Klinische Medizin 1880; 25: 53-96.
174. Rodolakis A, Salinas J, Papp J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. Vet Res 1998; 29:275-288.
175. Rodolakis, A. Yousef Mohamad, K. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. Vet Microbiol 2010; 27: 140 (34):382-391.
176. Roulis E, Polkinghorne A, Timms P. *Chlamydia pneumoniae*: modern insights into an ancient pathogen. Trends Microbiol 2013; 21(3):120-128.
177. Sachse K, Hotzel H. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested-PCR. Methods Mol Biol 2003; 216: 123-36.
178. Sachse K, Kuehlewind SB, Ruettger AA, Schubert EA, Rohde G. More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. Vet Microbiol 2012; 157476-157480.
179. Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Huot Creasy H, WeidmannM, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruettger A, Bavoil PM, Hufert FT, Rosselló-Móra R, Marz M. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. Syst Appl Microbiol 2014; 37(2):79-88.
180. Salinas J, Souriau A, De Sa C, Andersen AA, Rodolakis A. Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1996; 19(2):155-61.
181. Schneeberger PM, Dorigo-Zetsma JW, Van Der Zee A, Van Bon M, Van Opstal JL. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection. Sacnd J Infect Dis 2004; 36 (4): 269-273.

182. Schöfl G, Voigt A, Litsche K, Sachse K, Saluz HP. Complete genome sequences of four mammalian isolates of *Chlamydia psittaci*. J Bacteriol 2011; 193 (16): 4258.
183. Sevketbeyoglu H. Outbreak of *Chlamydia pneumoniae* infection in a military unit: the distribution of lobar and segmental infiltration. Nobel Med 2012; 8: 26-31.
184. Shen D, Yuen HK, Galita DA, Chan NR, Chan CC. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in a bilateral orbital mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Am J Ophthalmol 2006; 141(6): 1162-1163.
185. Shewan PE, Povey RC, Wilson MR. Feline chlamydial infection. Can Vet J 1978; 19: 289-292.
186. Shewen PE. Chlamydial infection in animals: a review. Can Vet J 1980; 21(1): 2-11.
187. Shirai M, Hirakawa H, Kimoto M, Tabuchi M, Kishi F, Ouchi K, Shiba T, Ishii K, Hattori M, Kuhara S, Nakazawa T. Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12):2311-2314.
188. Soda K, Kishimoto T, Kubota Y, Niki Y, Matsushima T, Izutsu H, Matsumoto A, Soejima R. An outbreak of *Chlamydia pneumoniae* in a junior high school and its district: Presence of asymptomatic oropharyngeal carriers in healthy subjects and in cases of pneumonia after a clinical cure. Amakusa Med J 1997; 11: 17-28.
189. Soldati G, Lu ZH, Vaughan L, Polkinghorne A, Zimmermann DR, Huder JB, Pospischil A. Detection of mycobacteria and chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. Vet Pathol 2004; 41(4):388-397.
190. Somer A, Salman N, Yalçın I, Ađaçfidan A. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community acquired pneumonia in Istanbul. Turkey J Trop Pediatr 2006; 52:173-178.

191. Sriram S, Mitchell W, Stratton C. Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the CNS. *Neurology* 1998; 50: 571-572.
192. Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 55(2):115-159.
193. Sting R, Lerke E, Hotzel H, Jodas S, Popp C, Hafez HM. Comparative studies on detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* in meat turkey flocks using cell culture, ELISA, and PCR. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2006; 113(2):50-54.
194. Storey C, Lusher M, Yates P, Richmond S. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. *J Gen Microbiol* 1993; 139:2621-2626.
195. Storni E, Donati M, Marangoni A, Accardo S, Cevenini R. Comparative PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of the plasmid gene orf3 of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(3):313-318.
196. SNVS: Sistema Nacional de Vigilancia de Salud. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/>
197. Tam JE, Davis CH, Thresher RJ, Wyrick PB. Location of the origin of replication for the 7.5-kb *Chlamydia trachomatis* plasmid. *Plasmid* 1992; 27, 231-236.
198. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24:1596-1599.
199. Tanaka C, Miyazawa T, Watarai M, Ishiguro N. Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 951-953.
200. Tapia O, Slepkin A, Sevrioukov E, Hamor K, de la Maza LM, Peterson EM. Inclusion Fluorescent-Antibody Test as a Screening Assay for Detection of Antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(3):562-567.

201. Telfer BL, Moberley SA, Hort KP, Branley JM, Dwyer DE, Muscatello DJ, Correll PK, England J, McAnulty JM. Probable psittacosis outbreak linked to wild birds. *Emerg Infect Dis* 2005; 11, 391-397.
202. Thom DH, Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Diwan VK, Wang SP. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13(10):785-792.
203. Thomson NR, Yeats C, Bell K, Holden MT, Bentley SD, Livingstone M, Cerdeño-Tárraga AM, Harris B, Doggett J, Ormond D, Mungall K, Clarke K, Feltwell T, Hance Z, Sanders M, Quail MA, Price C, Barrell BG, Parkhill J, Longbottom D. The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Res* 2005; 15(5): 629-640.
204. Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods* 2000; 42(3):265-279.
205. Van Droogenbroeck C, Beeckman DS, Verminnen K, Marien M, Nauwynck H, Boesinghe LT, Varonpay D. Simultaneous zoonotic transmission of *Chlamydophila psittaci* genotypes D, F and E/B to a veterinary scientist. *Vet Microbiol* 2009; 135 (1-2): 78-81.
206. Van Loock M, Geens T, De Smit L, Nauwynck H, Van Empel P, Naylor C, Hafez HM, Goddeeris BM, Vanrompay D. Key role of *Chlamydophila psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens. *Vet Microbiol* 2005; 107:91-101.
207. Vanrompay D, Andersen AA, Ducatelle R, Haesebrouck F. Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *J Clin Microbiol* 1993; 31:134-137.
208. Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenicity for turkeys of *Chlamydia psittaci* strains belonging to the avian serovars A, B and D. *Avian Pathol* 1994; 23:247-262.

209. Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* 1995; 45: 93-119.
210. Vanrompay D, Butaye P, Sayada C, Ducatelle R, Haesebrouck F. Characterisation of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res Microbiol* 1997; 148:327-333.
211. Vanrompay D, Harkinezhad T, Van de Walle M, Beeckman DS, Van Droogenbroeck C, Verminnen K, Leten R, Martel A, Cauwerts K. *Chlamydia psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1108-1110.
212. Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SC, Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, van Helden HP, Peeters MF, Verbrugh HA. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol* 1998; 36(8):2301-2307.
213. Voigt A, Schöfl G, Heidrich A, Sachse K, Saluz HP. Full-length de novo sequence of the *Chlamydia psittaci* type strain, 6BC. *J Bacteriol* 2011; 193(10):2662-2663.
214. Vorimore F, Hsia R-c, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A, Sachse K, Bavoil P, Myers G, Laroucau K. Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS ONE* 2013; 8(9): e74823. doi:10.1371/journal.pone.0074823.
215. Warren K, Swan R, Bodetti T, Friend T, Hill S, Timms P. Ocular Chlamydiales infections of western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) in Western Australia. *J Zoo Wildl Med* 2005; 36:100-102.
216. Wellinghausen N, Straube E, Freidank H, von Baum H, Marre R, Essig A. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(7):485-491.
217. Wattanathum A, Chaoprasong C, Nunthapisud P, Chantaratchada S, Limpairojn N, Jatakanon A, Chanthadisai N. Community-acquired

- pneumonia in southeast Asia: the microbial differences between ambulatory and hospitalized patients. *Chest* 2003; 123(5):1512-1519.
218. Wills JM, Watson G, Lusher M, Mair TS, Wood D, Richmond SJ. Characterization of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse. *Vet Microbiol* 1990; 24: 11-19.
219. Wong YK, Sueur JM, Fall CHD, Orfila J, Ward ME. The species specificity of the microimmunofluorescence antibody test and comparisons with a time resolved fluoroscopic immunoassay for measuring IgG antibodies against *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Pathol* 1999; 52: 99-102.
220. Xunta de Galicia, OPS. EPIDAT 3.1. A Coruña, Washington, D.C.: Xunta de Galicia, OPS; 2006. Disponible en: <http://www.sergas.es/>
221. Yin L, Lagae S, Kalmar I, Borel N, Pospischil A, Vanrompay D. Pathogenicity of low and highly virulent *Chlamydia psittaci* isolates for specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* 2013; 57(2):242-247.
222. Yousef Mohamad K, Roche SM, Myers G, Bavoil PM, Laroucau K, Magnino S, Laurent S, Rasschaert D, Rodolakis A. Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydophila pecorum* strains. *Infect Genet Evol* 2008; 8(6):764-771.
223. Yousef Mohamad K, Rodolakis A. Recent advances in the understanding of *Chlamydophila pecorum* infections, sixteen years after it was named as the fourth species of the Chlamydiaceae family. *Vet Res* 2010; 41:27-37.
224. Yucesan C, Sriram S. *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2001; 14(3):355-359.
225. Zheng Zhang S, Schwartz LW, Webb M. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000; 7:203-214.

## 8. ABREVIATURAS

FC: fijación del complemento.

MIF: microinmunofluorescencia.

C.: *Chlamydia*.

MOMP: Proteína Mayor de Membrana Externa.

PRC: Proteínas Ricas en Cisteína.

Ag: Antígeno.

LPS: Lipopolisacárido.

CDC: Centro de Control de Enfermedades.

Céls: células.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

CA: Clamidiosis aviar.

pb: Pares de bases.

NAC: Neumonía adquirida en la comunidad.

VD4: Dominio variable 4.

OIE: Organismo Internacional de Epizootia.

MEM: Medio Esencial Mínimo.

SFB: Suero fetal Bovino.

NT: Neutralización.

IC: Intervalo de confianza.

IFA: Ensayo de inmunofluorescencia.

ELISA: Enzimoimmuno ensayo.

NS: No significativo.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

NE: Noreste.

S: Sur.

O: Oeste.

UFI: Unidad formadora de Inclusión.

NE: Noreste

**Nota:** las abreviaturas de las bacterias y de las técnicas de laboratorio se nombraron con nomenclatura internacional.



## 9. ANEXOS

### Anexo I: Consentimiento informado

#### “ECOEPIDEMIOLOGIA DE LAS *CHLAMYDOPHILA PSITTACI*, *C. PECORUM* Y *C. PNEUMONIAE*: IMPACTO EN LA SALUD PUBLICA”

##### Información para los pacientes y Formulario de Consentimiento Informado

Es un trabajo realizado por:

- Instituto de Virología “Dr. J.M.Vanella” de la Facultad de Ciencias Médicas. U.N.C.

El presente estudio está orientado a evaluar la prevalencia de infección causada por *Chlamydophila psittaci*, *C. pecorum* y *C. pneumoniae* en personas trabajadoras de la industria avícola y agrícola en zoológicos, en veterinarias, etc. y compararla con los resultados de una población una población en general. El objetivo es conocer la proporción de personas infectadas con estos agentes en nuestro medio.

Por medio de este documento se requiere saber si Ud. como paciente acepta participar en este estudio. Si Ud. acepta participar en el mismo, su participación puede cesar cuando Ud. lo decida.

##### Propósito del Estudio:

Las Clamidias son bacterias de animales de producción, de vida silvestre y de compañía. Además de las pérdidas económicas que producen las infecciones en los planteles de producción bovina, ovina, caprina, porcina y de aves de corral, la mayoría de las especies pueden originar infecciones graves, potencialmente letales en el ser humano.

Todas las especies de clamidias pueden producir en el hombre y animales enfermedades respiratorias, oculares, articulares, genitales e intestinales. A menudo pueden producir infecciones persistentes crónicas y subclínicas.

El contagio humano se produce por la inhalación de aerosoles de las secreciones de aves infectadas, por contacto y manejo de productos de éstas.

Las manifestaciones clínicas en humanos se relacionan con neumonías severas, con síntomas como fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia y dificultad respiratoria; y con síntomas no específicos gastrointestinales como vómitos, dolor abdominal y diarrea. En algunos casos se presentan complicaciones como miocarditis, endocarditis, encefalitis, ictericia y fallas multiorgánicas que pueden producir la muerte del paciente por falta de tratamiento. En mujeres embarazadas puede manifestarse como una neumonía, hepatitis, insuficiencia renal, sepsis, parto prematuro y muerte fetal.

Las infecciones clamidiales suelen presentarse asintomáticas y a menudo resistentes a antibióticos por lo que constituyen un agente causal de cuadros severos en personas de riesgo, como adultos mayores, de corta edad, inmunocomprometidos y mujeres embarazadas, los cuales pueden desarrollar enfermedades por contacto con personas asintomáticas.

En Argentina existen escasos registros y se desconoce la situación de nuestra provincia con respecto a la circulación de estos agentes patógenos, por ello es necesario profundizar y actualizar los estudios de prevalencia e identificación de las especies de clamidias presentes en personas habitantes de nuestra región.

Su participación consiste en la autorización para tomar muestras de sangre e hisopado faríngeo y realizar una entrevista epidemiológica para poder realizar la detección de los mencionados agentes.

### **Responsabilidad del paciente**

Si usted decide aceptar participar en este estudio deberá:

- Asistir a las citas programadas

Por participar en el estudio, recibirá asesoramiento para mejorar su calidad de vida. Mientras participa en este estudio, se le tomarán muestras de sangre e hisopado faríngeo y usted no tendrá que pagar por los estudios practicados, ni por los procedimientos médicos que se le efectúen. Este estudio ayudará a los médicos a dar el mejor tratamiento para evitar todas las complicaciones de esta infección. Al participar en este estudio, también está ayudando indirectamente a otros pacientes que pueden tener el mismo diagnóstico. Es posible que mediante la información obtenida se puedan

recomendar medidas terapéuticas o profilácticas para mejorar su calidad de vida. Estas medidas no están contempladas en el estudio y no puede garantizarse el resultado de las mismas.

**Consideraciones especiales/ Efecto producido por los estudios:**

Participar en el estudio representa para usted el inconveniente de realizar un hisopado faríngeo, lo cual podría ocasionar molestias locales leves. No teniendo la misma riesgos para su salud.

Participar en el estudio representa para usted el inconveniente de realizar una extracción de sangre lo cual podría ocasionar molestias locales leves, por ejemplo la formación de hematoma localizado. No teniendo la misma riesgos para su salud.

El médico tratante registrará la información correspondiente al estudio en la entrevista epidemiológica. Los mismos serán analizados por el grupo de investigadores participantes de este estudio y por profesionales expertos en estadística ajenos al estudio. En todos los casos se respetará la confidencialidad de los datos y la identificación de cada paciente no será develada. Todos los resultados serán evaluados en forma individual y en conjunto con la de los otros pacientes participantes con el fin de establecer la real prevalencia de la infección por *Chlamydia psittaci*, *C. pecorum* y *C. pneumoniae* en la población.

La información del estudio, se almacenará y se analizará usando computadoras, pero su nombre nunca aparecerá en la misma. Usted tiene derecho a solicitar cualquier información referente al estudio.

La participación en este estudio es voluntaria, no generará ningún pago de viáticos ni honorarios ni a los participantes ni a los profesionales actuantes.

Si usted decide participar en este estudio, el médico tratante le pedirá que firme este consentimiento informado. La firma del presente consentimiento no implica renuncia alguna a los derechos contemplados por la legislación argentina.

Este estudio NO implica recibir tratamiento terapéutico alguno, ni modificación de alguna terapia que esté recibiendo en el momento de la recolección de la muestra, por lo que NO implica riesgo alguno.

Los datos personales no figurarán en ninguna publicación. La información recolectada por la investigación será aislada y sólo los investigadores podrán verla.

Su decisión final es voluntaria, NO implica remuneración alguna ni de ningún tipo y se basa en la comprensión de la información aquí contenida.

Usted no está obligado a aceptar la participación en esta investigación si no desea hacerlo y negarse no afectará a su tratamiento. En caso que el resultado de este estudio resultara positivo, el mismo se le informará a Ud.

#### **Duración esperada de la participación de la persona en el estudio:**

El tiempo estimado de su participación en este estudio será de aproximadamente 30 minutos para realizarle la extracción de sangre, el hisopado faríngeo y la entrevista epidemiológica.

#### **Declaración del voluntario**

....., de.....años de edad, manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer la extracción de un hisopado faríngeo y una muestra de sangre para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado “Ecoepidemiología de las *Chlamydomphila psittaci*, *C. Pecorum* y *C. Pneumoniae*: Impacto en la Salud Pública” con el fin de mejorar los programas preventivos y los tratamientos médicos con respecto a esta infección.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de hisopado faríngeo puede tener sobre mi bienestar y salud.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a/y con las garantías de ley.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Entiendo que el grupo de profesionales que realizan este estudio puede interrumpir el estudio cuando quiera, por razones importantes. Si esto ocurre entiendo que no se realizarán las evaluaciones planeadas.

Yo he leído y he entendido esta declaración de consentimiento informado así como los beneficios y los riesgos descritos y entiendo que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin que esto afecte de ninguna forma mi atención médica.

Deberá leer, firmar y fechar este CONSENTIMIENTO INFORMADO una vez que haya comprendido el estudio. Si hay algo que no comprende o si tiene alguna pregunta, pídale a quien le otorga este documento que se lo explique antes de firmar.

Recibirá información del resultado del estudio para que su médico tratante adopte la conducta conveniente.

**Nombre del participante:** \_\_\_\_\_

**Firma del participante:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

**Nombre del Testigo:** \_\_\_\_\_

**Firma del Testigo:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

**Firma del Médico:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

Si usted tiene algunas preguntas puede hacerlas ahora o incluso después de que haya comenzado el estudio. Si usted desea hacer preguntas más tarde, puede contactarse a cualquiera de las siguientes personas:

**Profesionales Responsables:**

-Investigadora Principal: Bióloga María Celia Frutos.  
Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella. FCM. UNC.  
Enf. Gordillo Gómez s/n. Cdad. Universitaria.  
Tel.: 0351- 153049121. Tel. 4334022.  
e-mail: [mariaceliafrutos@gmail.com](mailto:mariaceliafrutos@gmail.com)

-Directora del proyecto: Dra. Cecilia Cuffini.  
Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella. FCM. UNC.  
Enf. Gordillo Gómez s/n. Cdad. Universitaria.  
Tel. 4334022.

e-mail: [ccuffini@cmefcm.uncor.edu](mailto:ccuffini@cmefcm.uncor.edu)

-Codirectora del Proyecto: Dra. Viviana Ré.  
Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella. FCM. UNC.  
Enf. Gordillo Gómez s/n. Cdad. Universitaria.  
Tel. 4334022.  
e-mail: [vivianare@fcm.unc.edu.ar](mailto:vivianare@fcm.unc.edu.ar).

Si usted tiene preguntas como participante en este estudio, favor comuníquese con el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas al teléfono: 0264-154846691.

## Anexo II

### Ficha de estudio laboral-epidemiológica de casos sospechosos de *Chlamydia*:

FICHA N°: \_\_\_\_\_

#### Datos Personales:

NOMBRE Y APELLIDO: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_ SEXO: F M

DOMICILIO: \_\_\_\_\_

TELEFONO: \_\_\_\_\_

LOCALIDAD: \_\_\_\_\_

#### Datos Clínicos:

PRESENTO ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ESTE AÑO: SI NO

PRESENTO CONJUNTIVITIS: SI NO

RECIBIO TRATAMIENTO CON ANTIBIOTICOS: SI NO

TIPO DE ANTIBIOTICO: \_\_\_\_\_

FAMILIARES O AMIGOS CERCANOS ENFERMOS: SI NO

RECIBEN TRATAMIENTO CON ANTIBIOTICOS: \_\_\_\_\_

ESTA EMBARAZADA: SI NO

PERIDAS DE EMBARAZOS ANTERIORMENTE: SI NO

PRESENTO DOLORES ARTICULARES: SI NO

#### Características Laborales:

LUGAR DE TRABAJO: \_\_\_\_\_

ANTIGÜEDAD LABORAL: \_\_\_\_\_

TIPO DE LABOR: \_\_\_\_\_

CONTACTO CON ANIMALES: \_\_\_\_\_

UTILIZA PROTECCIÓN LABORAL: SI NO

TIPO DE PROTECCIÓN: \_\_\_\_\_

#### Características del lugar de Vivienda:

UBICACIÓN: URBANA: \_\_\_\_\_ PERIURBANA: \_\_\_\_\_ RURAL: \_\_\_\_\_

VEGETACIÓN CIRCUNDANTE: SI NO

PLAZAS Y/O PLAZOLETAS CERCANAS: SI NO

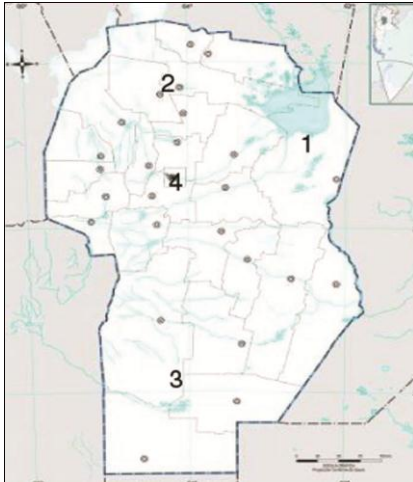
ANIMALES DOMESTICOS: SI NO

PRESENTA MAS DE UN ANIMAL: SI NO

TIPO DE ANIMAL: \_\_\_\_\_

### Anexo III

#### Sitios de captura de la provincia de Córdoba, Argentina.



1: Reserva Provincial de Uso Múltiple “Bañados del Río Dulce y Laguna Mar Chiquita” (30°50' S; 62°54' O).

2: Zona rural de Deán Funes (35° 25' S; 64° 21' O).

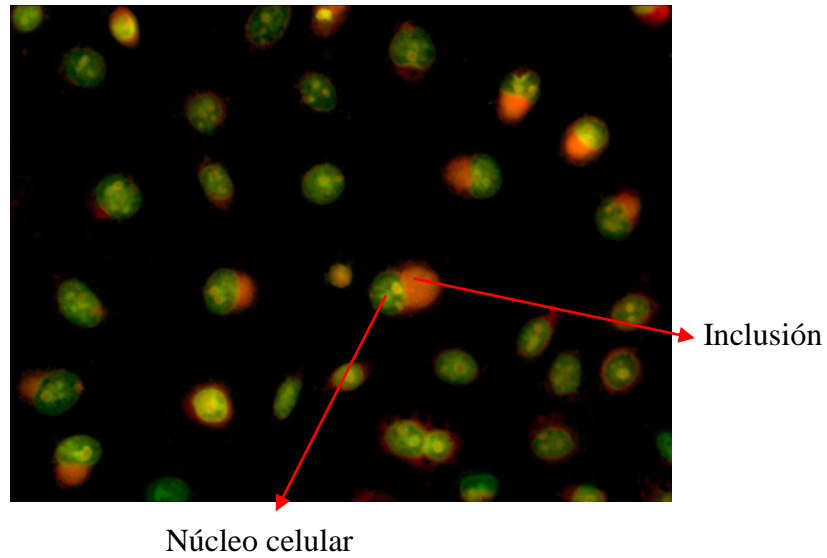
3: Zona rural de Vicuña Mackenna (33°56' S; 64°22' O).

4: Ciudad de Córdoba (31°; 26' S; 64° 09' O).



**Anexo IV:**

Imagen de una monocapa de células LLCMK<sub>2</sub> infectadas con *C. muridarum* cepa MoPn<sup>T</sup>, tinción con Naranja de Acridina al 1% visualizadas en Microscopio Invertido de Inmunofluorescencia con un aumento de 200x y 400x.



Anexo V:

INFORME BREVE

ISSN 0325-7541  
Revista Argentina de Microbiología (2012) 44: 65-68

## Detection of the *ompA* gene of *Chlamydophila pecorum* in captive birds in Argentina

MARÍA C. FRUTOS<sup>1</sup>\*, FERNANDO VENEZUELA<sup>1</sup>, XIMENA KIGUEN<sup>1</sup>, VIVIANA RÉ<sup>1</sup>, CECILIA CUFFINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Enfermera Gordillo Gómez s/n Ciudad Universitaria (5016) Córdoba, Argentina.

\*Correspondence. E-mail: mariaceliafrutos@gmail.com

### ABSTRACT

Bacteria belonging to the family *Chlamydiaceae* cause a broad spectrum of diseases in a wide range of hosts, including humans, other mammals and birds. However, very little is known about chlamydial infections in birds in our region. In the present study, we examined 28 clinically normal birds in illegal captivity that were confiscated in the province of Córdoba, Argentina. The objective was to detect *Chlamydophila* spp. in cloacal swabs by genetic analysis of the *ompA* gene. Nested-PCR of the *ompA* gene identified five samples as *Chlamydophila pecorum* and the sequence analysis demonstrated the presence of the *ompA* gene of *C. pecorum* in these birds. On the other hand, *Chlamydophila psittaci* was not detected. These birds could be either asymptomatic reservoirs or subclinical carriers of *C. pecorum*. This is the first report of the detection of *C. pecorum* in Argentina.

**Key words:** *Chlamydophila pecorum*, birds in captivity, *ompA* gene, sequence analysis

### RESUMEN

**Detección del gen *ompA* de *Chlamydophila pecorum* en aves en cautiverio, en la Argentina.** Las bacterias que pertenecen a la familia *Chlamydiaceae* causan un extenso espectro de enfermedades en una amplia gama de huéspedes, incluidos los seres humanos, otros mamíferos y aves. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de las infecciones por clamidias en aves de nuestra región. Esta investigación examinó 28 aves clínicamente normales mantenidas en cautiverio ilegal, que fueron confiscadas en Córdoba, Argentina. El objetivo fue detectar *Chlamydophila* spp. en hisopados cloacales por análisis del gen *ompA*. La PCR anidada del gen *ompA* reveló la presencia de *Chlamydophila pecorum* en cinco muestras. El análisis de secuencias demostró la presencia del gen *ompA* de *C. pecorum* en estas aves. Por el contrario, *Chlamydophila psittaci* no se detectó. Estas aves pueden ser reservorios asintomáticos o portadores subclínicos de *C. pecorum*. Este es el primer informe de la detección de *C. pecorum* en la Argentina.

**Palabras clave:** *Chlamydophila pecorum*, aves en cautiverio, gen *ompA*, análisis de secuencias

*Chlamydophila psittaci*, the causing agent of avian chlamydiosis, occurs worldwide and has been detected in a wide variety of both wild and domestic birds. However, other clamydiace also have a zoonotic potential (3).

*Chlamydophila pecorum* strains have been isolated from ruminants, swine and koalas in several countries. *C. pecorum* is associated with conjunctivitis, encephalomyelitis, enteritis, pneumonia, polyarthritis, abortion, and reproductive and urinary tract diseases (1, 3, 8). In an assay carried out in free healthy pigeons in Japan, three fecal samples were found to be *C. pecorum*-positive by PCR (7).

The epidemiology of *Chlamydia* infection in animals in Argentina is unknown. Thus, the aim of the present study was to detect *Chlamydia* spp. in illegally captive birds in Córdoba city, Argentina.

Cloacal swabs were collected from 28 birds living in illegal captivity without any clinical signs or evidence of chlamydiosis and were referred to the Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. According to provincial law N.º 1751, which prohibits catching and commercialization, these birds were considered illegal possessions. Therefore, they were confiscated by the Secretaría Provincial del Medio Ambiente in September 2010. The cotton swabs were placed in 1 ml of sucrose-phosphate-glutamate, and 200 µl were subjected to DNA extraction using the Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Alameda, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

DNA extract (5 µl) was used to amplify a 576-bp fragment of the variable domains II, III and IV of the

*ompA* gene of *Chlamydochlamydia*, using primers 191CHOMP (GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC) and CHOMP 371 (TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC), as described by Kaltenböck *et al.* (2) and modified by Sachse and Hotzel (5). Five samples were positive by PCR.

Nested-PCR using primers 218PSITT (GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG)/CHOMP 336 (CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT) showed that none of the samples was positive for *C. psittaci* (389 bp) and that five (17.85 %) were positive for *C. pecorum* (441 bp) with primers 204 PECOR (CCA ATA YGC ACA ATC KAA ACC TCG C)/CHOMP 336 (CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT). The latter were confirmed by sequencing.

For sequence analysis, the nested-PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and subjected to direct nucleotide sequencing reaction in both directions using an ABI automatic sequencer. The *ompA* sequences obtained were submitted to GenBank and relatedness

of newly characterized sequences was assessed by analysis with 2.2.19 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic analyses were constructed with Mega software version 4, using the Neighbor-Joining method and their reliability was assessed by bootstrap (2,000 replicates) (6). Nine reference sequences of the *ompA* region of the *C. pecorum* genome (403 bp) were included in this analysis. The corresponding accession numbers, country of origin, host and clinical condition of these isolates are shown in Table I. The tree was rooted with the *ompA* sequence of the *Chlamydochlamydia abortus* strain (accession number CR848038.1).

The phylogenetic analysis showed that the five sequences clustered with *C. pecorum*.

The *ompA* sequence of the *C. pecorum* strains was highly homologous and shared more than 98 % similarity with each other. Blast searches revealed that all novel *ompA* gene sequences shared high homology with the *ompA* from the iC2, iC3, iC4, 3638/3 and 4283/3 strains.

**Table 1.** Characteristics of *C. pecorum* isolates analyzed or used as reference strains

<i>C. pecorum</i>	Host	Clinical condition	Country origin	Reference	GenBank accession
L71	<i>Sus scrofa</i> (Wild Boar)	polyarthritis	Austria	Kaltenboeck <i>et al.</i> (1993)	M73039
CapraNZ	<i>Capra hircus</i> (Goat)	unknown	New Zeland	O'Keefe <i>et al.</i> (2001)	AY055109
B13	<i>Bos Taurus</i> (Cow)	posthitis	Germany	Wittenbrink <i>et al.</i> (1990)	EU350136
Bahr14	<i>Bos Taurus</i> (Cow)	pneumonia	Germany	Wittenbrink Unpublished data.	EU350137
1710S	<i>Sus scrofa</i> (Goat)	abortion	Austria	Kaltenboeck <i>et al.</i> (1993)	M73033
iB1	<i>Ovis aries</i> (Lamb)	no clinical signs	France	Rodolakis <i>et al.</i> (1989)	EU684924
iC2, iC3, iC4	<i>Capra hircus</i> (Goat)	no clinical signs	France	Rodolakis <i>et al.</i> (1989)	EU684931
824	<i>Ovis aries</i> (Lamb)	conjunctivitis	Scotland	McClenaghan <i>et al.</i> (1984)	EU684922
E58	<i>Bos Taurus</i> (Cow)	encephalomyelitis	USA	McNutt and Waller (1940)	EU837071
3638/3	unplished	unknown	France	Yousef Mohamad (2009)	GQ228186
4283/3	upplished	unknown	France	Yousef Mohamad (2009)	GQ228187
	<i>Cyanocompsa brissonii</i>				
ARG AMB P2	(Ultramarine Grosbeak) <sup>(1)</sup> <i>Paroaria coronata</i>	no clinical signs	Argentina	this paper	JN16880
ARG AMB P6	(Red-crested Cardinal) <sup>(1)</sup> <i>Piranga flava</i>	no clinical signs	Argentina	this paper	JN16881
ARG AMB P7	(Hepatic Tanager) <sup>(1)</sup> <i>Gubernatrix cristata</i>	no clinical signs	Argentina	this paper	JN16882
ARG AMB P9	(Yellow Cardinal) <sup>(1)</sup> <i>Sicalis luteola</i>	no clinical signs	Argentina	this paper	JN16883
ARG AMB P10	(Grassland Yellow – finch) <sup>(1)</sup>	no clinical signs	Argentina	this paper	JN16884

<sup>(1)</sup> Narosky and Yzurieta, 2007.

All local strains were characterized by a thymine at position 132, resulting in Asn instead of Lys in the VD IV of the *ompA* gene (Figure 1). The discrepancy found in this position could be defined as a marker of local strains (Figure 1).

In 98 % of the cases, the bootstrap values in the *ompA* phylogenetic tree supported the conclusion that all local strains belong to the same group (Figure 2).

This chlamydia has generally been associated with the detection in ruminants (10). However, Tanaka *et al.* detected this chlamydia in birds similar to those

studied here. Nevertheless, the homology with these sequences could not be assessed because they are not available at GenBank.

*C. pecorum* infection did not appear to be associated with any clinical signs of these birds. Thus, these birds could be either asymptomatic reservoirs or subclinical carriers of *C. pecorum*.

The epidemiological significance of *C. pecorum* infection is not clear to us at this stage. Further studies are needed to estimate the zoonotic role of this pathogen.

	1	10	31	40	41	50	61	70	71	80	132
iC2	VQELNVL	SNH	TAGTDNASDV	KNATINYHEW	NMLIPYIGVQ	WSRASFDADT	LK				
iC3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
iC4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3638/3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
4283/3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ARG AMBP2	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	P	N
ARG AMBP6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	N
ARG AMBP7	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	N
ARG AMBP9	.....	.....	H	.....	.....	G	.....	.....	E	A	N
ARG AMBP10	G	.....	.....	Q	SA	.....	.....	M	C	.....	N

Figure 1. Comparison of MOMP VD IV sequences. Dots represent residues that are identical to those in iC2, iC3, iC4, 3638/3, and 4283/3 MOMP. The first and the last residues in the IV domain are given as its position in the complete alignment.

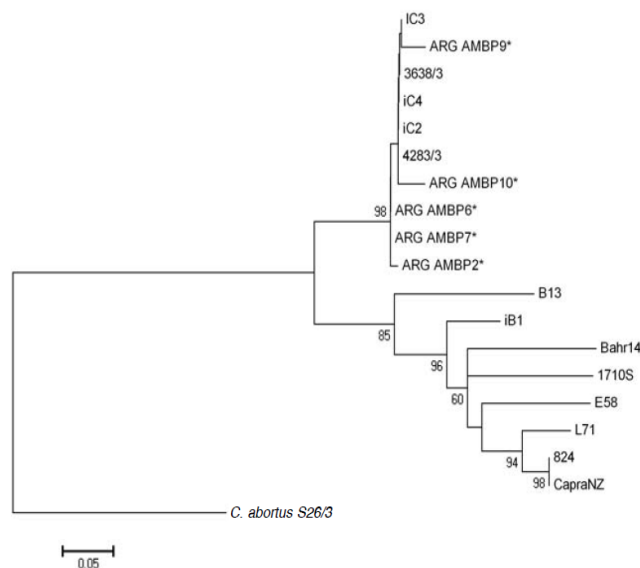


Figure 2. Phylogenetic three analysis of the *ompA* region of the *C. pecorum* genome (403 bp) of the Argentinean isolates and *C. abortus* as rooted. Strains belonging to this study are initiated by ARG and marked with asterisks. The bootstrap ( $\geq 50\%$ ) is indicated in the branch nodes.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Acknowledgements:** this work was partially supported by SECyT-UNC 05/H181, Mincyt-Cba 1427/09, Mincyt-Pid 113/11. This short communication has been prepared in the context of the collaboration promoted by the Provincial Secretariat of Environmental Protection and Sustainable Development, Córdoba, Argentina.

### REFERENCES

1. Jackson M, White N, Giffard P, Timms P. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet Microbiol* 1999; 65: 255-64.
2. Kaltenböeck B, Schmeer N, Schneider R. Evidence for numerous *omp1* alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1835-41.
3. Longbottom D, Coulter L. Animal chlamydiosis and zoonotic implications. *J Comp Pathol* 2003; 128: 217-44.
4. Narosky T, Yzurieta D. Fam. *Emberizidae*. In: Vázquez Mazzini, editores. Guía para la identificación de aves de Argentina y de Uruguay, 15ª edición. Buenos Aires, Argentina, Vázquez Mazzini, 2007, p. 265-75.
5. Sachse K, Hotzel H. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested-PCR. *Methods Mol Biol* 2002; 216: 123-36.
6. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-9.
7. Tanaka C, Miyazawa T, Watarai M, Ishiguro N. Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan, *J Vet Med Sci* 2005; 67: 951-3.
8. Yousef Mohamad K, Rodolakis A. Recent advances in the understanding of *Chlamydia pecorum* infections, sixteen years after it was named as the fourth species of the *Chlamydiaceae* family. *Vet Res* 2010; 41: 27-37.

Anexo VI

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 74 (2012) 320–322



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)



Genotyping of *C. psittaci* in central area of Argentina☆☆☆★

María Celia Frutos\*, Marina Monetti, Ximena Kiguren, Fernando Venezuela, Viviana Ré, Cecilia Cuffini

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, CP 5016, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:  
Received 16 April 2012  
Accepted 29 June 2012  
Available online 21 August 2012

Keywords:  
*Chlamydomydia psittaci*  
Genotypes  
Argentina  
*omp A*  
Molecular detection

ABSTRACT

In central area of Argentina, the epidemiologic and molecular characteristics of *Chlamydomydia psittaci* infections are still unknown. Nested polymerase chain reaction of domains II, III, and IV of the *omp A* gene was used to detect *Chlamydomydia* in 43 pharyngeal swab samples from patients with suspected human psittacosis (2010–2011); 9 (21%) of them yielded positive results. Molecular typing was performed by direct sequencing demonstrating the presence of *C. psittaci* genotypes A, E/B, and WC.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Chlamydomydia psittaci* is the most common infectious agent responsible for severe atypical pneumonia (Longbottom and Coulter, 2003). Symptoms include high fever, low pulse, myalgia, nonproductive cough, and difficult breathing (Beeckman and Varompay, 2009); systemic infections have also been reported (Rhode et al. 2010). *C. psittaci* has been classified in 9 genotypes: A–F, E/B, M56, and WC (Geens et al. 2005). Sequence analysis of the outer membrane protein A (*omp A*) gene is one way to identify all known genotypes and eventual new genotypes (Geens et al. 2005). To perform effective public health surveillance for new variants, modes of transmission and ecological cycle study or helpful in understanding the evolution and the epidemiology of this bacteria, information about sequence variation of subtypes is needed.

In Argentina, the notification of psittacosis is mandatory; however, only a few reports of serologic diagnosis have been published (Espinosa et al. 1996, Fernández and Ouviaña, 1999). Diagnosis is often based on clinical signs and epidemiologic evidence; therefore, these data are not enough for diagnosis of *C. psittaci* due to a low awareness of the disease and variable clinical presentations. We strongly mean that the number of cases reported annually does not reflect the real status of this infection, and for this reason, it would be necessary to emphasize the need for rapid differential

diagnosis and management of suspected cases of psittacosis to prevent fatal outcomes.

This report is the first contribution to the molecular identification of *C. psittaci* in this area of the country.

Forty-three pharyngeal swab samples from patients in whom psittacosis was suspected based on clinical presentation and/or history of exposure or contact with infected birds were analyzed between July 2010 and July 2011 (18 males/25 females, mean age 42 years old,  $r = 6–73$  years). All the patients belonged to Córdoba City (the second most populated inland province of Argentina). The Ethics Committee of Hospital Universitario de Clínicas approved the study.

Individuals completed a questionnaire on professional and non-professional activities, occupation, medical history, and contact frequency with different bird species; however, the birds were not tested because the Argentine Animal Health Service (SENASA) did not authorize this practice.

Genomic DNA extraction was performed with the Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Alameda, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA extract was used to amplify a 389-nt fragment of the *omp A* gene of *Chlamydomydia*, as previously described (Sachse and Hotzel, 2002). For sequence analysis, the nested polymerase chain reaction (PCR) products were purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and subjected to direct nucleotide sequencing reaction in both directions using an ABI automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *C. psittaci* genotype identification was confirmed by phylogenetic analysis.

The *omp A* sequences obtained were submitted to GenBank (accession numbers are shown in Table 1) and alignment with the ClustalX program (Conway Institute UCD Dublin, Dublin, Ireland). The maximum likelihood tree was constructed with the PhyML 3.0 software (Université de Montpellier, Montpellier, France) (Guindon

☆ This study was partially supported by SECYT-UNC 05/H181, Mincyt-Cba 1427/09, and Mincyt-Cba 113/2011. This short communication was prepared in the context of the collaboration promoted by the Epidemiology Secretary, Health Ministry of the Province of Córdoba, Argentina.

☆☆ V. Ré is a scientific member of CONICET, Argentina.

★ Competing interests: None for all authors.

\* Corresponding author. Tel.: +54-351-4334022; fax: +54-351-4241696.

E-mail address: [mariaceliafrutos@gmail.com](mailto:mariaceliafrutos@gmail.com) (M.C. Frutos).

**Table 1**  
Characteristics of the *C. psittaci*-positive cases sequencing.

Patients	Contact with birds	Clinical diagnosis and care	Occupation	Environment	Omp A sequencing	GenBank accession number
ARG HUM 14	No	Febrile syndrome, IAT	Housewife	Rural	WC	JQ308278
ARG HUM 30	Parrot	AAP	Student	Urban	WC	JQ308279
ARG HUM 31	Parrot	Intensive ILI	Retired	Urban	WC	JQ308280
ARG HUM 32	Parrot	AAP	Housewife	Urban	E/B	JQ308281
ARG HUM 45	Parrot	Intensive ILI	Unemployed	Urban	WC	JQ308282
ARG HUM 49	Parrot/canary	Ambulatory ILI	Seller	Urban	A	JQ308283
ARG HUM 57	Canary/pigeon	IAT	Lawyer	Urban	WC	JQ308284
ARG HUM 61	Parrot/chicken	AAP	Rural worker	Rural	WC	JQ308285

IAT = Intensive atypical pneumonia; AAP = ambulatory atypical pneumonia; ILI = influenza-like illness.

and Gascuel, 2003). The model of nucleotide substitution was selected according to the Akaike Information Criterion implemented in the ModelTest 3.7 software (Universidad de Vigo, Galicia, Spain) (Posada and Crandall, 1998) for the data set analyzed. Reference *omp A* sequences of the 10 genotypes were included in this analysis (Fig. 1).

Variables with significance level lower than 0.1 on univariate analysis were analyzed with a multivariate logistic regression model.

Among the 43 studied patients, 9 (21%) were positive for *C. psittaci* by nested PCR. The mean age of the infected patients was 48 years ( $r = 22$ –73 years); 56% (5/9) were young workers aged 22–46 years. Male/female ratio was 1:1. We did not find any significant association between age, sex, or environment and positive nested PCR.

The analysis of the medical records showed that atypical pneumonia was the most frequent clinical presentation (55.6%; 5/9), followed by influenza-like illness (33.3%; 3/9) and febrile syndrome (11.1%; 1/9). White cell count was normal in all the patients; 22% of them had leukopenia; this is in accordance with findings described by Longbottom and Coulter (2003).

Ninety-five percent of the patients reported contact with birds, especially parrots (58%), followed by chickens (24%), feral pigeons (10%), and canaries (8%). Individuals in contact with Psittaciformes were more frequently infected (Heddema et al. 2006). Surprisingly, canaries also seem to present a substantial zoonotic risk (2 of 9 patients, 22%); previous cases of psittacosis infections have also been reported in patients in contact with canaries (Harkinezhad et al. 2009). Daily contact with feral pigeons constitutes a serious zoonotic

risk since feral pigeons are highly infected (Heddema et al. 2006). In this study, 1 positive subject reported previous contact with feral pigeons. The odds ratio (OR) for the nested PCR positive for parrots and canaries was higher than the values for pigeons and chickens ( $P > 0.05$ ). One patient was *C. psittaci* positive without contact with a domestic or companion bird; this infection may be through contact with feral pigeons or other wild birds.

Eight of 9 *C. psittaci*-positive samples were classified by phylogenetic analysis, demonstrating the presence of genotypes A ( $n = 1$ ), E/B ( $n = 1$ ), and WC ( $n = 6$ ) derived from avian and mammals' genotypes (WC and WC1), respectively (Fig. 1).

This finding was not significantly associated with age, sex, or birds with a particular *omp A* genotype. One *C. psittaci*-positive sample could not be typed, probably due to insufficient DNA in the sample.

*C. psittaci* genotype A, originally from infected parrots, was recovered from hospitalized humans with psittacosis (Harkinezhad et al. 2009). However, our patient did not require hospitalization and evolved well with outpatient therapy.

Human infection by *C. psittaci* genotype E/B was reported for the first time in Belgium without severe clinical symptoms in either birds or humans (Varompay et al. 2007). In contrast, our patient had to be hospitalized in the intensive care unit.

The WC strain was isolated during an outbreak of enteritis in cattle (Everett et al. 1999), and the WC1 strain was found in human conjunctive cells from a trachoma-endemic region of southwestern Nepal (Dean et al. 2008). Four of the 9 positive patients had to be hospitalized and 3 presented genotype WC/WC1, requiring intensive care. All the patients were treated with macrolides or tetracyclines and evolved favorably.

Our results indicate a high prevalence of mammals' genotypes in Córdoba, suggesting that mammals may represent an underestimated source of *C. psittaci* strains or that birds may carry strains associated with mammals; as consequence, the classification of these genotypes should be reviewed.

To our knowledge, this study reports the first molecular characterization of *C. psittaci* in human psittacosis in Argentina. The advent of molecular methods has greatly improved the diagnosis and management of diseased produced by *C. psittaci*. The use of nucleic acid amplification directly from clinical samples and direct genotyping with phylogenetic analysis in the *omp A* gene could improve the surveillance and molecular epidemiology of this disease.

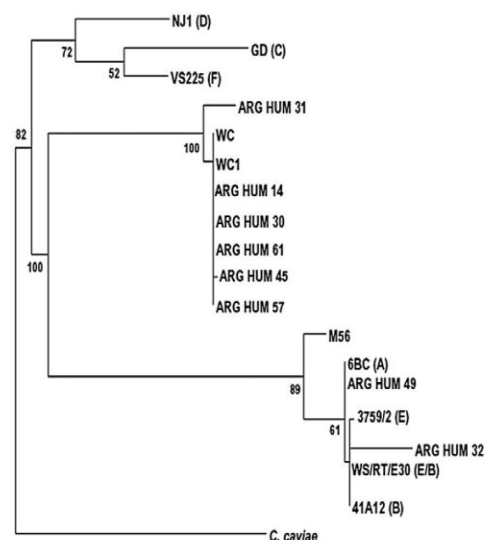
Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.027>.

#### Acknowledgment

The authors thank Dr. Adriana Moriena for the support in clinical issues.

#### References

Beeckman DS, Varompay DC. Zoonotic *Chlamydia psittaci* infections from a clinical perspective. Clin Microbiol Infect 2009;15:11–7.



**Fig. 1.** Maximum likelihood tree for the *omp A* region (290 nt) constructed using HKY+G as model of nucleotide substitution with parameters suggested by ModelTest 3.7 (PhyML software). Strains that belong to this study are initiated by ARG HUM. Numbers above branches: bootstrap values over 2000 bootstrap pseudo replicates. Only bootstrap values >50% are shown at nodes.

- Dean D, Ram P, Kandel H, Adhikari K, Hessel T. Multiple *Chlamydiaceae* species in trachoma: implications for disease pathogenesis and control. *PLoS Med* 2008;5(1): 1–13.
- Espinosa M, Deodato B, Cernigoi B, Seijo A. Cross-reactivity between *Chlamydia psittaci* and *Acinetobacter* in indirect immunofluorescence assays. *Rev Argent Microbiol* 1996;28(3):143–6.
- Everett KD, Busch RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of new species and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415–40.
- Fernández F, Ouviaña G. Seroprevalence of *Chlamydia psittaci* in cats assembled in the Center of Zoonosis of the Municipal of Moron. *Rev Argent Microbiol* 1999;31:1–35.
- Geens T, Desplanques A, Van Loock M, Bonner BM, Kaleta EF, Magnino S, et al. Sequencing of *Chlamydia psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and need for a rapid discriminatory genotyping method. *J Clin Microbiol* 2005;43:2456–61.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003;52(5):696–704.
- Harkinezhad T, Verminnen K, De Buyzere M, Rietzschel E, Bekaert S, Varompay D. Prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J Med Microbiol* 2009;58:1207–12.
- Heddema ER, Van Hanne EJ, Duim B, Vandenbroucke-Grauls CMJ, Pannekoek Y. Genotyping of *Chlamydia psittaci* in human samples. *Emerg Infect Dis* 2006;12: 1989.
- Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* 2003;128:217–44.
- Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14(9):817–8.
- Rhode G, Straube E, Essig A, Reinhold P, Sachse K. Chlamydial zoonoses. *Dtsch Arztl Int* 2010;107(10):174.
- Sachse K, Hotzel H. Detection and differentiation of chlamydiae by nested-PCR. *Methods Mol Biol* 2002;216:123–36.
- Varompay D, Harkinezhad T, Van de Walle M, Beeckman D, Van Droogenbroeck C, Verminnen K, et al. *Chlamydia psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1108.



## Anexo VII

Rev Argent Microbiol. 2014;46(1):45-48



REVISTA ARGENTINA DE  
MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



### BRIEF REPORT

## Molecular evidence of *Chlamydophila pneumoniae* infection in reptiles in Argentina

María C. Frutos\*, Marina S. Monetti, Viviana E. Ré, and Cecilia G. Cuffini

Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Received 6 August 2013; accepted 14 February 2014

#### KEYWORDS

*Chlamydophila pneumoniae*;  
Reptiles;  
Phylogenetic Analysis;  
Immune Response;  
Argentina

#### Abstract

In the central area of Argentina, the epidemiological and molecular characteristics of *Chlamydophila pneumoniae* infections in reptiles are still unknown. A nested polymerase chain reaction of the *rpoB* gene was used to detect *C. pneumoniae* in cloacal swab samples from 19 reptiles at a recreational area. Eleven (57.89%) reptiles were positive; the sequencing and phylogenetic analysis confirmed the presence of this bacterium. Neither *C. pneumoniae* DNA in the caregivers' pharynges nor IgM antibodies anti-*C. pneumoniae* in their serum samples were detected; however, caregivers presented very high titers of IgG anti-*C. pneumoniae*. The detection of *C. pneumoniae* DNA in reptiles demonstrated the circulation of this agent in the recreational area and could be responsible for the exacerbated immune response of the personnel handling the reptiles, which suggests a potential zoonotic cycle. This is the first report of the detection of *C. pneumoniae* in reptiles in Argentina.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### PALABRAS CLAVE

*Chlamydophila pneumoniae*;  
Reptiles;  
Análisis filogenéticos;  
Respuesta inmunitaria;  
Argentina

#### Evidencia molecular de la infección por *Chlamydophila pneumoniae* en reptiles de Argentina

#### Resumen

En la región central de Argentina, las características epidemiológicas y moleculares de las infecciones por *Chlamydophila pneumoniae* en reptiles son desconocidas. Para detectar *C. pneumoniae*, se usó la reacción en cadena de la polimerasa anidada que amplifica el gen *rpoB* en muestras de hisopado cloacal de 19 reptiles. Once (57,89 %) reptiles resultaron positivos. La secuenciación y el análisis filogenético corroboraron la presencia de esta bacteria. No se detectó ADN de *C. pneumoniae* en la faringe ni IgM anti-*C. pneumoniae* en el suero de los cuidadores; sin embargo, ellos presentaron títulos muy elevados de IgG anti-*C. pneumoniae*. La detección de ADN de *C. pneumoniae* en los reptiles demostró

\* Corresponding author.

E-mail address: mariaceliafrutos@gmail.com (M.C. Frutos).

Among the cloacal swabs samples of 19 reptiles studied, 11 (57.89%) tested *C. pneumoniae* positive by nested-PCR [*Python reticulata* (n=2), *Python molurus bivittatus* (n=2), *Bothrops alternatus* (n=1), *Crotalus atrox* (n=1), *Trachemis scripta elegans* (n=2); *Phrynosops hylaris* (n=2); *Micrurus pirracryptus* (n=1)]. DNA of *C. pneumoniae* was not detected in samples from the symptomatic reticulated python, probably because at the time of collection, this reptile was isolated and had already received specific antibiotic treatment. PCR products suitable for sequencing were obtained from 6 reptiles. Sequence analysis confirmed that the amplicons obtained belonged to *C. pneumoniae* (Fig. 1). These findings demonstrated that *C. pneumoniae* is capable of infecting several species of snakes and turtles, broadening the range of reptiles known to be infected by this primarily human pathogen. After confirmation of infection, reptiles were subjected to specific antibiotic treatment. All the caregivers' pharyngeal swabs tested negative for *C. pneumoniae*, excluding active human infection.

In the second visit to the recreational centre in December, all cloacal and pharyngeal swabs analyzed were negative for *C. pneumoniae*.

In terms of immune response, IgM antibodies anti-*C. pneumoniae* were not detected in the caregivers' sera tested in May. One of the caregivers who maintained sporadic contact with the animals presented IgG titers of 1:512. Three caregivers with periodic contact showed IgG titers of 1:2048. One susceptible caregiver [IgG (-)] was the

only worker who always used protection when handling the animals or cleaning their excreta. In December, the caregiver who used protective equipment remained susceptible while IgG levels remained elevated in the others (1:2048). The immune status of a new caregiver who had reported pneumonia in September showed high titers of IgG anti-*C. pneumoniae* (1:4096); however specific IgM was not detected.

The presence of *C. pneumoniae* strains in reptiles is important because this bacterium is a common cause of human pneumonia and bronchitis throughout the world; in addition, it has recently been associated with several chronic diseases, including coronary heart disease, Alzheimer's disease, and multiple sclerosis<sup>3,4,13</sup>. Although *C. pneumoniae* DNA or specific IgM was not detected in the caregivers, the detection of *C. pneumoniae* DNA in the animals demonstrated the circulation of this agent in the recreational park and supports the exacerbated immune response in people handling the reptiles, which suggests a potential zoonotic cycle. Respiratory diseases and excretion of this bacterium in the reptiles were attenuated by specific antibiotic treatment. The implementation of biosecurity measures is essential to prevent transmission, as demonstrated by our results.

In our study, as well as in other reports in a range of reptiles (snakes, iguanas, chameleons) and amphibians (frogs, turtles), the relationship of our sequences with other reference data sets of *chlamydiae* indicates that

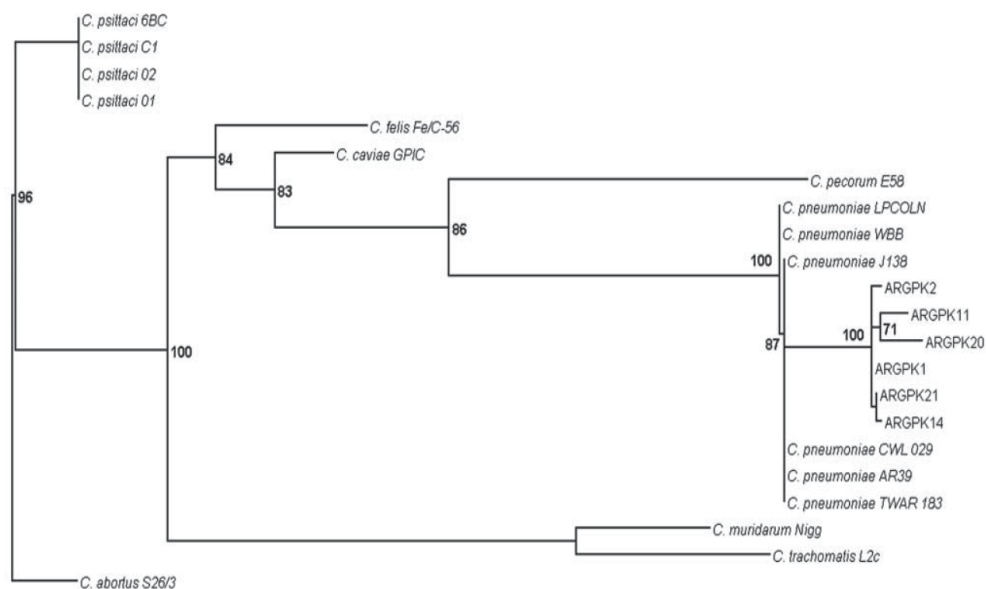


Figure 1 Maximum likelihood tree for the *rpoB* gene (441 nt) constructed using GTR+G as model of nucleotide substitution, with parameters suggested by ModelTest 3.7 (PhyML software). Sequences belonging to this study are initiated by ARG PK. Numbers above branches: bootstrap values over 2000 bootstrap pseudo replicates. Only bootstrap values >50% are shown at nodes. *C. abortus* S26/3 is used as out-group. *C. pneumoniae* LPCOLN: isolated from a koala. *C. pneumoniae* WBB: isolated from a bandicoot. *C. pneumoniae* TWAR 183, CWL029, AR39, J138: isolated from humans. *C. psittaci* O1: isolated from a pig. *C. psittaci* O2: isolated from cattle. *C. psittaci* C1: isolated from a sheep. *C. psittaci* 6BC: isolated from a parakeet. *C. felis* Fe/C-56: isolated from a cat. *C. caviae* GPIC: isolated from a guinea pig. *C. pecorum* E58: isolated from cattle. *C. muridarum* Nigg: isolated from a mouse. *C. trachomatis* L2c: isolated from humans. *C. abortus* S26/3: isolated from a sheep.

although our sequences belonged to the *C. pneumoniae* branch, they are quite distinct from the human TWAR strain (Fig. 1)<sup>1,6,11</sup>.

Even though a limited amount of sequences were analyzed, we found that all *C. pneumoniae* sequences clustered among them and revealed segregation with sequences of human strains. Although transmission among humans is believed to occur from person to person through respiratory secretions<sup>3,13</sup>, until more is known about the epidemiology, pathogenicity, and transmission of *C. pneumoniae* strains recovered from captive and wild populations of cold-blooded animals, their zoonotic potential must be considered. Moreover, because of the increasing ownership of reptiles as pets, caution must be exercised during direct handling of these animals.

Isolation and characterization of reptile *C. pneumoniae* strains are required to assess their clinical impact and possible zoonotic potential.

### Ethical responsibilities

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this investigation.

**Confidentiality of data.** The authors declare that they have followed the protocols of their work centre on the publication of patient data and that all the patients included in the study have received sufficient information and have given their informed consent in writing to participate in that study.

**Right to privacy and informed consent.** The authors declare that no patient data appears in this article.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Acknowledgements

This study was partially supported by Mincyt-Cba 1427/09, Mincyt-Cba 113/2011. This letter has been prepared in the context of the collaboration promoted by

the Secretaría de Ambiente de la provincia de Córdoba, Argentina.

V. Ré is a scientific member of CONICET, Argentina.

### References

1. Blumer C, Zimmermann DR, Weilenmann R, Vaughan L, Pospischil A. *Chlamydiae* in free-ranging and captive frogs in Switzerland. *Vet Pathol.* 2007;44:144-50.
2. Bodetti T, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rose K, Timms P. Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst Appl Microbiol.* 2002;25:146-52.
3. Cuffini C, Alberto Guzmán L, Villegas N, Eduardo Alonso C, Martínez-Riera L, Rodríguez-Fermepín M, Carolina Entrocassi A, Pilar Adamo M, Pedranti M, Zapata M. Isolation of *Chlamydomphila pneumoniae* from atheromas of the carotid artery and their antibiotics susceptibility profile. *Enf. Infect. Microbiol Clin.* 2006;24:81-5.
4. Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;181:402-10.
5. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003;52:696-704.
6. Hotzel H, Grossmann E, Mutschmann F, Sachse K. Genetic characterization of a *Chlamydomphila pneumoniae* isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars. *Syst Appl Microbiol.* 2001;24:63-6.
7. Jacobson ER, Heard D, Andersen AA. Identification of *Chlamydomphila pneumoniae* in an emerald tree boa, *Corallus caninus*. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16:153-4.
8. Mass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:827-32.
9. Mitchell C, Hutton S, Myers G, Brunham R, Timms P. *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000903.
10. Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817-8.
11. Soldati G, Lu Z, Vaughan L, Polkinghorne A, Zimmermann D, Huder B, Pospischil A. Detection of *Mycobacteria* and *Chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Vet Pathol.* 2004;41:388-97.
12. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24:1596-9.
13. Yucesan C, Sriram S. *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system. *Curr Opin Neurol.* 2001;14:355-9.

## Anexo VIII

Avian Pathology, 2015  
Vol. 44, No. 1, 50–56, <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2014.993593>



### ORIGINAL ARTICLE

## Genetic diversity of *Chlamydia* among captive birds from central Argentina

María C. Frutos<sup>1\*</sup>, Marina S. Monetti<sup>1</sup>, Lucia Gallo Vaulet<sup>2</sup>, María E. Cadario<sup>3</sup>, Marcelo Rodríguez Fermepin<sup>2</sup>, Viviana E. Ré<sup>1</sup>, and Cecilia G. Cuffini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, <sup>2</sup>Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, and <sup>3</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS, Carlos G. Malbrán, Córdoba, Argentina

To study the occurrence of *Chlamydia* spp. and their genetic diversity, we analysed 793 cloacal swabs from 12 avian orders, including 76 genera, obtained from 80 species of asymptomatic wild and captive birds that were examined with conventional nested polymerase chain reaction and quantitative polymerase chain reaction. *Chlamydia* spp. were not detected in wild birds; however, four species (*Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia gallinacea*) were identified among captive birds (Passeriformes,  $n = 20$ ; Psittaciformes,  $n = 15$ ; Rheiformes,  $n = 8$ ; Falconiformes  $n = 2$ ; Piciformes  $n = 2$ ; Anseriformes  $n = 1$ ; Galliformes  $n = 1$ ; Strigiformes  $n = 1$ ). Two pathogens (*C. pneumoniae* and *C. pecorum*) were identified simultaneously in samples obtained from captive birds. Based on nucleotide-sequence variations of the *ompA* gene, three *C. psittaci*-positive samples detected were grouped into a cluster with the genotype WC derived from mammalian hosts. A single positive sample was phylogenetically related to a new strain of *C. gallinacea*. This report contributes to our increasing understanding of the abundance of *Chlamydia* in the animal kingdom.

### Introduction

*Chlamydiae* are obligate intracellular bacteria responsible for important clinical and epidemiological implications worldwide, both in human and veterinary medicine (Kuo & Stephens, 2011).

Psittacosis is a well-known human disease caused by *Chlamydia psittaci* (Rodolakis & Yousef Mohamad, 2010), which is acquired from poultry and wild birds. Additionally, pet birds (primarily parrots) are still considered the primary transmitters (Andersen & Franson, 2007; Laroucau *et al.*, 2009). In wild birds, isolates of *C. psittaci* have been reported from more than 460 avian species, as well as from mammals such as hares and muskrats (Andersen & Varonpay, 2003; Smith *et al.*, 2005). *C. psittaci* may produce clinical and/or subclinical infections in birds. Some infected birds may appear healthy and shed the organism intermittently. Shedding can be exacerbated by internal factors such as immune status, in addition to external factors like stress, reproductive activities, rearing of young pigeons, relocation, shipping, crowding and chilling (Smith *et al.*, 2005). The clinical signs vary greatly in severity and depend on the species and age of the birds, as well as the specific causative strains involved (Andersen & Varonpay, 2000; Andersen & Franson, 2007; OIE, 2013). *C. psittaci* is excreted in the faeces and nasal discharge of infected birds. Typical human transmission pathways involve inhalation of infectious aerosols while handling infected animals, carcasses or tissues

(Beeckman & Vanrompay, 2009). *C. psittaci* is classified into nine genotypes: A to F, E/B, M56 and WC. Sequence analysis of the outer membrane protein A (*ompA*) gene is one way to identify all of the already known genotypes and eventually new genotypes (Geens *et al.*, 2005). However, Sachse *et al.* (2008) have suggested adjustments and extensions to the current scheme, which include the introduction of subgroups to the more heterogeneous genotypes A, E/B and D, as well as six provisional genotypes representing so far untypable strains.

Chlamydial infections in birds count among the longest documented zoonotic infections, but recently several authors have suggested that the spectrum of diseases caused by such chlamydial infections may be much wider than realized (Zhang *et al.*, 1993; Berger *et al.*, 1999; Soldati *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2010; Sachse *et al.*, 2012).

*Chlamydia pneumoniae* has an extremely diverse host range; it has been reported in humans, horses, reptiles, amphibians and several Australian marsupials, including koalas and bandicoots, but has rarely been found in birds (Berger *et al.*, 1999; Hotzel *et al.*, 2001; Bodetti *et al.*, 2002; Jacobson *et al.*, 2004; Cochrane *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2010). *Chlamydia pecorum* is a pathogen found in ruminants, swine and koalas of several countries (Zhang *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1999; Longbottom & Coulter, 2003). This species has also been detected previously in captive birds from Japan and in the central area of Argentina (Tanaka *et al.*, 2005; Frutos *et al.*, 2012a).

\*To whom correspondence should be addressed: Tel: +54 351 4334022. E-mail: [mariaceliafrutos@gmail.com](mailto:mariaceliafrutos@gmail.com)

(Received 30 April 2014; accepted 18 November 2014)

© 2015 Houghton Trust Ltd

Recently, Sachse *et al.* (2012) have found *C. pecorum* in urban pigeons for the first time in Germany.

While the recognized hosts are widely acknowledged as transmitters of chlamydial infections, the established knowledge of host restriction of certain chlamydial species is constantly modified by newer studies that report the detection of chlamydial species in animals that are not or rarely identified as host species. Therefore, this study intends to contribute to improving our understanding of the occurrence and genetic diversity of *Chlamydia* in captive and feral birds from Córdoba Argentina.

## Materials and Methods

**Samples.** This study was conducted as a part of the surveillance programme for *Chlamydia* and *Arbovirus* approved and promoted by the Ministry of Environment of Córdoba province.

Cloacal swabs from 505 feral birds were collected during the period 2009 to 2012 from three different places—the Mar Chiquita bird sanctuary, Province of Córdoba (30°50' S; 62°54' W) ( $n = 254$ ); Dean Funes city (35° 25' S; 64° 21' W) ( $n = 169$ ); and rural areas of Vicuña Mackenna (33°56' S; 64°22' W) ( $n = 82$ )—and from 288 captive birds (76 samples from zoo parks and 212 households pets) from Córdoba city (31°26' S; 64° 09' W), central region of Argentina (Supplementary data 1). These samples were stored at 4°C and transferred to the Institute of Virology, School of Medicine, National University of Córdoba, Argentina. In total, 12 avian orders including 76 genera and 80 species of feral and captive birds were studied. The captive birds had no clinical signs compatible with chlamydial infection.

The species and source of the samples are shown in Supplementary data 2.

**DNA extraction.** The cotton swabs were placed in 1 ml sucrose-phosphate-glutamate (Warford *et al.*, 1984) and 200  $\mu$ l of this solution were subjected to DNA extraction using the Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Alameda, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA extracted from the L2/434Bu strain of *Chlamydia trachomatis* was used as a positive control. The extracted DNA was stored at 4°C.

**Generic polymerase chain reaction for *Chlamydia* spp.** DNA extract (5  $\mu$ l) was used to amplify a fragment of 576 base pairs (bp) of the variable domains III and IV of the *ompA* gene of *Chlamydia* spp., using primers 191CHOMP (GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC) and CHOMP 371 (TTA GAA ICK GAA TTG IGC RIT LAY GTG IGC IGC), as described by Sachse & Hotzel (2003).

**Nested polymerase chain reaction for *C. psittaci* and *C. pecorum*.** Two microlitres of templated DNA of generic polymerase chain reaction (PCR) were used for specific nested PCR for amplified *C. psittaci* and *C. pecorum* using primers 218PSITT (GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG) and CHOMP 336 (CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT) for *C. psittaci* (404 bp) and primers 204 PECOR (CCA ATA YGC ACA ATC KAA ACC TCG C) and CHOMP 336 for *C. pecorum* (441 bp) (Sachse & Hotzel, 2003).

*C. psittaci* genotype identification was confirmed by sequence analysis using the *ompA* gene.

**Hemi-nested PCR for *C. pneumoniae*.** Based on the positive results of the generic PCR, we decided to investigate the presence of *C. pneumoniae*. Primers described by Campbell *et al.* (1998) and Mass *et al.* (1998) were used to amplify a fragment of the *rpoB* gene of *C. pneumoniae*: primers HL1 (GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT) and HR1 (TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT), and primers N1 (AGT TGA GCA TAT TCG TGA GG) and N2 (TTT ATT TCC GTG TCG TCC AG).

We modified the protocol and optimized a hemi-nested PCR by combining the primers HL1/N2 and N1/HR1 to amplify two fragments: 273 bp and 249 bp, respectively. These fragments overlapped one another and allowed us to obtain a 441 bp sequence of the *rpoB* gene of *C. pneumoniae*.

**Real-time PCR targeting the 23S rRNA gene.** In this study, a Chlamydiae-specific real-time PCR targeting the 23S rRNA gene was used only in positive nested PCR samples with the purpose of quantification (Everett *et al.*, 1999b). The quantitative PCR was carried out in a final volume of 25  $\mu$ l containing 5  $\mu$ l extracted DNA using an ABI Prism7000 thermocycler (Applied Biosystems, Buenos Aires, Argentina). The cycle threshold value (Ct) was calculated automatically. Each sample was examined in duplicate. The TaqMan test was able to detect as few as 1 inclusion-forming unit or elementary body, or seven targets (Everett *et al.*, 1999b).

**Sequencing.** After the second step, products of the nested PCR were purified by gel electrophoresis using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and subjected to a direct nucleotide sequencing reaction in both directions using the internal (second-round) PCR primers by Macrogen, Inc. (Seoul, Korea).

**Sequence analysis and dendrogram constructions using the *ompA* gene and the *rpoB* gene.** The sequences obtained from regions of the *ompA* gene and the *rpoB* gene were edited and prepared with BioEdit v 7.0.9 (Hall, 1999) and subsequently aligned with ClustalX 2.12 (Larkin *et al.*, 2007), along with the sequences downloaded from the GenBank. Relatedness of newly characterized sequences was assessed by analysis with the 2.2.19 Basic Local Alignment Search Tool.

The dendrogram was constructed using the TreeExplorer module of the MEGA program 4 (Tamura *et al.*, 2007) with the neighbour-joining method and the *p*-distance parameter. The branch support was evaluated by non-parametric bootstrapping with 1000 pseudo-replicas.

## Results

A total of 793 samples were tested for *C. psittaci*, *C. pecorum* and *C. pneumoniae* using the nested PCR assay. None of the *Chlamydia* species was detected in feral birds; however, 17.4% (50/288) of the samples from captive birds were positive. Specific nested PCR confirmed the occurrence of *C. pneumoniae* in 48% ( $n = 24$ ), *C. pecorum* in 22% ( $n = 11$ ) and *C. psittaci* in 6% ( $n = 3$ ) of the positive samples. Eleven (22%) birds presented mixed infections of *C. pneumoniae* and *C. pecorum* (Table 1). In our study, only one sample was negative when tested with specific nested PCR.

By sequencing and analysis of the genetic composition of the *ompA* gene and the *rpoB* gene, genetic diversity and associations among the detected positive samples of *Chlamydia* spp. were determined. The sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession numbers: JX399852 to JX399854 for the *ompA* region of the *C. psittaci*, JX399855 for the *ompA* region of *C. gallinacea*, JN016880 to JN016884 for the *ompA* region of *C. pecorum*, and JX645161 to JX645175 and JX649919 for the *rpoB* region of *C. pneumoniae*.

Genetic analysis of the *ompA* gene for *C. psittaci* revealed that bird samples (ARG AMB 208, ARG AMB 204 and ARG AMB 209) grouped in the genetic cluster represented for WC strains associated with mammal hosts (Figure 1). The Basic Local Alignment Search Tool analysis revealed that *ompA* sequences of sample ARG AMB P3 exhibited a degree of similarity close to a group of sequences of *Chlamydia gallinacea* found in the French psittacosis outbreak in France (GQ398033, GQ398036) (Sachse *et al.*, 2014). The *ompA* sequence of *C. pecorum*-positive samples was highly homologous and shared more than 98% similarity between each other (Figure 1). Genetic analysis of the *rpoB* gene for *C. pneumoniae* revealed that bird samples grouped together in a separate cluster (Figure 2).

The comparison of Ct values with quantitative PCR demonstrated different levels of presence of *Chlamydia* in the cloaca. *Piranga*, *Pavoaria* and *Sicalis* birds (Ct: 31) showed a higher level of occurrence than *Rhea*,

**Table 1.** Occurrence of *Chlamydia* in 288 captive birds (pet in households, n = 212; zoo parks, n = 76).

Habitat	Classification of the avian fauna			Chlamydial species (n)				Total	
	Order	Family	Genus	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. pecorum</i>	<i>C. pneumoniae/C. pecorum</i>		
Pet in household	Anseriformes	Anatidae	<i>Anser</i>	–	1	–	–	1	
	Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus</i>	–	1	–	–	1	
	Passeriformes	Emberizidae	<i>Cyanocompsa</i>	–	1	1	3	6	
			<i>Gubernatrix</i>	–	–	1	–	1	
			<i>Diuca</i>	1	–	–	–	1	
			<i>Paroaria</i>	1	1	1	3	6	
			<i>Pheucticus</i>	–	1	–	–	1	
			<i>Sicalis</i>	–	1	1	–	2	
			Thraupidae	<i>Piranga</i>	–	–	–	1	1
			Turdidae	<i>Turdus</i>	1	–	1	–	2
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Melopsittacus</i>	–	–	–	2	2		
Total (n, %)				3 (12.5)	6 (25)	5 (20.8)	9 (37.5)	24 (11.3)	
Zoo parks	Falconiformes	Falconidae	<i>Falco</i>	–	1	–	–	1	
			<i>Polyborus</i>	–	1	–	–	1	
	Piciformes	Ramphastidae	<i>Ramphartor</i>	–	2	–	–	2	
	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Agapornis</i>	–	6	–	–	6	
			<i>Cyanoliseus</i>	–	1	–	–	1	
			<i>Nymphicus</i>	–	1	4	–	5	
			<i>Psittacula</i>	–	–	1	–	1	
			Rheiformes	Rheidae	<i>Rhea</i>	–	5	1	2
	Strigiformes	Tytonidae	<i>Tyto</i>	–	1	–	–	1	
	Total (n, %)				–	18 (69.2)	6 (23.1)	2 (7.7)	26 (34.2)

*Gubernatrix* and *Pheucticus* (Ct: 38) (Ct  $\leq$ 39; the  $r^2$  linearity value from the linear regression was 0.9935 and efficiency = 10 [–1 / slope] – 1 = 99%).

Table 1 shows that *Chlamydia* spp. were predominantly detected among eight Passeriformes avian species. This included positive rates of 8.3% in the Turdidae family (2/24), 7.7% (17/220) in the Emberizidae family and 6.7% (1/15) in the Thraupidae family. In Psittaciformes birds, we detected *Chlamydia* in 19.7% (15/76) only in the Psittacidae family. However, in birds from the Falconidae family, we detected *Chlamydia* spp. in 28.6% (2/7). We also detected *Chlamydia* in 88.9% (8/9) of the birds from the Rheidae family and 1.2% (1/81) in Galliformes birds (Phasianidae family). In birds of the Piciformes order, Ramphastidae family, *Chlamydia* was found in 22.2% (2/9) of the subjects.

The table also shows that *C. pneumoniae* was the main species detected in captive birds. These bacteria were found in Passeriformes (n = 4), Psittaciformes (n = 8), Rheiformes (n = 5), Falconiformes (n = 2) and Piciformes birds (n = 2), and among one specimen of Strigiformes, Anseriformes and Galliformes birds. *C. pecorum* was detected in Passeriformes (n = 5) and Psittaciformes (n = 5), and one sample from Rheiformes birds. *C. psittaci* was detected only in three samples of Passeriformes birds. Mixed infections among *C. pneumoniae* and *C. pecorum* were detected in Passeriformes (n = 7), Psittaciformes (n = 2) and Rheiformes birds (n = 2), respectively. *C. gallinacea* was detected in a Passeriformes bird (n = 1).

Among household birds, we detected *C. psittaci* in 12.5% (3/24), *C. pecorum* in 20.8% (5/24), *C. pneumoniae* in 25% (6/24) and mixed infections in 37.5% (9/24) of the *Chlamydia*-positive samples. However, *C. psittaci* was not found in birds of zoo parks, while *C. pneumoniae* was detected in 69.2% (18/26), followed by *C. pecorum* in

23.1% (6/26). In addition, we detected mixed infections in 7.7% (2/26) of the samples. The new chlamydial agent *C. gallinacea* was detected in 4.1% (1/24).

## Discussion

In this study, nested PCR and hemi-nested PCR were used to detect and genetically characterize *Chlamydia* spp. For the molecular detection of *C. pecorum* and *C. psittaci*, we used partial *ompA* gene amplification. The choice of the genomic region was based on the fact that it is a region widely associated with the genetic divergence of *Chlamydia* spp. (Poole & Lamont, 1992; Batteiger *et al.*, 1996; Longbottom & Coulter, 2003; Sachse & Hotzel, 2003; Geens *et al.*, 2005; Kaulfold *et al.*, 2006; Laroucau *et al.*, 2009; Pantchev *et al.*, 2009). Amplification of the *rpoB* gene was used for *C. pneumoniae* detection, based on recommendations of the National Center for Infectious Disease Control (Dowell *et al.*, 2001).

With these amplification strategies, a large panel of avian samples was examined, revealing the presence of *Chlamydia* spp. in an extended host range of captive birds (20 species of Passeriformes and non-Passeriformes birds); however, these bacteria were not detected in wild birds. While both wild and captive birds suffered stress at capture time, it is possible that the disruption of the ecological and environmental preservation in captive birds was the cause of the *Chlamydia* detection.

*C. pneumoniae* was the species most commonly detected in captive birds, followed by *C. pecorum* and *C. psittaci*. In addition, *C. gallinacea* and mixed infections of *C. pneumoniae/C. pecorum* were also found.

Among Passeriformes, mainly *Paroaria*, a high occurrence of a wide diversity of *Chlamydia* was found, along with higher levels of chlamydial presence. These results suggest

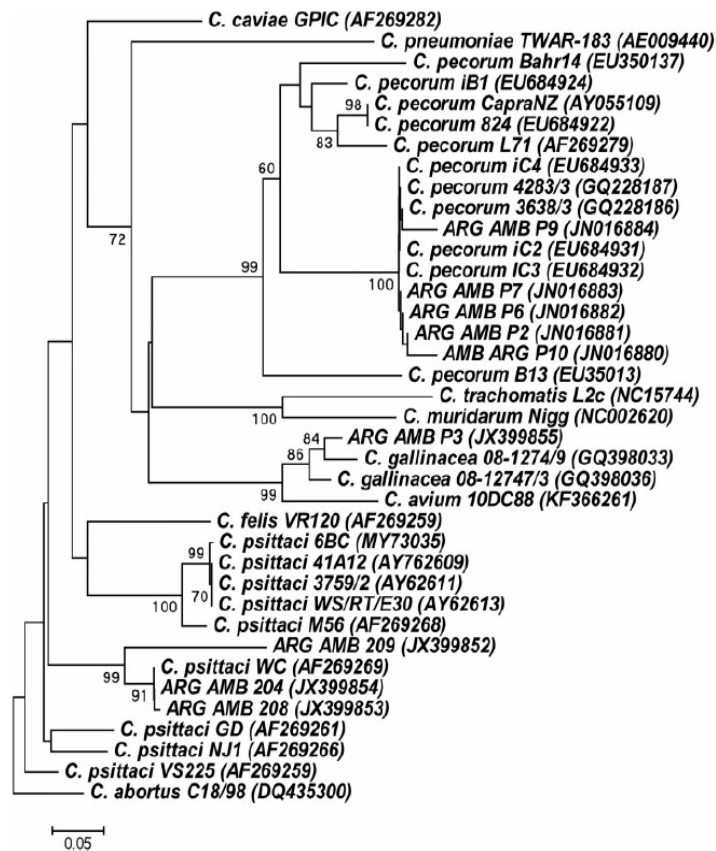


Figure 1. Neighbour-joining dendrogram based on comparison of 404 bp of the *ompA* gene of *Chlamydia*. Samples that belong to this study have the prefix ARG AMB and GenBank accession numbers provided. Numbers above branches are bootstrap values as a percentage of 1000 pseudo replicates and only bootstrap values >60% are shown. *Chlamydia abortus* C18/98 was used as an out-group. Scale bar shows the percentage sequence diversity.

their potential role as reservoirs of *Chlamydia* in our region. However, the occurrence of *Chlamydia* in Passeriformes is more surprising. Some researchers have not been able to demonstrate the presence of *Chlamydia* in Passeriformes (Prukner-Radovic *et al.*, 2005; Chahota *et al.*, 2006), while others have reported frequencies of detection ranging from 0.8 to 54% (Hirai *et al.*, 1983; Holzinger-Umlauf *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 1998; Kaleta & Taday, 2003; Dovic *et al.*, 2005; Celebi & Ak, 2006; Madani & Peighambari, 2013).

*C. psittaci* is the most widely studied *Chlamydia* species among birds; it has been extensively reported that pigeons are the natural reservoirs, as well as the source of human infections (Fukushi *et al.*, 1983; Haag-Wackernagel & Moch, 2004; Chahota *et al.*, 2006; Yousef Mohamad & Rodolakis, 2010). However, samples from local pigeon yielded negative results. *C. psittaci* was detected only in Passeriformes birds (Emberizidae and Turdidae family); but did not appear to be associated with any clinical sign of disease in these birds. Thus, these birds could be subclinical carriers of *C. psittaci*. In addition, the molecular characterization revealed that the positive samples amplified in this study were closely related to the WC strain derived from mammalian genotypes (Everett *et al.*, 1999a). This finding is in line with previous reports of our group (Frutos *et al.*, 2012b) in which this *C. psittaci* genotype was detected among six of the nine human cases (Frutos *et al.*, 2012b).

These results indicate an important circulation of mammalian genotypes in Córdoba-Argentina, suggesting that mammals may represent an underestimated source of *C. psittaci* or that birds could carry strains associated with mammals.

The finding of *C. pecorum* in captive birds provided further evidence of its circulation in asymptomatic birds in our region (Frutos *et al.*, 2012a); however, the epidemiological significance of *C. pecorum* is not clear at this stage. Further studies are needed to estimate the zoonotic role of this pathogen.

*C. pneumoniae* was the species most frequently detected, reflecting its endemic circulation in the local avifauna. Furthermore, the analysis of the amplified sequences showed a close association with the *C. pneumoniae* sequence previously isolated from human samples. Although *C. pneumoniae* has been described in several animal species, its zoonotic role remains unclear (Bodetti *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2010).

Another remarkable finding was the first detection of *C. gallinacea* in our region; this new species of *Chlamydia* had been previously found only in poultry (Gaede *et al.*, 2008; Laroucau *et al.*, 2009; Lemus *et al.*, 2010; Sachse *et al.*, 2014); however, in our study it was found in Ultramarine Grosbeak (Passeriformes, Emberizidae). Also, it is important to note that our study provides further evidence of the

54 M. C. Frutos *et al.*

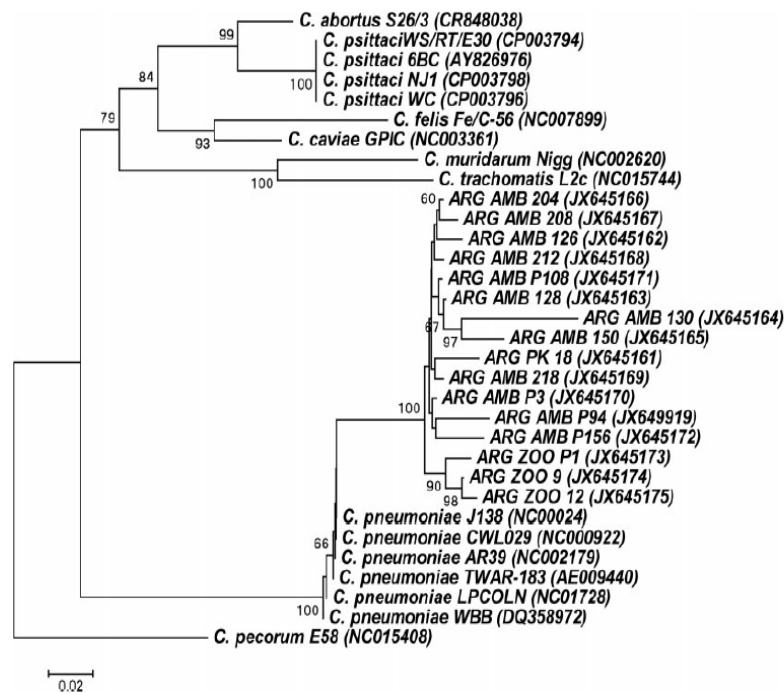


Figure 2. Neighbour-joining dendrogram based on comparison of 441 bp of the *rpoB* gene of *Chlamydia*. Samples that belong to this study have the prefix ARG and GenBank accession numbers provided. Numbers above branches are bootstrap values as a percentage of 1000 pseudo replicates and only bootstrap values >60% are shown. *C. pecorum* E58 was used as an out-group. Scale bar shows the percentage sequence diversity.

occurrence of mixed *Chlamydia* species among birds. This fact has also been reported by Tanaka *et al.* (2005) and Sachse *et al.* (2012).

The presence of *Chlamydia* in captive birds could represent a potential source of infection to caregivers, which emphasizes the need to implement biosecurity measures to mitigate the effects of a possible spread of infection. Several limitations of our study need to be considered. Isolation in cell cultures (CDC, 1998) was the preferred technique to confirm and corroborate the results obtained; however, this is not recommended in the case of *C. psittaci* because of the biological risks. On the other hand, it was not possible to isolate *C. pecorum* and *C. pneumoniae* in cell cultures, perhaps due to the lack of sterile and cooling conditions where the bird samples were collected.

In the literature, studies of bird chlamydial infections have usually been confined to the search for *C. psittaci*, so little is known about the presence of other *Chlamydia* species. The current findings confirm that our knowledge on the variety of chlamydial bird organisms is only partial.

In this study, positive samples were found mainly in two avian orders, namely Passeriformes and Psittaciformes; therefore, they should be taken into account when field studies are performed and their epidemiological importance should be considered.

This report is the first contribution to the identification and molecular characterization of *Chlamydia* spp. in captive birds of Argentina, and it contributes to improving our understanding on the abundance of *Chlamydia* in the animal kingdom.

#### Funding

This study was supported in part by Mincyt-Cba [grant numbers 1427/09, 113/2011] and PICTO-ANLIS [grant number 0180/11]. This communication has been prepared in the context of the collaboration promoted by the Secretary of Environment of Córdoba Province, Argentina. V. E. Ré is a scientific member of CONICET, Argentina.

#### Supplemental data

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

#### References

- Andersen, A.A. & Franson, J.C. (2007). Avian chlamydiosis. In N.J. Thomas, D.B. Hunter & C.T. Atkinson (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Birds* (pp. 303–316). Oxford: Blackwell Publishing.
- Andersen, A.A. & Varompay, D. (2000). Avian chlamydiosis. *OIE Revue scientifique et technique*, 19, 396–404.
- Andersen, A.A. & Varompay, D. (2003). Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* 11th edn (pp. 863–879). Ames: Blackwell Publishing.
- Batteiger, B.E., Lin, P.M., Jones, R.B. & Van Der Pol, B.J. (1996). Species, serogroup, and serovar-specific epitopes are juxtaposed in variable sequence region 4 of the major outer membrane proteins of some *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infection and Immunity*, 64, 2839–2841.
- Beekman, D.S. & Vanrompay, D.C. (2009). Zoonotic *Chlamydia psittaci* infections from a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 11–17.
- Berger, L., Volp, K., Mathews, S., Speare, R. & Timms, P. (1999). *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2378–2380.

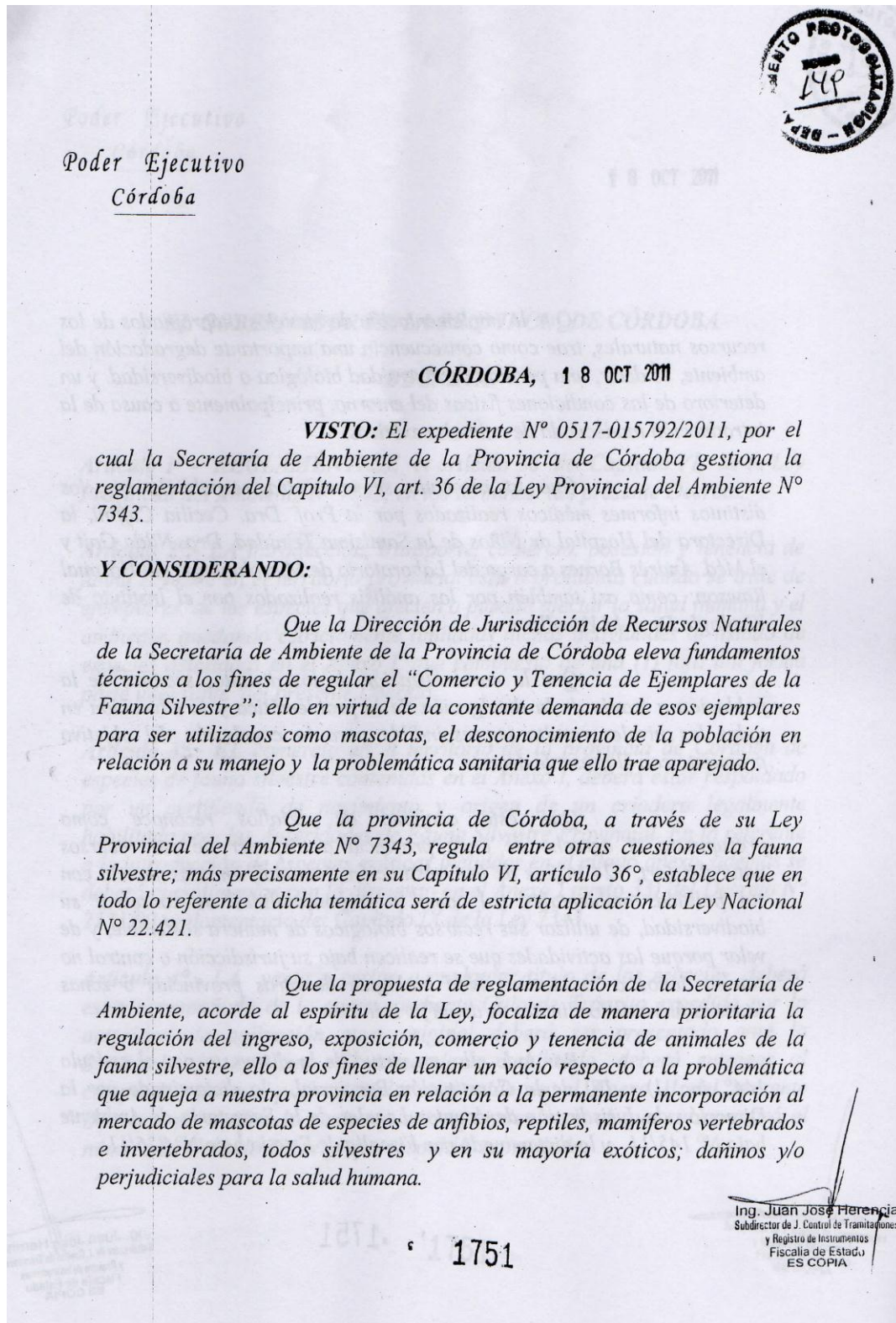


- Bodetti, T., Jacobson, E. & Wan, C. (2002). Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 146–152.
- Campbell, L.A., Kuo, C.C. & Grayston, J.T. (1998). *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 571–579.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (1998). Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 47, 1–15.
- Celebi, B.S. & Ak, S. (2006). A comparative study of detecting *Chlamydophila psittaci* in pet birds using isolation in embryonated egg and polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 50, 489–493.
- Chahota, R., Ogawa, H., Mitsuhashi, Y., Ohya, K., Yamaguchi, T. & Fukushi, H. (2006). Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene. *Microbiology and Immunology*, 50, 663–678.
- Cochrane, M., Walker, P., Gibbs, H. & Timms, P. (2005). Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiology*, 151, 2285–2290.
- Dovc, A., Dovc, P., Kesc, D., Vlahovic, K., Pavlak, M. & Zoman-Rojs, O. (2005). Long-term study of chlamydiae in Slovenia. *Veterinary Research Communications*, 29, 23–36.
- Dowell, S.F., Peeling, R.W., Boman, J., Carlone, G.M., Fields, B.S., Guamer, J., Hammerschlag, M.R., Jackson, L.A., Kuo, C.C., Maass, M., Messmer, T.O., Talkington, D.F., Tondella, M.L. & Zaki, S.R. (2001). Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clinical Infectious Diseases*, 33, 492–503.
- Everett, K.D., Busch, R.M. & Andersen, A.A. (1999a). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of new species and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 415–440.
- Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999b). Rapid detection of the *Chlamydiae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 575–580.
- Frutos, M.C., Vencuzela, F., Kiguen, X., Ré, V. & Cuffini, C. (2012a). Detection of the *ompA* gene of *Chlamydophila pecorum* in captive birds in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 65–68.
- Frutos, M.C., Monetti, M., Kiguen, X., Vencuzela, F., Ré, V. & Cuffini, C. (2012b). Genotyping of *C. psittaci* in central area of Argentina. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74, 320–322.
- Fukushi, H., Itoh, K., Ogawa, Y., Hayashi, Y., Kuzuya, M., Hirai, K. & Shimakura, S. (1983). Isolation and serological survey of *Chlamydia psittaci* in feral pigeons from Japan. *Nippon Juigaku Zasshi*, 45, 847–848.
- Gaede, W., Reckling, K.F., Dresenkamp, B., Kenkies, S., Schubert, E., Noack, U., Irmischer, H.M., Ludwig, C., Hotzel, H. & Sachse, K. (2008). *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. *Zoonoses and Public Health*, 55, 184–188.
- Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bonner, B.M., Kaleta, E.F., Magnino, S., Andersen, A.A., Everett, K.D. & Vanrompay, D. (2005). Sequencing of *Chlamydia psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and need for a rapid discriminatory genotyping method. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2456–2461.
- Haag-Wackemagel, D. & Moch, H. (2004). Health hazards posed by feral pigeons. *Journal of Infection*, 48, 307–313.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hirai, K., Itoh, K., Tamashita, T., Fukushi, H., Hatashi, Y., Kuzuya, M., Shimakura, S., Hashimoto, A. & Akiyama, A. (1983). Prevalence of *Chlamydia psittaci* in pet birds maintained in public places or in close human contact. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 45, 843–845.
- Holzinger-Umlauf, H.A.M., Marschang, R.E., Gravendyck, M. & Kaleta, E.F. (1997). Investigation on the frequency of *Chlamydia* sp. infections in tits (Paridae). *Avian Pathology*, 26, 779–789.
- Hotzel, H., Grossmann, E., Mutschmann, F. & Sachse, K. (2001). Genetic characterization of a *Chlamydophila pneumoniae* isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 63–66.
- Jackson, M., White, N., Giffard, P. & Timms, P. (1999). Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Veterinary Microbiology*, 65, 255–264.
- Jacobson, E.R., Heard, D. & Andersen, A.A. (2004). Identification of *Chlamydophila pneumoniae* in an emerald tree boa, *Corallus caninus*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 153–154.
- Kaleta, E.F. & Taday, M.A. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, 32, 435–462.
- Kaulfold, J., Melzer, F., Henning, K., Schulze, K., Leidung, C. & Sachse, K. (2006). Prevalence of *Chlamydiae* in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology*, 65, 1750–1758.
- Kuo, C. & Stephens, R. (2011). Family I. *Chlamydiaceae*. In N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig & W.B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd edn (pp. 46–865). Heidelberg: Springer.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D. & Gibson, T.J. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Laroucau, K., Vorimore, F., Aaziz, R., Berndt, A., Schubert, E. & Sachse, K. (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 1240–1247.
- Lemus, J.A., Fargallo, J.A., Vergara, P., Parejo, D. & Banda, E. (2010). Natural cross chlamydial infection between livestock and free-living bird species. *PLoS One*, 5, e13512.
- Longbottom, D. & Coulter, L. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, 128, 217–244.
- Madani, S.A. & Peighambari, S.M. (2013). PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. *Avian Pathology*, 42, 38–44.
- Mass, M., Bartels, C., Engel, P.M., Mamat, U. & Sievers, H.H. (1998). Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 31, 827–832.
- Mitchell, C., Hutton, S., Myers, G., Brunham, R. & Timms, P. (2010). *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions. *PLOS Pathogens*, 6, e1000903.
- Myers, G., Mathews, S., Eppinger, M., Mitchell, C., O'Brien, K., White, O. R., Benahmed, F., Brunham, R.C., Read, T.D., Ravel, J., Bavoil, P.M. & Timms, P. (2009). Evidence that human *Chlamydia pneumoniae* was zoonotically acquired. *Journal of Bacteriology*, 191, 7225–7233.
- OIE (Office International des Epizooties). (2013). Avian chlamydiosis. In *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*. Office International des Epizooties, Paris. Retrieved from [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.03.01\\_Clamidiosis\\_aviar.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.01_Clamidiosis_aviar.pdf).
- Olsen, B., Persson, K. & Broholm, K.A. (1998). PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds in Sweden. *Epidemiology & Infection*, 121, 481–483.
- Pantchev, A., Sting, R., Tyczka, J., Bauerfeind, R. & Sachse, K. (2009). New real-time PCR test for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *The Veterinary Journal*, 181, 145–150.
- Poole, E. & Lamont, I. (1992). *Chlamydia trachomatis* serovars differentiation by direct sequence analysis of the variable segment 4 region of the major outer membrane protein gene. *Infection and Immunity*, 60, 1089–1094.
- Prukner-Radovic, E., Hortvatek, D., Gottstein, Z., Grozdanic, I. & Mazija, H. (2005). Epidemiological investigation of *Chlamydophila psittaci* in pigeons and free-living birds in Croatia. *Veterinary Research Communications*, 29, 17–21.
- Rodolakis, A. & Yousef Mohamad, K. (2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology*, 140, 382–391.
- Sachse, K. & Hotzel, H. (2003). Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested-PCR. *Methods in Molecular Biology*, 216, 123–136.

56 M. C. Frutos *et al.*

- Sachse, K., Kuchlewind, S., Ruetzger, A., Schubert, E. & Rohde, G. (2012). More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. *Veterinary Microbiology*, 157, 476–480.
- Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehrlich, R. & Slickers, P. (2008). Genotyping of *Chlamydochlamydia psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiology*, 8, 1–12.
- Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H.H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Ruetzger, A., Bavoil, P.M., Hufert, F.T., Rosselló-Móra, R. & Marz, M. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 79–88.
- Smith, K.A., Bradley, K.K., Stobierski, M.G. & Tengelsen, L.A. (2005). Compendium of measures to control *Chlamydochlamydia psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 532–539.
- Soldati, G., Lu, Z., Vaughan, L., Polkinghorne, A., Zimmermann, D., Huder, J.B. & Pospischil, A. (2004). Detection of *Mycobacteria* and *Chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Veterinary Pathology*, 41, 388–397.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Tanaka, C., Miyazawa, T., Watarai, M. & Ishiguro, N. (2005). Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67, 951–953.
- Warford, A.L., Rekrut, K.A., Levy, R.A. & Drill, A.E. (1984). Sucrose phosphate glutamate for combined transport of chlamydial and viral specimens. *American Journal of Clinical Pathology*, 81, 762–764.
- Yousef Mohamad, K. & Rodolakis, A. (2010). Recent advances in the understanding of *Chlamydochlamydia pecorum* infections, sixteen years after it was named as the fourth species of the *Chlamydiaceae* family. *Veterinary Research*, 41, 27–37.
- Zhang, Y.X., Fox, J.G., Ho, Y., Zhang, L., Stills, H.F. & Smith, T.F. (1993). Comparison of the outer-membrane protein (MOMP) gene of mouse pneumonitis (MoPn) and hamster SFPD strains of *Chlamydia trachomatis* with other *Chlamydia* strains. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 1327–1342.

Anexo IX



*Que la implementación de manejos inapropiados de los recursos naturales, trae como consecuencia una importante degradación del ambiente, es decir, una pérdida de diversidad biológica o biodiversidad, y un deterioro de las condiciones físicas del entorno, principalmente a causa de la introducción inadecuada de animales exóticos.*

*Que lo reseñado se encuentra respaldado con los distintos informes médicos realizados por la Prof. Dra. Cecilia Cuffini, la Directora del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Dra. Nilda Gait y el Méd. Andrés Barnes a cargo del Laboratorio de Microbiología del Hospital Rawson; como así también por los análisis realizados por el Instituto de Virología Dr. J M Vanella.*

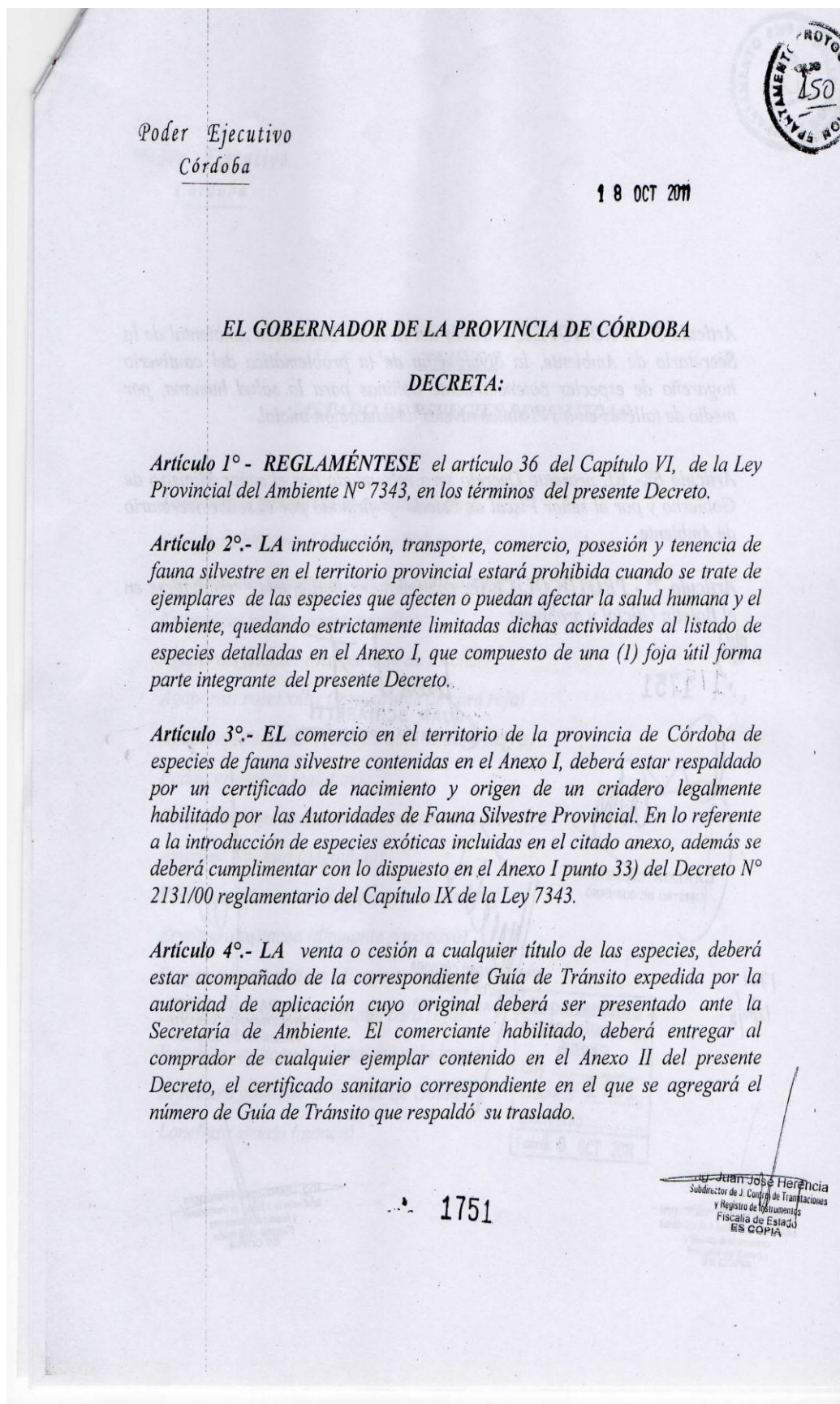
*Que la concientización de los distintos sectores de la población a través de la divulgación de la problemática y la educación en todos los niveles resulta imprescindible para la conclusión del objetivo propuesto con el presente decreto.*

*Que este conjunto de desafíos reconoce como presupuesto el derecho de cada provincia a disponer de sus recursos naturales (art. 124 in fine de la Constitución Nacional) en consonancia con sus políticas ambientales, así como la responsabilidad de conservar su biodiversidad, de utilizar sus recursos biológicos de manera sostenible, y de velar porque las actividades que se realicen bajo su jurisdicción o control no causen daños a la biodiversidad biológica de otras provincias o zonas situadas fuera de los límites de dicha jurisdicción.*

*Por todo ello, en virtud de lo dispuesto por el artículo 144°, inc. 1) y 18) de la Constitución Provincial, lo dictaminado por la Dirección de Jurisdicción de Asuntos Legales de la Secretaría de Ambiente bajo N° 145/11 y lo dictaminado por Fiscalía de Estado bajo N° 826/11;*

1751

Ing. Juan José Herencia  
Subdirector de J. Conf. de Tramitaciones  
y Registro de Instrumentos  
Fiscalía de Estado  
ES COPIA

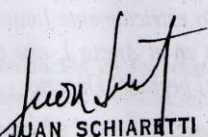


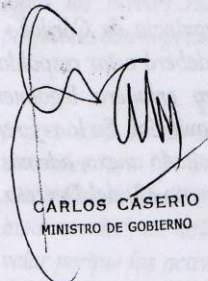
*Artículo 5º.- PROMOVER, a través del Área de Educación Ambiental de la Secretaría de Ambiente, la divulgación de la problemática del cautiverio hogareño de especies potencialmente dañinas para la salud humana, por medio de talleres en los distintos niveles de educación inicial.*

*Artículo 6º.- EL presente Decreto será refrendado por el señor Ministro de Gobierno y por el señor Fiscal de Estado y firmado por el señor Secretario de Ambiente*

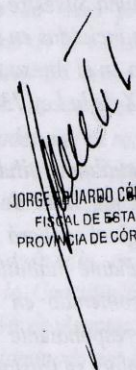
*Artículo 7º - PROTOCOLÍCESE, comuníquese, notifíquese, publíquese en el Boletín Oficial y archívese.*


1751

  
JUAN SCHIARETTI  
GOBERNADOR DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA


  
CARLOS CASERIO  
MINISTRO DE GOBIERNO

1751  
18/10/11

  
JORGE EDUARDO CORDOBA  
FISCAL DE ESTADO  
PROVINCIA DE CORDOBA

  
DR. RAUL O. COSTA  
SECRETARIO DE AMBIENTE  
PROVINCIA DE CORDOBA

  
Ing. Juan José Herencia  
Subdirector de J. Control de Tramitaciones  
y Registro de Instrumentos  
Fiscalia del Estado  
ES COPIA



Poder Ejecutivo  
Córdoba

ANEXO I  
**LISTADO DE ESPECIES PERMITIDAS**

*Taeniopigia guttata* (diamante mandarín)  
*Stizoptera bichenovi* (diamante bichenovi)  
*Melospitacus undulatus* (cotorra australiana)  
*Nymphicus hollandicus* (cocotilla)  
*Agapornis fischeri* (inseparable de Fischer)  
*Agapornis roseicollis* (inseparable de cara roja)  
*Agapornis personata* (inseparable de cara negra)  
*Padda oryzivora* (calafate)  
*Psephotus haematonotus* (cotorra de rabadilla roja)  
*Amadina fasciata* (degollado)  
*Poephila personata* (diamante enmascarado)  
*Erythrura psitacea* (diamante papagayo)  
*Steganopleura guttata* (diamante moteado)  
*Bathilda ruficauda* (diamante cara roja)  
*Poephila acuticauda* (diamante cola larga)  
*Erythrura gouldiae* (diamante de Gould)  
*Lonchusa striata* (manon)

<b>Departamento</b>
<b>Protocolización</b>
<b>Anexo</b>
Ley .....
Decreto <b>1751</b>
Convenio.....
Fecha: <b>8 OCT 2011</b>

Ing. Juan José Herencia  
Subdirector de J. Control de Transacciones  
y Registro de Instrumentos  
Fiscalia de Estado  
ES COPIA

