

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Diagnóstico, caracterización molecular y aislamiento de especies de
Chlamydia en animales domésticos y silvestres de Costa Rica

Ántony Solórzano Morales

Universidad Nacional, Heredia

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado
Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades
Tropicales para optar al grado de *Magister Scientiae*

**Diagnóstico, caracterización molecular y aislamiento de especies de
Chlamydia en animales domésticos y silvestres de Costa Rica**

Ántony Solórzano Morales

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado
Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades
Tropicales para optar al grado de *Magister Scientiae***

Miembros del Tribunal Examinador

Dra. Damaris Castro García

Representante del Consejo Central de Posgrado

M.Sc. Sandra Estrada

Coordinador del posgrado o su representante

Dra. Gaby Dolz Wiedner

Tutor de tesis

Dra. Aida Chaves Hernández

Miembro del Comité Asesor

Dr. Elías Barquero Calvo

Miembro del Comité Asesor

Lic. Antony Solórzano Morales

Sustentante

RESUMEN GENERAL

Las especies del género *Chlamydia* son bacterias Gram negativas intracelulares que infectan una amplia gama de animales (aves, reptiles, anfibios y mamíferos, incluyendo humanos), y causan una gran variedad de enfermedades. La amplia diversidad biológica del país crea un nicho apropiado para el desarrollo de ciclos de transmisión de *Chlamydia* spp., lo que representa un peligro para las especies animales y humana. En la primera parte de esta investigación se tuvo como objetivo determinar la presencia e identificar molecularmente las especies clamidiales presentes en aves de producción (industrial y de traspatio) de Costa Rica. Inicialmente se implementaron las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y en tiempo final (PCR) para *Chlamydia* spp. y *C. psittaci*, seguidamente se analizaron 150 grupos de muestras de tejidos pulmonares de aves de producción industrial con problemas respiratorios y 112 grupos de hisopados traqueales de aves de traspatio asintomáticas con las técnicas moleculares (qPCR, PCR y secuenciación). Un total de 16,8 % (44/262) muestras resultaron positivas a *Chlamydia* spp., encontrándose sobre todo en las muestras de aves de traspatio asintomáticas (28,6 %, 32/112) y en menor cantidad en aves de producción industrial (8%, 12/150). Un 45,5 % (20/44) de estas muestras se determinaron pertenecientes a la especie *C. psittaci*. En dos pollos de producción industrial y en un pavo de traspatio se logró determinar por primera vez, a nivel latinoamericano, la presencia de *C. psittaci* genotipo A. La presencia de *Chlamydia gallinacea* en pollos de traspatio y de *Chlamydia muridarum* en pollos y pavos de producción industrial y de traspatio se reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica. En un 40,9 % (18/44) de los casos, sin embargo, no fue posible identificar la especie clamidial infectante. Estos hallazgos representan un riesgo especialmente para trabajadores de granjas avícolas, mataderos y personas que tienen contacto directo con estas aves.

El objetivo de la segunda parte del estudio fue diagnosticar y caracterizar molecularmente las especies de *Chlamydia* presentes en animales domésticos y silvestres de Costa Rica. Se recolectó un total de 333 muestras de hisopados o tejidos de animales asintomáticos (299) y con signos clínicos (34); las cuales fueron analizadas mediante diferentes técnicas moleculares (qPCR, PCR y secuenciación); además se implementó la técnica de aislamiento en cultivo celular. Del total de muestras analizadas, 59 (17,7 %) resultaron positivas a *Chlamydia* spp., encontrándose sobre todo en animales con enfermedad

respiratoria (50% de los casos), pero también en animales asintomáticos (14 % de los casos). En aves se determinó un 13,9 % (28/201), en mamíferos un 25,9 % (21/81) y en reptiles un 19,6 % (10/51) de las muestras como positivas. La especie más frecuentemente diagnosticada fue *Chlamydia psittaci* genotipo A (22/59, 39 %), encontrándose por primera vez en un gato, en un canario, en un cockatiel, en una lora, y una garza verde, aumentando así el rango de hospederos reportados en el país. Se reporta por primera vez la presencia de *Chlamydia pneumoniae*, en siete serpientes (*Boa constrictor*) y de *Chlamydia suis* en cerdos. Estos hallazgos representan los primeros reportes a nivel centroamericano y latinoamericano, respectivamente. Finalmente se diagnosticó la presencia de *C. psittaci* en un hisopado faringeal de un humano. Los hallazgos confirman la presencia de diversas especies de *Chlamydia* con potencial zoonótico en una gran variedad de animales domésticos y silvestres que conviven con el ser humano. En vista del riesgo que representan las clamidias para la salud pública se recomienda realizar un control activo de enfermedades respiratorias en aves de producción, reglamentar e implementar medidas de bioseguridad en establecimientos de exhibición y venta de animales, y descartar *Chlamydia* spp. en problemas respiratorios de animales y humanos. Además, es importante concientizar y alertar a los profesionales de la salud a considerar a las clamidias en el diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gaby Dolz tutora y guía de este proyecto.

A mis lectores, Dra. Aida Chaves y Dr. Elías Barquero, por todas las sugerencias valiosas que mejoraron esta investigación.

A todos los médicos(as) veterinarios(as) y estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV), UNA, que ayudaron en la recolecta de las muestras.

Al personal del Hospital de Especies Menores y Silvestres y del Laboratorio de Patología Aviar de la EMV por remitir muestras para analizar.

A los diferentes Centros de Rescate, Zoológicos, fincas de producción animal y centros médicos veterinarios que aportaron y remitieron muestras para el análisis.

Al personal del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios, SENASA, Costa Rica; especialmente a la MSc. Idania Chacón.

A la Vicerrectoría de Investigación por el apoyo para la beca de pasantía.

A la Dra. Cecilia Cuffini y sus colaboradores del Instituto de Virología Dr. José María Vanella de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, por su apreciada instrucción durante la pasantía y consejos para desarrollar este trabajo.

Al todo el personal del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias y de la EMV, UNA, por la gran colaboración y enseñanza en estos años.

A todas las personas que, aunque no las mencione explícitamente, de manera personal o virtual les agradeceré apenas tenga la oportunidad.

DEDICATORIA

A Dios por darme la salud, guía y sabiduría para desarrollar este proyecto.

A mis padres, Grace y Álvaro quienes me brindan su apoyo y amor incondicional para crecer y enorgullecerles.

A mi hermanita Rebeca, mi angelito en el cielo quien cuida e intercede por toda la familia, y celebra junto a nosotros esta meta.

A la memoria de la Dra. Marina Monetti.

"No deberían existir fronteras para el esfuerzo humano. Por muy dura que nos parezca la vida, mientras haya vida hay esperanza."

(Stephen Hawking)

ÍNDICE

Resumen general	iv
Agradecimientos	vi
Dedicatoria	vii
Índice de cuadros	x
Índice de figuras	xii
Introducción general	xiv
Definición, historia, epidemiología	xiv
Etiología	xvi
Transmisión	xvii
Patogénesis	xvii
Manifestaciones clínicas	xiv
Diagnóstico	xxi
Tratamiento y profilaxis	xxiii
Referencias bibliográficas	xxiv

ARTÍCULO I	1
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Materiales y métodos	4
2.1 Tipo de estudio y población de referencia	4
2.2 Tamaño y tipo de muestra	4
2.3 Extracción de ADN muestras de aves	5
2.4 Implementación de la técnica de PCR tiempo real (qPCR) para la detección de <i>Chlamydia</i> spp.	6
2.5 Validación de la técnica de qPCR para detección específica de <i>C. psittaci</i> en muestras positivas a <i>Chlamydia</i> spp.	7

2.6 Caracterización molecular y análisis filogenético comparativo de muestras positivas a <i>Chlamydia</i> spp.	7
2.7 Genotipificación y análisis filogenético de las muestras positivas a <i>C. psittaci</i> .	9
3. Resultados	10
4. Discusión	14
5. Conclusiones	18
6. Recomendaciones	18
7. Referencias bibliográficas	19
ARTÍCULO II	26
Resumen	26
Abstract	27
1. Introducción	28
2. Materiales y métodos	30
2.1 Tipo de estudio y población de referencia	30
2.2 Tamaño y tipo de muestras recolectadas de los animales	31
2.3 Análisis molecular	32
2.4 Implementación de la técnica de cultivo celular para el aislamiento de <i>Chlamydia</i> spp.	34
2.5 Caracterización genotípica y análisis filogenético de aislamientos de <i>Chlamydia psittaci</i> .	35
3. Resultados	36
4. Discusión	45
5. Conclusiones	48
6. Recomendaciones	49
7. Referencias bibliográficas	50
Discusión general	54
Conclusiones generales	61

Recomendaciones generales	62
Anexos	64

ÍNDICE DE CUADROS

ARTÍCULO I

Cuadro 1.	10
Número de muestras positivas amplificadas con diferentes PCR	
Cuadro 2.	11
Muestras positivas para el gen <i>ompA</i> de <i>C. psittaci</i> según especie ave, tipo de producción, ubicación e identidades nucleotídicas con secuencias del GenBank	
Cuadro 3.	12
Muestras positivas a <i>Chlamydia</i> spp. según especie ave, tipo de producción, ubicación e identidades nucleotídicas al PCR gen ARNr 23S con secuencias del GenBank	
Cuadro 4.	14
Distribución de las muestras positivas a <i>Chlamydia</i> spp. por sistema de producción y ubicación	

ARTÍCULO II

Cuadro 1.	28
Especies clamidiales y enfermedades causadas en su hospedero primario y en el humano	
Cuadro 2.	31
Número de aves, mamíferos y reptiles sintomáticos y asintomáticos analizados y tipo de muestras analizadas	

Cuadro 3.	33
Protocolos de PCR en tiempo real (qPCR) y punto final (convencional o anidado) empleados para caracterización de diferentes especies clamidiales	
Cuadro 4.	36
Descripción de los animales positivos a <i>Chlamydia</i> spp.	
Cuadro 5.	38
Número de muestras positivas detectadas con diferentes PCR	
Cuadro 6.	39
Identidades nucleotídicas y números de acceso de las secuencias del gen <i>ompA</i> de <i>C. psittaci</i> depositados en Gen Bank de muestras determinadas como positivas en diferentes especies de animales de Costa Rica	
Cuadro 7.	41
Identidades nucleotídicas y números de acceso de las secuencias del gen ARNr 23S de <i>Chlamydia</i> spp. depositados en Gen Bank de muestras determinadas como positivas en diferentes especies de animales de Costa Rica	
Cuadro 8.	42
Identidades nucleotídicas y números de acceso de las secuencias del gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> depositados en Gen Bank de las muestras determinadas como positivas en boas de Costa Rica	

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTÍCULO I

Figura 1. 11

Dendograma obtenido de un fragmento de 330 nucleótidos del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. psittaci*, construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. La secuencia de *C. caviae* GPIC se incluyó como grupo externo. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

Figura 2. 12

Dendograma obtenido de un fragmento de 317 nucleótidos de dominios variables del gen ARNr 23S de *Chlamydia* spp., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. Se muestran once cepas de referencia de *Chlamydia* spp. y las especies clamidiales encontradas en el presente estudio (viñetas negritas). Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

ARTÍCULO II

Figura 1. 38

Dendograma obtenido de un fragmento de 298 nucleótidos del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. psittaci*., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. La secuencia de *C. caviae* GPIC (GenBank AF269282) se incluyó como grupo externo. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

Figura 2. 42

Dendograma obtenido de un fragmento de 318 nucleótidos de dominios variables del gen ARNr 23S de *Chlamydia* spp., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. Se muestran once cepas de referencia de *Chlamydia* spp. y las especies clamidiales encontradas en este estudio. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

Figura 3. 43

Dendograma obtenido de un fragmento de 224 nucleótidos del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. pneumoniae*, construido por el método de Neighbor joining y el modelo p-distance. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

Figura 4. 44

Aislamiento de *Chlamydia psittaci* genotipo A de una lapa verde (*Ara ambiguus*) infectada mediante cultivo celular. A: Inclusiones clamidiales provocando un aumento del volumen de células infectadas y posterior lisis celular. B: Monocapa de células LLCMK2 infectadas, tinción con Naranja de Acridina al 1 % visualizadas en Microscopio de Inmunofluorescencia con un aumento de 100 X.

Figura 5. 44

Dendograma obtenido de un fragmento de 939 nucleótidos comprendiendo los dominios variables I, II, III y IV del gen *ompA* de *C. psittaci*., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. La secuencia de *C. caviae* (GenBank AF269282) GPIC se incluyó como grupo externo. Son indicados los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas), en los nodos de las ramas.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Definición, historia y epidemiología

El género *Chlamydia* es el microorganismo con el más amplio espectro de infección en el reino animal (Jones et al., 2008), ya que infecta tanto a mamíferos, como a reptiles, anfibios y aves, en los cuales puede causar una importante gama de enfermedades. Algunas de las especies que se encuentran en los animales se transmiten además al hombre (Figura 1), por lo que este género de bacterias es de gran importancia para la salud pública.

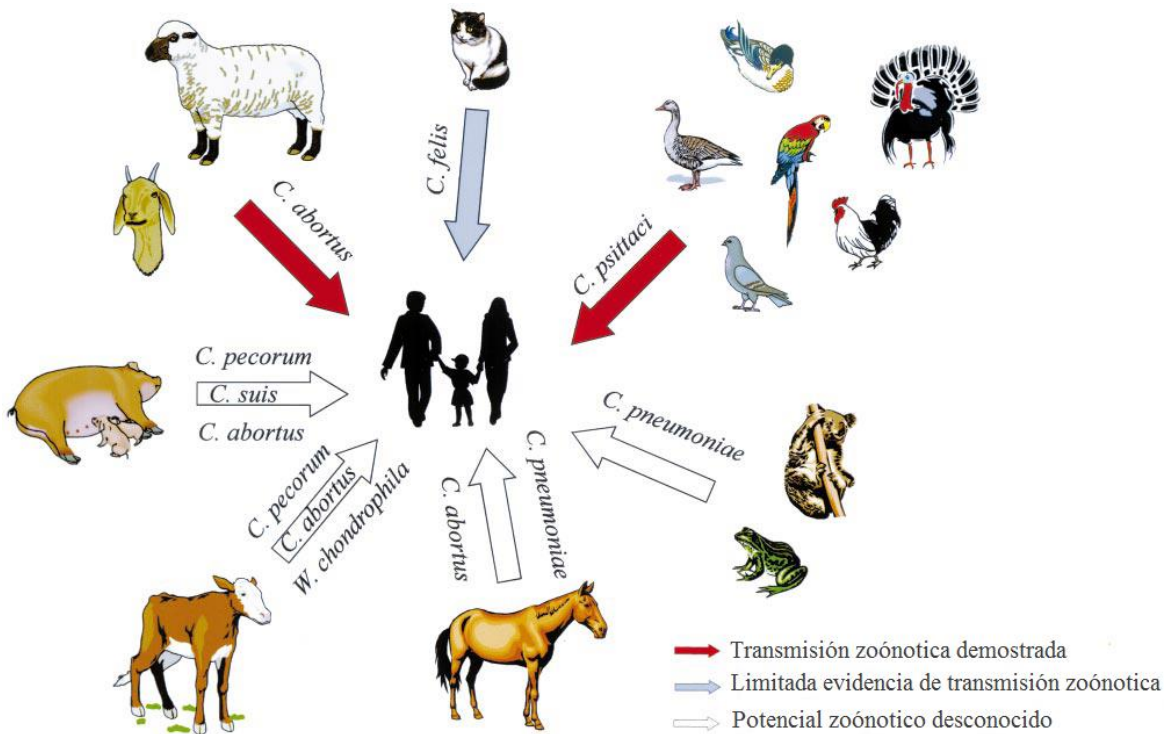


Figura 1. Especies de *Chlamydia* con potencial zoonótico (Tomado de Longbottom & Coulter, 2003).

Dentro de las infecciones clamidiales, la que ha ganado más relevancia a nivel mundial es la clamidiosis aviar (CA), zoonosis ocasionada por la bacteria *Chlamydia psittaci*. Se había denominado psitacosis cuando afectaba aves psitácidas y humanos; pero actualmente se emplea el término clamidiosis aviar para incluir otras especies de aves afectadas. La infección de las aves con *C. psittaci* es frecuente en todo el mundo, reportándose su presencia en 469 especies de aves (Kaleta & Taday, 2003). Los brotes en psitácidas y en explotaciones avícolas causan considerables pérdidas económicas (Comisión Europea, 2002). *Chlamydia psittaci* afecta también al ganado ovino, caprino y bovino, cerdos y caballos (Sachse et al., 2009).

La clamidiosis aviar se describió por primera vez hace más de 100 años, cuando se asoció a una epidemia de neumonía en humanos, los cuales habían estado en contacto con aves tropicales (Ritter, 1880; Harrison, 1989). Tiempo después, se demostró que además de las aves psitácidas, las palomas, las aves acuáticas y las gallináceas son reservorios de *C. psittaci* (Morange, 1895; Harkinezhad et al., 2009). Entre 1950-1980 se registraron brotes epidémicos en trabajadores de la industria avícola en EE. UU. y Europa debido al contacto con patos (Grimes & Wyrick, 1991; Meyer, 1967). En EE. UU. se han logrado disminuir los casos de psitacosis humana, ya que entre 1988 y 2003 se reportaron 935 casos, con una mortalidad del 1 %, la mayoría asociados al contacto con aves psitácidas y palomas (Vanrompay et al., 2007), mientras que del 2003 al 2014, el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) reportó 112 casos de psitacosis (CDC 2014).

Con la ayuda de técnicas moleculares se han descrito nuevas especies de clamidias, que parecen tener potencial zoonótico, tales como *Chlamydia ibidis* (Vorimore et al., 2013), *Chlamydia avium* y *Chlamydia gallinacea*, las cuales han sido encontradas en aves pelecaniformes, psitaciformes, y galliformes, respectivamente (Sachse et al., 2014).

Etiología

Las especies de *Chlamydia* pertenecen al phylum Chlamydiae, orden Chlamydiales, familia *Chlamydiaceae* (Horn et al., 2011). Son bacterias Gramnegativas, intracelulares obligadas, con un ciclo de vida característico del género *Chlamydia*, que alterna entre una forma extracelular infectante, metabólicamente inactiva, llamada cuerpo elemental (CE), y la forma intracelular no infectante, metabólicamente activa, llamada cuerpo reticular (CR) (Schachter & Caldwell, 1980).

Los principales componentes antigénicos del género están presentes en la membrana externa, la cual contiene un lipopolisacárido (LPS) y una proteína mayor de la membrana externa (MOMP). El LPS es un antígeno termoestable común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, y de gran importancia, porque en su ausencia, no se realiza la transición de la forma no infectante (CR) a la forma infectante (CE) (Nguyen et al., 2011). Estos dos componentes antigénicos son parte de los mecanismos de virulencia del género *Chlamydia* y pueden ser utilizados para la identificación del agente. Sin embargo, el LPS es un factor de virulencia que puede ocasionar reacciones cruzadas en pruebas serológicas, no solamente entre los distintos miembros de la familia *Chlamydiaceae*, sino que también con algunas enterobacterias. Por otro lado, la MOMP representa el 60 % del peso seco de la membrana de *Chlamydia* y es el antígeno dominante en *C. psittaci*, ya que está expuesta en la superficie de la membrana. Esta proteína consta de 5 dominios transmembrana conservados (CDI-CDV) y 4 dominios variables (VDI-VDIV) expuestos en la superficie externa. Las mutaciones en la MOMP están relacionadas con las estrategias de evasión del sistema inmune.

La MOMP es el antígeno específico de especie que se utiliza en las pruebas directas de detección de *C. psittaci* (Alonso et al., 2012). En base al gen *ompA*, que codifica para la MOMP, se han diferenciado claramente nueve genotipos distintos de *C. psittaci*. Siete de estos genotipos se han encontrado en reservorios aviares (A, B C, D, E, F, EB), mientras que dos genotipos se han hallado en hospedadores no aviares (WC y M56 en ganado vacuno y roedores, respectivamente). Actualmente,

los genotipos más heterogéneos se han clasificado en subtipos (A-VS1, A-6BC, A-8455, EB-E30, EB-859, EB-KKCP, D-NJ1 y D-9N). Adicionalmente, para las cepas que no habían sido tipificadas hasta la fecha se han sugerido seis nuevos genotipos provisionales (1V, 6N, Mat116, R54, YP84 y CPX0308), por lo que el número total de genotipos ascendería a 15 (Sachse et al., 2008).

Transmisión

Los animales infectados pueden excretar grandes cantidades del agente en forma regular o intermitentemente en las heces (alrededor de 10⁵ unidades infecciosas por gramo de heces), orina, fluido lagrimal, descarga nasal, moco de la cavidad oral y faríngea, así como por medio de la leche de buche de las aves infectadas. Se desconocen los períodos en que los animales con enfermedad clínica o portadores pueden transmitir el organismo. Los animales que comparten agua contaminada también pueden infectarse, así como los depredadores que comen cadáveres contaminados con clamidias (Vanrompay et al., 1995). La transmisión vertical a través del huevo ha sido documentada en patos domésticos, gaviotas cabeza negra (Illner, 1962), periquitos de amor (Olsen, 1990) y en pavos (Gerlach, 1986). Así mismo, los ectoparásitos como pulgas, ácaros y piojos se reportan como posibles vectores para transmitir de un animal a otro la enfermedad (Shewen, 1980). Finalmente, el microorganismo puede ser introducido por contaminación de equipos y alimentos (Harkinezhad et al., 2009). La transmisión a los humanos puede darse por inhalación, ingestión o contacto directo con animales infectados con diferentes especies clamidiales (Longbottom & Coulter, 2003).

Patogénesis

El desarrollo de *Chlamydia* spp. se da tanto a nivel intracelular como extracelular. A nivel intracelular presentan un comportamiento bifásico que consiste en dos formas de vida morfológica y funcionalmente distintas (Figura 2): el cuerpo reticulado (CR) que puede presentar actividad metabólica y replicativa o puede existir como un organismo latente y no replicativo conocido como cuerpo críptico o aberrante. Este

se produce por ciertas condiciones ambientales, o dependiendo del estado del agente infeccioso o de la célula hospedadora (Beatty et al., 1994).

El curso extracelular discurre como una forma metabólicamente inactiva, pero con capacidad infecciosa llamada cuerpo elemental (CE) (tamaño 300-400 nm) (Beeckman & Vanrompay, 2010). El CE puede infectar las células susceptibles donde es capturado por endocitosis, aunque el mecanismo exacto aún se desconoce. Knittler & Sachse (2015) han propuesto que *C. psittaci* puede infectar gran cantidad de diferentes células (células epiteliales, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células dentríticas, entre otras), utilizando múltiples rutas de entrada, explicando así el desarrollo de una infección sistémica en el animal. Los CE se ubican dentro de vacuolas intracitoplasmáticas denominadas inclusiones, las cuales no llegan a fusionarse con los lisosomas debido a un cambio en la membrana de los CE que bloquea este evento. Transcurridas ocho horas se diferencian y se transforman en CR de mayor tamaño (500-1500 nm), pleomórficos que se reproducen por medio de fisión binaria. Los CR requieren de ATP y nutrientes celulares para su metabolismo y replicación, ya que no poseen los mecanismos de glucólisis aerobia y son incapaces de sintetizar nucleótidos *de novo*. Esta dependencia reduce el rendimiento energético de la célula huésped.

Después de varios ciclos de replicación, el CR se reorganiza de nuevo en CE (de 24 a 48 horas), y se libera durante la lisis de la célula huésped (de 48 a 72 horas), invadiendo otras células cercanas (Figura 2) (Longbottom & Coulter, 2003). El CE se caracteriza por su resistencia tanto a factores fisicoquímicos como del medio ambiente extracelular (Longbottom & Coulter, 2003). Esta resistencia es una consecuencia de la rigidez de la envoltura, que es osmóticamente estable y poco permeable, y también por la reducida área superficial de los CE en comparación con la de los CR. Debido a que estas bacterias son resistentes a la desecación, pueden permanecer en un estado infectivo en el ambiente por varios meses (Rodolakis & Yousef-Mohamad, 2010).

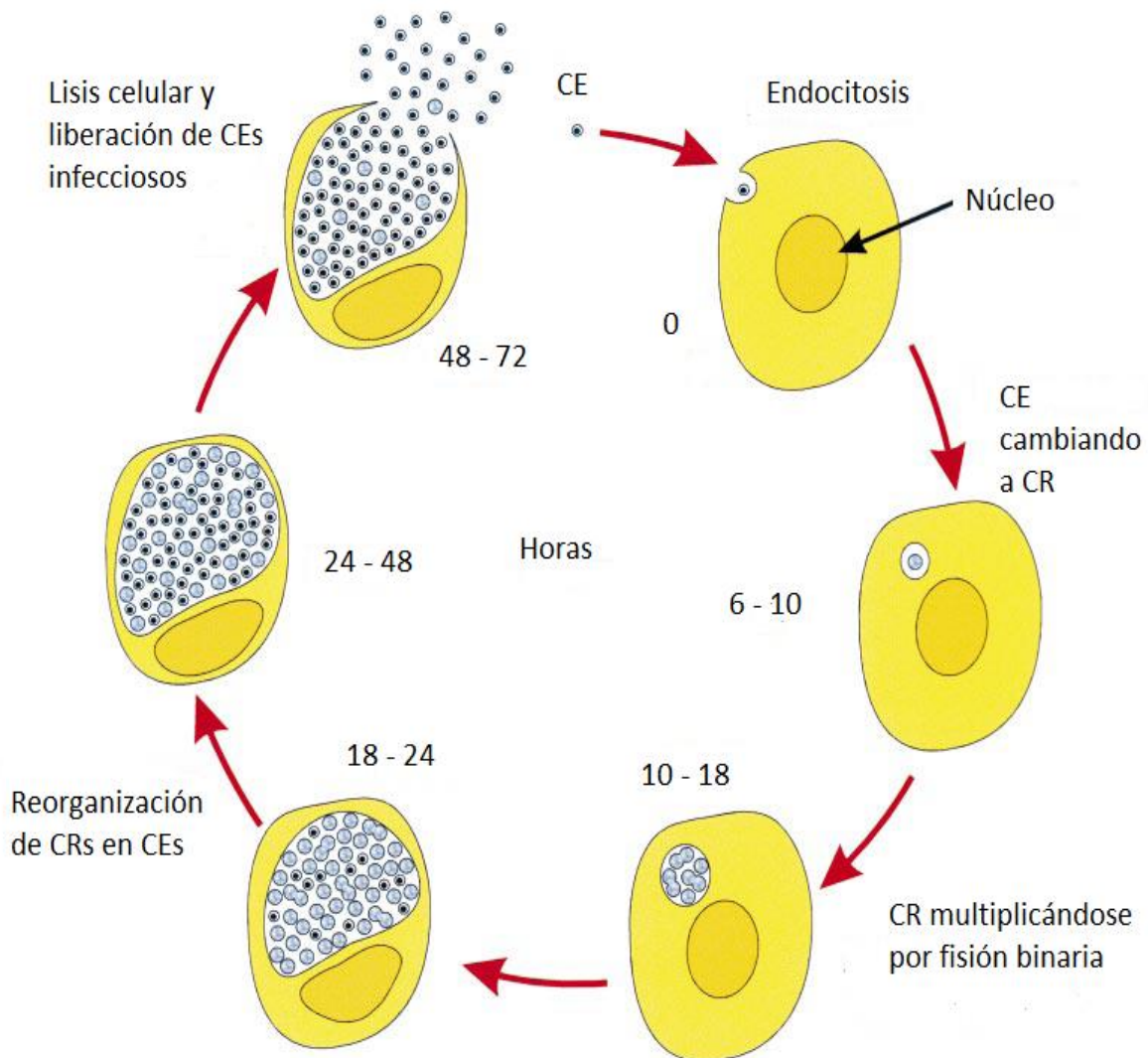


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia* spp. (Tomado de Longbottom & Coulter, 2003).

Manifestaciones clínicas

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*. Las aves asintomáticas pueden desarrollar la enfermedad bajo condiciones de estrés, tales como: hacinamiento, destrucción del hábitat, captura y condiciones inadecuadas de

comercialización. En las aves, la infección puede producir una enfermedad sistémica y ocasionalmente, puede causar la muerte. Los signos clínicos son inespecíficos y de gravedad variable. Estos dependen de la especie y la edad del ave, así como de la cepa infectante de clamidia. La clamidiosis aviar puede manifestarse con letargo, hipertermia, secreciones anormales, rinorrea y lagrimeo, y una disminución de la puesta de huevos. En las aves domésticas, los signos clínicos más frecuentes son conjuntivitis, anorexia y pérdida de peso, diarrea, deposiciones amarillentas, sinusitis, estornudo, dificultad respiratoria y biliverdinuria (Mohan, 1984). Las aves psitácidas viejas pueden ser asintomáticas; sin embargo, liberan el agente durante períodos largos de tiempo y en forma intermitente. En la necropsia las aves afectadas muestran con frecuencia esplenomegalia y hepatomegalia, inflamación fibrinosa de los sacos aéreos, pericarditis y celenitis (Andersen & Vanrompay, 2003).

En el ser humano la enfermedad varía, se reportan desde síntomas inespecíficos parecidos a una gripe hasta neumonías severas (Crosse, 1990). Los hallazgos radiológicos incluyen infiltrados lobulares o intersticiales. Asimismo, han sido reportados síntomas gastrointestinales no específicos como vómitos, dolor abdominal y diarrea. Las complicaciones que pueden presentarse, por falta de tratamiento específico son miocarditis, endocarditis, encefalitis, queratoconjuntivitis, ictericia, linfomas oculares y fallas multiorgánicas, que eventualmente producen la muerte del paciente. En mujeres embarazadas puede ocasionar neumonía, hepatitis, insuficiencia renal, sepsis, parto prematuro y muerte fetal (Longbottom & Coulter, 2003).

Ciertas cepas de *C. psittaci* infectan el ganado, causando infecciones crónicas del tracto reproductivo, insuficiencia placentaria y abortos. 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 & Coulter, 2003).

Diagnóstico

Numerosos estudios demostraron una pobre correlación de resultados obtenidos con diferentes técnicas diagnósticas (serología, técnicas moleculares y cultivo) (Hyman et al., 1995; Normann et al., 1998; Verkooyen et al., 1998; Wellinghausen et al., 2006), concluyendo que es necesario conocer con precisión la fase de infección en la que se encuentra el animal, o determinar el momento en el que se está obteniendo la muestra, para establecer la técnica diagnóstica a utilizar (Frutos 2015) (Figura 3). En la Fase 1, en el momento que aparecen los primeros signos clínicos, se recomienda el diagnóstico mediante técnicas moleculares, mientras que los anticuerpos de tipo IgM aparecerán 3 a 6 semanas posterior a la sintomatología clínica. En la Fase 2 es posible detectar anticuerpos IgM en el suero de fase aguda, mientras que los anticuerpos de tipo IgG se detectarán 6-8 semanas después de la aparición de los signos clínicos. Solamente en esta fase es posible realizar el diagnóstico mediante técnicas moleculares y serológicas. En la Fase 3 el uso de técnicas moleculares puede arrojar resultados negativos, por lo que se recomienda utilizar sueros pareados para confirmar seroconversión (Frutos, 2015).

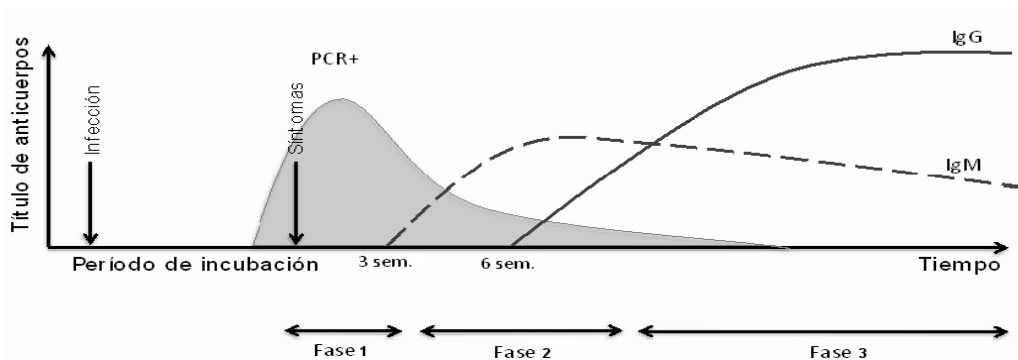


Figura 3. Dinámica de la aparición de títulos de anticuerpos y marcadores moleculares para ser detectados por técnicas de serología o de PCR (Tomado de Hvidsten et al., 2009).

El aislamiento mediante cultivo celular se considera la prueba de oro (Andersen & Franson, 2007; Andersen & Vanrompay, 2008). Las líneas celulares más frecuentemente empleadas son las BGM (células de riñón de mono verde de Buffalo), McCoy (fibroblastos de ratón común), HeLa (células humanas derivadas de

una muestra de cáncer cérvico-uterino) y Vero (riñón de mono verde africano) (Vanrompay et al., 1992). Esta técnica permite producir controles positivos puros que pueden ser empleados en el diagnóstico rutinario y para la caracterización molecular de los aislamientos. Sin embargo, debido al tiempo necesario, la dificultad y el riesgo biológico, el cultivo no es recomendado para el diagnóstico rutinario.

En cuanto a técnicas serológicas, la mayoría de los laboratorios de salud pública utilizan en casos sospechosos las pruebas de fijación de complemento o microinmunofluorescencia para la detección de anticuerpos contra *Chlamydia* spp. (National Association of State Public Health Veterinarians, 2017). Dado que tanto la fijación del complemento, como la microinmunofluorescencia requieren de sueros pareados, se consideran ensayos retrospectivos y no adecuados para un diagnóstico oportuno (Mitchell et al., 2009). El ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente introducido en formato de ensayos comerciales para el diagnóstico de la clamidiosis humana. Estos kits detectan el antígeno del LPS (antígeno de grupo) identificando todas las especies de *Chlamydiaceae*. Un inconveniente con estas pruebas es que el LPS de las clamidias comparte algunos epítomos con otras bacterias Gramnegativas, ocasionando reacciones cruzadas y dando lugar a un gran número de falsos positivos (Vanrompay et al., 1994).

El CDC define un caso confirmado de CA, si al menos se logra un resultado positivo con una de las siguientes técnicas de laboratorio:

- Aislamiento de *C. psittaci* en cultivo celular de una muestra respiratoria o de tejido de ave.
- Aumento de cuatro veces del título de anticuerpos entre dos muestras de suero, al menos con dos semanas de diferencia.
- Presencia del antígeno de *C. psittaci* identificado por PCR en una muestra de tejido o hisopado.

Por otro lado, se considera un caso probable de CA en un animal o humano cuando éste presenta signos clínicos compatibles, y se logra un resultado positivo al menos con una de las siguientes técnicas de laboratorio:

- Un solo título alto de anticuerpos en una o más muestras obtenidas después de la aparición de los signos clínicos.
- Presencia del antígeno identificado por ELISA o Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en heces, frotis de cloaca, exudados respiratorios u oculares.

Por las razones anteriormente descritas, las técnicas de PCR están reemplazando el aislamiento de clamidias en cultivo de tejidos, ya que la sensibilidad y especificidad de la PCR para *Chlamydia* spp. suele ser superior a la técnica de cultivo celular. Adicionalmente, la sensibilidad es aún mayor si se utiliza una PCR anidada o una PCR en tiempo real (qPCR). Sin embargo, la PCR anidada tiene la desventaja que si no se manipulan las reacciones con sumo cuidado existe el riesgo de contaminación, por otro lado, la qPCR presenta la desventaja de que se requiere una sonda marcada con fluorescencia y un equipo especial, lo cual aumenta sustancialmente los costos. No obstante, con la qPCR se reducen los problemas de contaminación, ya que se basa en una reacción en un sistema cerrado (Everett et al., 1999; Pantchev et al., 2009) lo cual compensa la inversión inicial.

Tratamiento y profilaxis

Existen diferentes métodos para el tratamiento de las aves con CA. Se han descrito tratamientos con tetraciclinas vía oral (25-50 mg/kg cada 24 horas por 45 días), mediante agua medicada (400 mg/L), o por vía parenteral (75-100 mg/kg, cada 5 a 7 días para las primeras 4 semanas y posteriormente cada 5 días durante la duración del tratamiento (45 días) (Smith et al., 2005). Recientemente se han añadido fluoroquinolonas y macrólidos de última generación inyectables como posibles tratamientos, sin embargo, estos se encuentran en experimentación (NASPHV, 2017).

Referencias bibliográficas

Alonso, R., Galán, J.C., Gutiérrez-Fernández, J., Rodríguez-Domínguez, M., Salinas, J., Sanbonmatsu-Gámez, S. (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

Andersen, A. & Franson, J. (2007). Avian chlamydiosis. In: Infectious diseases of wild birds. Edited by Thomas, N.; Hunter, B. and Atkinson, C. Blackwell Publishing Professionals, Ames, Iowa, USA. pp: 303-316.

Andersen, A. & Vanrompay, D. (2003). Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In Diseases of Poultry, Eds., Saif, Y.M., H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald & D.E. Swayne (editors), Ames, Iowa, State University Press, USA, 11th edition, pp. 863-887.

Andersen, A. & Vanrompay, D. (2008). Chlamydiosis. In: A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 5 edition. Edited by Dufour-Zavala, L.; Swayne, D.E.; Glisson, J.; Pearson, J.; Reed, W. and Jackwood, M. American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, USA. pp: 65-74.

Beatty, W.L., Belanger, T.A., Desai, A.A., Morrison, R.P., Byrne, G.I. (1994). Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun.* 62: 3705-11.

Beeckman, D.S. & Vanrompay, D.C. (2010). Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydophila psittaci* strains in chicken macrophages. *Vet. Microbiol.* 141: 342-353.

Crosse, B. (1990). Psittacosis: a clinical review. *Journal Infection* 21: 251-259.

CDC. (2014). Summary of Notifiable diseases-United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 61:1-121.

Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999). Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 575-580.

Frutos, M.C. (2015). Eco-epidemiología de *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*: Impacto en la Salud Pública. Tesis -Doctorado en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. 169 pp. http://lildbi.fcm.unc.edu.ar/lildbi/tesis/frutos_maria_celia.pdf

Grimes, J.E. & Wyrick, P.B. (1991). 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. pp. 311-325.

Harkinezhad, T., Genns, T. & Vanrompay, D. (2009). *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet Microbiol*; 135: 68-77.

Harrison, G.J. (1989). A practitioner's view of the problem of avian chlamydiosis. *J Am Vet Med Assoc*. 195: 1525-1528.

Horn, M. (2011). Phylum XXIV. Chlamydiae Garrity and Holt 2001, in: Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, 2nd ed., Springer, Heidelberg, pp. 843-844.

Hvidsten, D., Halvorsen, D.S., Berdal, B.P. & Gutteberg, T.J. (2009). *Chlamydophila pneumoniae* diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clin Microbiol Infect*. 15: 42-49.

Hyman, C.L., Roblin, P.M., Gaydos, C.A., Quinn, T.C., Schachter, J., Hammerschlag, M.R. (1995). Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay and culture. *Clin Infect Dis*. 20(5): 1174-1178.

Illner, F. (1962). Zur Frage der Übertragung des Ornithosevirus durch das Ei. *Monatshefte für Veterinärmedizin*. 17: 116-117.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 451: 990-993.

Kaleta, E.F. & Taday, E.M. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol*. 32: 435-461.

Knittler, M. R. & Sachse, K. (2015). *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent. *J. Pathog Dis*. 73: 1-15.

Longbottom, D. & Coulter, L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal Comparative Pathology*, 128: 217-244.

Meyer, K.F. (1967). The host spectrum of psittacosis-lymphogranuloma venereum (PL) agents. *Am J Ophthalmol*. 63: 1225-1246.

Mitchell, S.L., Wolff, B.J. & Thacker, W.L. (2009). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. *J Clin Microbiol*. 47: 175-181.

Mohan, R. (1984). Epidemiologic and laboratory observations of *Chlamydia psittaci* infection in pet birds. *J Am Vet Med Assoc*. 184: 1372-1374.

Morange, A. (1895). De la psittacose, ou infection spéciale déterminée par des perruches. PhD Thesis, Academie de Paris, Paris, France.

NASPHV (National Association of State Public Health Veterinarians). (2017). Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 31(3):000-000.

Nguyen, B.D., Cunningham, D., Liang, X., Chen, X., Toone, E.J., Raetz C.R., Zhou P., Valdivia R.H. (2011). Lipopoligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(25): 10284-10289.

Normann, E., Gnarpe, J., Gnarpe, H., Wettergren, B. (1998). *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections. *Acta Paediatr.* 87(1): 23-27.

Olsen, B., Persson, K., Broholm, K.A. (1998). PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds in Sweden. *Epidemiol Infect.* 121: 481-483.

Ritter, J. (1880). Beitrag zur Frage des Pneumotyphus [Eine Hausepidemie in Uster (Schweiz) betreffend]. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin.* 25: 53-96.

Rodolakis, A., & Yousef Mohamad, K. (2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Vet Microbiol.* 27: 140 (34): 382-391.

Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehricht, R. & Slickers, P. (2008). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BioMed Central Microbiology.* 8: 1471-2180.

Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J., Müller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P. & Ehricht, R. (2009). DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from cell culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.* 135: 22-30.

Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Ruettger, 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. *Syst Appl Microbiol.* 37(2):79-88.

Schachter, J. & Caldwell, H.D. (1980). Chlamydiae. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 285-309.

Shewen, P.E. (1980). Chlamydial infection in animals: a review. *Can Vet J.* 21(1): 2-11.

Smith, K.A., Bradley, K.K., Stobierski, M.G. & Tengelsen, L.A. (2005). Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. J. Am.Vet. Med. Assoc. 226, 532-539.

Vanrompay, D., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (1992). Diagnosis of avian chlamydiosis; specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. J. Vet. Med. 39: 105-112.

Vanrompay, D., Van Nerom A., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (1994). Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. J. Clin. Microbiol. 32: 1470-1474.

Vanrompay, D., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (1995). *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Vet Microbiol. 45: 93-119.

Vanrompay, D., Harkinezhad, T., Van De Walle, M., Beeckman, D., Van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., Leten, R., Martel, A. & Cauwerts, K. (2007). *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. Emerg. Infect. Dis. 13: 1108-1110.

Verkooyen, R.P., Willemse, D., Hiep-van Casteren, S.C., Joulandan, S.A., Snijder, R.J., van den Bosch, J.M., van Helden, H.P., Peeters, M.F., Verbrugh, H.A. (1998). Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. J Clin Microbiol. 36(8): 2301-2307.

Vorimore, F., Hsia, R., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., Sachse, K., Bavoil, P., Myers, G., Laroucau, K. (2013). Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. PLoS ONE. 8(9): e74823. doi:10.1371/journal.pone.0074823.

Wellinghausen, N., Straube, E., Freidank, H., von Baum, H., Marre, R., Essig, A. (2006). Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. Int J Med Microbiol. 296(7): 485-491.

Artículo I

Caracterización molecular de especies de *Chlamydia* en granjas avícolas comerciales y de traspatio en Costa Rica

Resumen

La clamidiosis aviar es una enfermedad ocasionada por *Chlamydia psittaci*, un agente zoonótico, el cual se ha reportado en más de 469 especies de aves, y se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Recientemente se han reportado brotes en explotaciones avícolas causados por *C. psittaci* y otras especies clamidiales, ocasionando considerables pérdidas económicas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia e identificar molecularmente las especies clamidiales presentes en aves de producción (industrial y de traspatio) de Costa Rica. Inicialmente se implementaron las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y en tiempo final (PCR) para *Chlamydia* spp. y *C. psittaci*, seguidamente se analizaron 150 grupos de muestras de tejidos pulmonares de aves de producción industrial con problemas respiratorios y 112 grupos de hisopados traqueales de aves de traspatio asintomáticas con las técnicas moleculares (qPCR, PCR y secuenciación). Un total de 16,8 % (44/262) muestras resultaron positivas a *Chlamydia* spp., sobre todo en muestras de aves de traspatio asintomáticas (28,6 %, 32/112) y en menor cantidad en aves de producción industrial (8 %, 12/150). Un 45,5 % (20/44) de estas muestras se determinaron pertenecientes a la especie *C. psittaci*. En dos pollos de producción industrial y en un pavo de traspatio se logró determinar por primera vez, a nivel latinoamericano, la presencia de *C. psittaci* genotipo A. Además, por primera vez en Costa Rica y Centroamérica, se reporta la presencia de *Chlamydia gallinacea* en pollos de traspatio y *Chlamydia muridarum* en pollos de producción industrial y de traspatio. En un 40,9 % (18/44) de los casos, sin embargo, no fue posible identificar la especie clamidial infectante. Estos hallazgos representan un riesgo potencial para trabajadores de granjas avícolas, mataderos y personas que tienen contacto con estas aves, por lo que se desea concientizar y alertar a los profesionales de la salud a considerar la clamidiosis aviar en el diagnóstico diferencial y control activo de enfermedades respiratorias en aves de producción.

Palabras clave: *Chlamydiaceae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia gallinacea*, aves de corral, Costa Rica.

Abstract

Avian chlamydiosis is a disease caused by *Chlamydia psittaci* considered a zoonotic agent, which has been reported in more than 469 species of birds and is widely distributed worldwide. Recently, outbreaks in poultry farms caused by *C. psittaci* and other chlamydial species have been reported, causing considerable economic losses. The objective of this work was to determine the presence and molecularly identify the chlamydial species present in production birds (industrial and backyard) of Costa Rica. Initially, real-time polymerase chain reaction (qPCR) and end-time (PCR) techniques were implemented for *Chlamydia* spp. and *C. psittaci*, 150 groups of lung tissue samples from industrially produced birds with respiratory problems and 112 groups of tracheal swabs from asymptomatic backyard birds were then analyzed with molecular techniques (qPCR, PCR and sequencing). A total of 16.8% (44/262) samples were positive for *Chlamydia* spp., especially samples of asymptomatic backyard birds (28.6 %, 32/112) and in lesser quantity samples of birds of industrial production (8 %, 12/150). A total of 45.5 % (20/44) of these samples were determined to belong to the species *C. psittaci*. The presence of *C. psittaci* genotype A in two industrial chickens and in a backyard turkey is reported for the first time in Latin America. In addition, *Chlamydia gallinacea* in backyard chickens and *Chlamydia muridarum* in chickens of industrial and backyard production is reported for the first time in Costa Rica and Central America. In 40.9 % (18/44) of the cases, however, it was not possible to identify the infecting chlamydial species. These findings represent a risk especially for workers of poultry farms, slaughterhouses and people who have direct contact with these birds, so it is desired to raise awareness and alert medical health professionals to consider avian chlamydiosis in the differential diagnosis and active control of respiratory diseases in production birds.

Keywords: *Chlamydiaceae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia gallinacea*, poultry, Costa Rica.

1. Introducción

La clamidiosis aviar (CA) es una enfermedad zoonótica causada por la bacteria intracelular *Chlamydia psittaci*, la cual se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial (OIE, 2018). Esta bacteria puede infectar más de 467 especies de aves y varias especies de mamíferos, incluidos los humanos (Kaleta & Taday, 2003). La patogenicidad en las aves infectadas dependerá de la especie afectada y de la cepa de *C. psittaci* infectante, ocasionando cuadros clínicos asintomáticos hasta muerte aguda (OIE, 2018). Las cepas aviares de *C. psittaci* se dividen actualmente en siete genotipos basados en la secuencia del gen *ompA* que codifica la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Sachse et al., 2009), y cada uno de los genotipos tiende a estar asociado a ciertas especies de aves. En resumen, el genotipo A se ha encontrado en aves psitácidas, el genotipo B en palomas, el genotipo C en patos y gansos, el genotipo D en pavos, el genotipo E en palomas, patos y otras aves, el genotipo EB en patos, pavos y palomas, y el genotipo F en periquitos (OIE, 2018). La mayoría de genotipos aviares también se han identificado esporádicamente en humanos, sobre todo los genotipos A, B y EB (Heddema et al., 2006; Vanrompay et al., 2007). La transmisión a los seres humanos ocurre principalmente a través de aerosoles de excreciones fecales o respiratorias de aves. A nivel mundial, la psitacosis es una enfermedad notificable en humanos y aves de compañía, y más recientemente también en aves de corral (Heijne et al., 2018). En aves de corral, los pollos y pavos inicialmente parecían ser menos susceptibles a la infección por clamidia y una fuente esporádica de infección humana (Salisch et al., 1996; Vanrompay et al. 1997; Lagae et al., 2014). Sin embargo, estudios recientes reportan más a menudo *C. psittaci* en este tipo de aves y la transmisión hacia el humano (Hulin et al., 2015; Laroucau et al., 2015; Guo et al., 2016; Cechova et al., 2018; Heijne et al., 2018, CDC, 2018).

Chlamydia psittaci se consideraba el único agente etiológico de la clamidiosis aviar; sin embargo, también se han reportado otras especies en aves, como *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* y *Chlamydia*

muridarum (Tanaka et al., 2005; Pantchev et al., 2009; Sachse et al., 2012; Guo et al., 2016). En el 2009 se detectaron dos nuevas especies, *Chlamydia gallinacea* en aves de corral y *Chlamydia avium* infectando palomas y aves psitácidas, las cuales se establecieron como nuevas especies del género *Chlamydia* por Sachse y colaboradores en 2014. Estudios recientes plantearon la hipótesis de que *C. gallinacea* es endémica en pollos y ocasiona signos clínicos leves y reducción del peso en pollos de engorde (Guo et al., 2016), mientras que las infecciones con *C. avium* se han reportado como asintomáticas (OIE, 2018). Además, se ha sugerido un potencial zoonótico de *C. avium*, sin embargo, no se ha presentado evidencia concluyente hasta la fecha (Heijne et al., 2018).

Estudios realizados en Costa Rica determinaron la presencia de anticuerpos contra *C. psittaci* en psitácidas que se encontraban en cautiverio, y la presencia de la bacteria en psitácidas y palomas que convivían en hogares y plazas públicas, respectivamente, con los costarricenses (Herrera et al., 2001; Sheleby-Elías et al., 2013; Dolz et al., 2013). Se desconoce, sin embargo, la presencia de *C. psittaci* y otras especies de *Chlamydia* en aves gallináceas, por lo que el presente trabajo planteó determinar la presencia de especies clamidiales en pollos de producción (industrial y de traspatio) de Costa Rica, las cuales podrían estar transmitiéndose al ser humano durante la manipulación y sacrificio de las aves.

2. Materiales y métodos

2.1 Tipo de estudio y población de referencia

Se analizaron dos grupos de muestras, los cuales se recolectaron en los años 2014 y 2015 en el marco del Programa de Vigilancia Epidemiológica de Salud Aviar, por el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). Para el primero se realizó un estudio no probabilístico de muestreo por conveniencia para determinar la presencia de especies de *Chlamydia* en aves gallináceas con síntomas respiratorios. Para el segundo, se efectuó un estudio probabilístico de selección aleatoria de las muestras. El primer grupo de muestras consistió de tejidos pulmonares recolectados

de pollos (*Gallus gallus domesticus*) de producción con problemas respiratorios de sistemas industrial-comerciales en la Región Central Occidental (Alajuela, Cartago, Heredia, San José) y Puntarenas, y el segundo grupo constaba de hisopados traqueales tomados de pollos y pavos (*Meleagris gallopavo*) de explotaciones de traspatio sin signos respiratorios provenientes de diferentes zonas geográficas del país (Alajuela, Cartago, Guanacaste, Heredia y Puntarenas).

2.2 Tamaño y tipo de muestra

Se analizaron 150 grupos de muestras de tejidos pulmonares de aves de 77 establecimientos de producción industrial-comercial. Cada grupo de muestra estaba conformado por tejidos pulmonares de 1 a 5 pollos de una misma granja de producción con problemas respiratorios (Grupo 1). Se escogieron muestras de aves con signos clínicos de aerosaculitis, ya que existía mayor probabilidad de encontrar el agente. Además, se analizaron un total de 112 grupos de muestras de hisopados traqueales de 25 establecimientos de aves de traspatio, para 111 grupos la muestra se conformó por hisopados de 1 a 5 pollos y un grupo de muestra se compuso de 3 hisopados de pavos, los 112 sin signos clínicos evidentes (Grupo 2). Las muestras se conservaron en frío (hielera) por un máximo de 24 horas hasta ser remitidas al laboratorio, donde se preservaron inmediatamente a una temperatura de -80°C.

2.3 Extracción de ADN muestras de aves

Para la extracción de los ácidos nucleicos se empleó el kit MagMax™ Pathogen RNA/DNA (Life Technologies, Caldsbald, USA), y se utilizó el equipo MagMax™ Express 96 (Applied biosystem, Foster City USA), procediendo según instrucciones del fabricante. Se procedió con la cuantificación y verificación de la calidad de los extractos mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

2.4 Implementación de la técnica de qPCR para la detección de *Chlamydia* spp.

Para la implementación de las técnicas se siguieron las recomendaciones dictadas por la OIE sobre la validación y el control de calidad de métodos de PCR para el diagnóstico de enfermedades infecciosas (OIE, 2008). Para optimizar la especificidad de la técnica se realizaron pruebas determinando la concentración ideal de los iniciadores y de la sonda a utilizar en el qPCR. Para determinar la sensibilidad, se analizaron diluciones seriadas en base de 10 de extractos de cultivos celulares de *C. muridarum* por triplicado. El qPCR implementado utilizó el protocolo descrito por Everett et al. (1999) para la detección del gen ARNr 23S de la familia *Chlamydiaceae* con las siguientes modificaciones: Se utilizaron los iniciadores TQF 5'-GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG-3' y TQR 5'-CTTAACTCCCTGGCTCATCATG-3'; y la sonda FAM-CAAAGGCACGCCGTCAAC-TAMRA. El volumen de la reacción (25 µL) incluyó 12.5 µL de Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix - 2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1.0 µL de cada iniciador a una concentración desde 5 hasta 20 pmol/µL (finalmente se empleó 10 pmol/µL), 0.5 µL de la sonda a concentración desde 5 hasta 20 pmol/µL (finalmente se utilizó 10 pmol/µL), 5 µL de ADN y 5 µL de agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Los pasos para la amplificación consistieron en 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto.

Una vez implementado el qPCR, se analizaron las extracciones por triplicado, como control positivo se utilizó un extracto de ADN del cultivo de la cepa patrón *C. muridarum* ATCC VR-123, donada por el Laboratorio de Chlamydias y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología, Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Todas las muestras amplificando el segmento de 130 pb y con una curva de crecimiento superando el umbral (calculado automáticamente) hasta el ciclo 35 se consideraron positivas (Everett et al. 1999).

2.5 Validación de la técnica de qPCR para la detección específica de *C. psittaci* en muestras positivas a *Chlamydia* spp.

Para implementar el protocolo de amplificación del gen *ompA* de *C. psittaci* descrito por Pantchev et al. (2009), se procedió de manera similar como con la validación del qPCR de *Chlamydiaceae* (2.4) y se implementó con las siguientes modificaciones: Se emplearon los iniciadores CppsOMP1-F (5'-CACTATGTGGGAAGGTGCTTCA-3') y CppsOMP1-R (5'-CTGCGCGGATGCTAATGG-3'); y la sonda CppsOMP1-S (5'-FAM-CGCTACTTGGTGTGAC-TAMRA-3'). Los volúmenes de reactivos y condiciones de amplificación fueron las mismas como descritas en 2.4. El control positivo utilizado correspondió a un extracto de ADN de *C. psittaci* donado por el Laboratorio de Chlamydias y Virus Papiloma Humano, Argentina. Todas las muestras amplificando un segmento de 77 pb y con una curva de crecimiento superando el umbral (calculado automáticamente) entre los primeros 36 ciclos se consideraron positivas (Pantchev et al. 2009).

2.6 Caracterización molecular y análisis filogenético comparativo de las muestras positivas a *Chlamydia* spp.

A las muestras que resultaron positivas en el qPCR a familia *Chlamydiaceae*, se les realizó una PCR convencional, para amplificar una secuencia parcial de dominios variables del gen ARNr 23S de *Chlamydia* spp. (Guo et al., 2016); esto con el objetivo de determinar la especie clamidial presente en la muestra. Se utilizaron las siguientes condiciones: el volumen de la reacción (25 µl) incluyó 12.5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), 2.0 µL de cada iniciador (23S-UP: 5'-GAGTCCGGGAGATAGACAGC-3'; 23S-DN: 5'-CATGGATCTTCACTAGTATCCGC-3') a una concentración de 10 pmol/µL, 5 µL de ADN y 3.5 µL de agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Los pasos para la amplificación consistieron en 95°C por 3 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, y una extensión final a

72°C por 5 minutos. El control positivo utilizado correspondió a un extracto de ADN de *C. psittaci* donado por el Laboratorio de Chlamydias y Virus Papiloma Humano, Argentina. Muestras con amplicones de tamaño de 329 pb se consideraron positivas. Los amplicones se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA pH 8, 0.5 M), teñidas con colorante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (0.5 µg/mL). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific). Cada producto de PCR de tamaño 329 pb fue purificado con el kit QIAquick® (QIAGEN, Venlo, Netherlands), según las indicaciones del proveedor, y enviado a Macrogen (Seoul, Corea) para su secuenciación. Las secuencias parciales se alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y se compararon mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se importaron en MEGA X (Kumar et al., 2018), utilizando el algoritmo de Jukes y Cantor (Jukes & Cantor, 1969) y el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) para el diseño del árbol filogenético. Se calcularon diez mil réplicas (Felsenstein, 1985). Secuencias de cepas de referencia de diferentes especies clamidiales (*C. gallinacea* 08-1274/3 (AWUS01000004), *C. avium* 10DC88 NR121988, *Chlamydia abortus* S26/3 (NR077001), *C. psittaci* 6BC (NR102574), *Chlamydia felis* Fe/C-56 (NR076260), *Chlamydia caviae* GPIC (NR076195), *Chlamydia pneumoniae* CWL029 (NR076161), *Chlamydia pecorum* E58 (NR103180), *Chlamydia suis* R22 (U68420), *Chlamydia trachomatis* 434/BU (NR103960) y *Chlamydia muridarum* Nigg3 (CP009760)), fueron incluidos en el análisis de filogenia.

2.7. Genotipificación y análisis filogenético de las muestras positivas a *C. psittaci*.

A las muestras que resultaron positivas en el qPCR a *C. psittaci* se les realizó un PCR anidado para amplificar el gen *ompA* y determinar el genotipo presente, siguiendo el protocolo descrito por Sachse and Hotzel (2003). Se utilizaron los iniciadores 191CHOMP (5'-GCIYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC-3') y 371 CHOMP (5'-TTAGAAICKGAATTGIGCRTTIAYGTGIGCIGC-3') en la primera ronda de amplificación, así como el par 218 PSITT (5'-GTAATTTTCIAGCCCAGCACAAATTYGTG-3') y 336 CHOMP (5'-CCRCAAGMTTTTCTRGAYTTCAWYTTGTTRAT-3') en la segunda, los cuales amplifican el dominio variable IV del gen *ompA*. En ambos PCR el volumen de la reacción (25 µL) incluyó 12.5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1.0 µL de cada iniciador a una concentración de 20 pmol/µL, 5 µL de ADN y 5.5 µL de agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Asimismo, los pasos para la amplificación consistieron en: 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Muestras que amplificaron un segmento de 389 pb se consideraron positivos. Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis, se purificaron, se enviaron a secuenciar a Macrogen (Korea) y se les realizó el análisis filogenético como se detalló anteriormente (2.6). Se emplearon las secuencias de referencia de los genotipos A (AY762608), B (AF269265), C (L25436), D (AF269266), E (X12647), F (AF269259), E/B (AY762613), M56 (AF269268) y WC (AF269269) (Sachse et al., 2008) en el análisis. El árbol fue comparado con la secuencia *ompA* de *C. caviae* como grupo externo (GPIC, GenBank AF269282) (Zhang et al., 1989)).

3. Resultados

Un total de 44 (16,8 %) de 262 muestras resultaron positivas a *Chlamydia* spp. mediante la qPCR de familia, doce (8,0 %) en el Grupo 1 (pulmones de aves de producción comercial que habían presentado problemas respiratorios) y 32 (28,6 %) en el Grupo 2 (hisopados de aves de traspatio sin signos clínicos aparentes) (Cuadro 1). El análisis de las 44 muestras positivas con el PCR convencional de *Chlamydia* spp. estableció la especie clamidial en ocho muestras (Cuadro 1). Mientras que con el qPCR de *C. psittaci*, se determinaron 20 muestras positivas, cuatro (4/44, 9,1 %) en el Grupo 1 y 16 (16/44, 36,3 %) en el Grupo 2. De las 20 muestras positivas, tres se confirmaron como *C. psittaci* mediante PCR anidado específico (Cuadro 1). No se logró determinar la especie de clamidia en 18 de ellas.

Cuadro 1. Número de muestras positivas amplificadas con diferentes PCR

	qPCR <i>Chlamydia</i> spp. +/total (%)	PCR <i>Chlamydia</i> spp. +/total (%)	qPCR <i>C. psittaci</i> +/total (%)	PCR <i>C. psittaci</i> +/total (%)	Sin identificar especie +/total (%)
Grupo 1	12/150 (8,0)	2/12 (16,7)	4/12 (33,3)	2/4 (50,0)	7/12 (58,3)
Grupo 2	32/112 (28,6)	6/32 (18,7)	16/32 (50,0)	1/16 (6,2)	11/32 (34,4)
Total	44/262 (16,8)	8/44 (18,2)	20/44 (45,5)	3/20 (15,0)	18/44 (40,9)

De las 12 muestras positivas en el Grupo 1, cuatro muestras se determinaron como *C. psittaci* mediante qPCR, y de estas, dos muestras (P1 y P30) se confirmaron mediante PCR específico de la especie y secuenciación (Cuadro 2, Figura 1). Asimismo, una de estas muestras (P1) se detectó además mediante el PCR de *Chlamydia* spp. y secuenciación como *C. psittaci* (Cuadro 3, Figura 2), mientras que otra muestra (P53) se determinó como *C. muridarum* (Cuadro 3, Figura 2). En siete muestras no se logró establecer la especie clamidial infectante (Cuadro 1).

De las 32 muestras positivas a *Chlamydia* spp. en el Grupo 2, 16 muestras se determinaron como *C. psittaci* en qPCR, y el resultado se confirmó en una de estas muestras (H27) mediante los dos PCR punto final y secuenciación (Cuadros 2 y 3, Figuras 1 y 2). Mediante PCR convencional para *Chlamydia* spp. tres muestras

(H102, H105 y H112) se determinaron como *C. gallinacea* (Cuadro 3, Figura 2) y dos muestras (H58 y H59) como *C. muridarum* (Cuadro 3, Figura 2). En 11 muestras no se pudo esclarecer cual clamidia estaba presente (Cuadro 1).

Cuadro 2. Muestras positivas para el gen *ompA* de *C. psittaci* según especie ave, tipo de producción, ubicación e identidades nucleotídicas con secuencias del GenBank

Código Muestra	Especie aviar	Tipo explotación	Provincia	Similitud nucleotídica (pb)	Cepa patrón (Código GenBank)	N° acceso*
P1	<i>Gallus gallus</i>	Industrial	Alajuela	100 % (330/330)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	2349691
P30	<i>Gallus gallus</i>	Industrial	Alajuela	100 % (330/330)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	2349692
H27	<i>Meleagris gallopavo</i>	Traspatio	Puntarenas	100 % (330/330)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	2349698

* N° provisional.

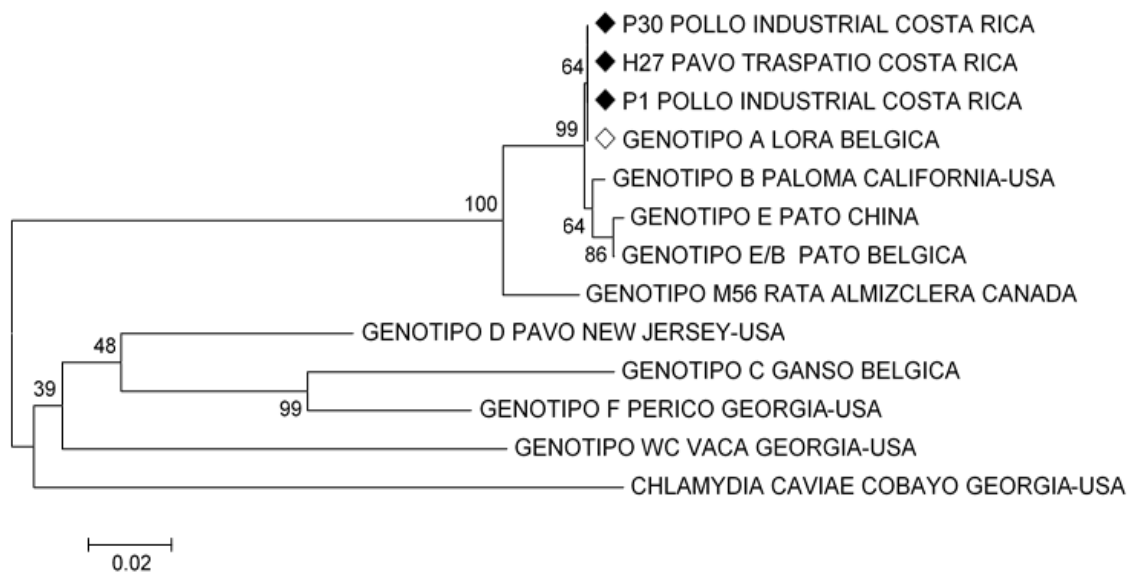


Figura 1. Dendrograma obtenido de un fragmento de 330 nucleótidos del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. psittaci*, construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. La secuencia de *C. caviae* GPIC se incluyó como grupo externo. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

Cuadro 3. Muestras positivas a *Chlamydia* spp. según especie ave, tipo de producción, ubicación e identidades nucleotídicas al PCR gen ARNr 23S con secuencias del GenBank

Código Muestra	Especie aviar	Tipo explotación	Provincia	Similitud nucleotídica (pb)	Cepa patrón (Código GenBank)	N° acceso*
P1	<i>Gallus gallus</i>	Industrial	Alajuela	99.7 % (316/317)	<i>C. psittaci</i> (NR102574.1)	2420257
P53	<i>Gallus gallus</i>	Industrial	Alajuela	99.4 % (327/329)	<i>C. muridarum</i> (CP007217.1)	2420260
H27	<i>Meleagris gallopavo</i>	Traspatio	Puntarenas	99.4 % (323/325)	<i>C. psittaci</i> (NR102574.1)	2420258
H58	<i>Gallus gallus</i>	Traspatio	Alajuela	99.4 % (327/329)	<i>C. muridarum</i> (CP007217.1)	2420261
H59	<i>Gallus gallus</i>	Traspatio	Alajuela	99.4 % (327/329)	<i>C. muridarum</i> (CP007217.1)	2420262
H102	<i>Gallus gallus</i>	Traspatio	Puntarenas	100 % (327/327)	<i>C. gallinacea</i> (MK294049.1)	2420265
H105	<i>Gallus gallus</i>	Traspatio	Puntarenas	100 % (327/327)	<i>C. gallinacea</i> (MK294049.1)	2420266
H112	<i>Gallus gallus</i>	Traspatio	Cartago	100 % (327/327)	<i>C. gallinacea</i> (MK294049.1)	2420267

* N° provisional.

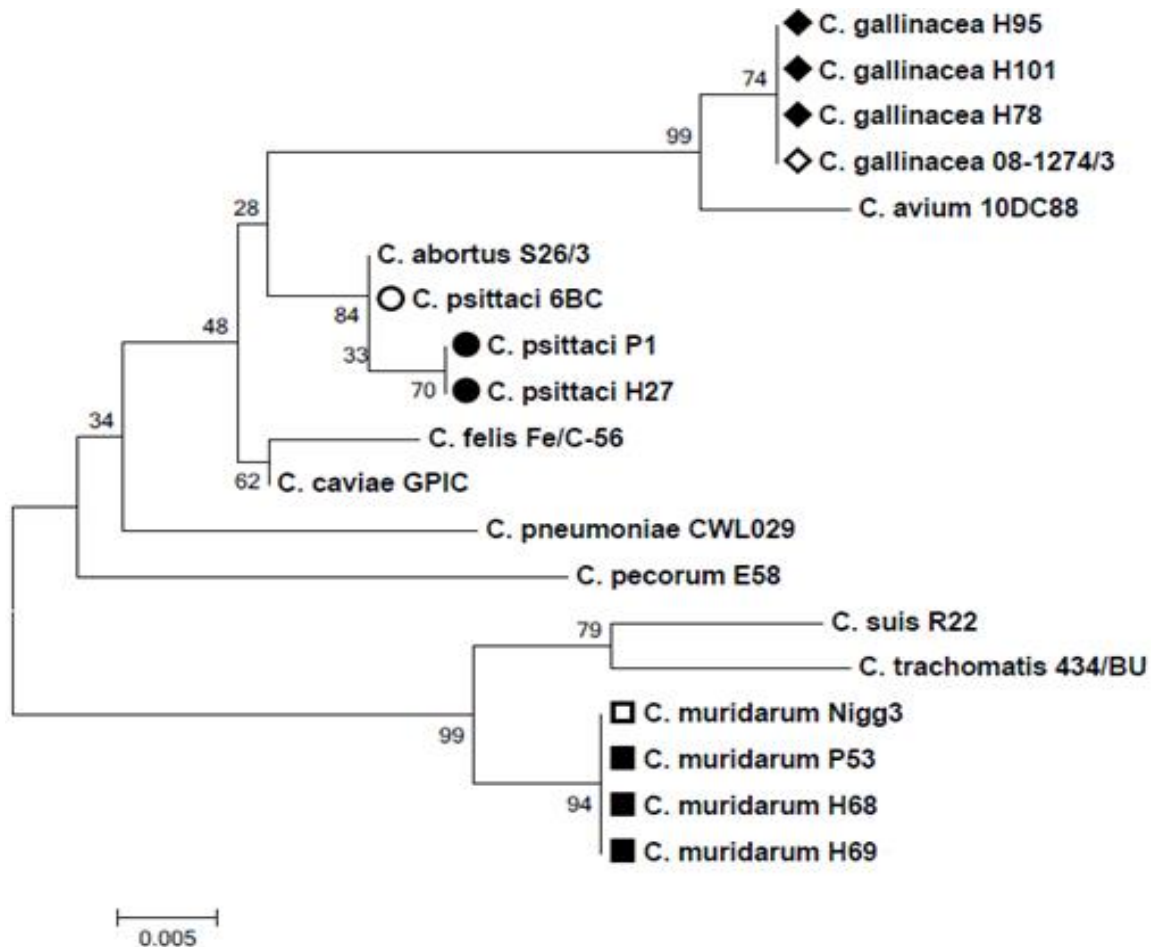


Figura 2. Dendograma obtenido de un fragmento de 317 nucleótidos de dominios variables del gen ARNr 23S de *Chlamydia* spp., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. Se muestran once cepas de referencia de *Chlamydia* spp. y las especies clamidiales encontradas en el presente estudio (viñetas negritas). Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

Las tres muestras *C. psittaci* positivas se establecieron como genotipo A y recibieron los números de acceso GenBank que se indican en el Cuadro 2. El análisis filogenético basado en el gen ARNr 23S demostró que las secuencias de las tres especies identificadas en este estudio (*C. psittaci*, *C. muridarum* y *C. gallinacea*) fueron similares (99.4 %-100 %) a secuencias de especies clamidiales depositadas en GenBank (Cuadro 3) y recibieron los números de acceso que se indican en el Cuadro 3.

La mayor cantidad de muestras *Chlamydia* positivas se encontraron en el grupo de aves de traspatio sin signos clínicos. Un 28,6 % (32/112) de estas muestras resultaron positivas, además, se encontraron positivos en un 60,0 % (15/25) de los establecimientos analizados (Cuadro 4). En contraste, en el grupo de muestras de aves provenientes de establecimientos industrial-comerciales, solamente un 8,0% (12/150) resultaron positivos, las aves positivas se determinaron en 12,9 % (10/77) de los establecimientos analizados. Las muestras positivas a *Chlamydia* spp. se encontraron sobre todo en Alajuela (33/44, 75,0 %), sin embargo, en esta provincia se recolectó también la mayor cantidad de muestras (195/262, 74,4 %). Así, todas las muestras positivas a *Chlamydia* spp. del Grupo 1 (aves industrial-comerciales) se encontraron en la provincia de Alajuela (Cuadro 4), mientras que las muestras positivas en el Grupo 2 (aves de traspatio) se encontraron sobre todo en Alajuela, pero también en Puntarenas, Cartago y Guanacaste (Cuadro 4).

La presencia de *C. psittaci* se detectó en tres establecimientos comerciales en la provincia de Alajuela, en cuatro establecimientos de aves de traspatio en Alajuela y un establecimiento de aves de traspatio de Puntarenas (qPCR *C. psittaci*) (Cuadro

2), mientras que *C. gallinaceae* se determinó en dos establecimientos de aves de traspatio en Puntarenas y uno en Cartago (Cuadro 3), y la presencia de *C. muridarum* se estableció en un establecimiento comercial y en un establecimiento de aves de traspatio de Alajuela (Cuadro 3).

Cuadro 4. Distribución de las muestras positivas a *Chlamydia* spp. por sistema de producción y ubicación

Sistema producción	Provincia	N° muestras (%)	+ qPCR (%)	Establecimientos analizados (+)	Animales analizados
Comercial (Grupo 1)	Alajuela	133 (88,7)	12 (8,0)	65 (10)	534
	Cartago	6 (4,0)	0	4 (0)	22
	Heredia	4 (2,7)	0	3 (0)	18
	San José	4 (2,7)	0	3 (0)	20
	Puntarenas	3 (2,0)	0	2 (0)	11
	Total	150 (100,0)	12 (8,0)	77 (10)	605
Traspatio (Grupo 2)	Alajuela	62 (55,4)	21 (18,7)	13 (10)	310
	Cartago	6 (5,4)	1 (0,9)	3 (1)	30
	Guanacaste	6 (5,4)	1 (0,9)	1 (1)	30
	Heredia	12 (10,7)	0	2 (0)	60
	Puntarenas	26 (23,2)	9 (8,0)	6 (3)	125
	Total	112 (100,0)	32 (28,6)	25 (15)	555
Total		262	44	102 (25)	1160

4. Discusión

El presente estudio reporta por primera vez la detección de diferentes especies de *Chlamydia* en aves gallináceas de granjas comerciales y de traspatio de Costa Rica y Centroamérica. El porcentaje de positividad determinado en granjas comerciales (8,0 %) fue mayor que lo reportado en México (3,4%), en Polonia (2,2 %) y Eslovaquia (6,9 %) (Szymańska-Czerwińska et al., 2017; Cechova et al., 2018; Ornelas-Eusebio et al., 2020), pero menor que lo encontrado en granjas avícolas comerciales de Holanda (9,8 %) y Argentina (40,3 %) (Heijne et al., 2018; Origlia et al., 2016). Asimismo, el porcentaje determinado en granjas de traspatio de nuestro

país (28,6 %) fue superior que el de otros países como Estados Unidos (13.6 %), Italia (15 %) y China (24.7 %) (Li et al., 2017; Guo et al., 2016; Donati et al., 2018), pero similar al que recientemente se reportó en México (28,6 %) (Ornelas-Eusebio et al., 2020).

En las aves de traspatio se determinó cuatro veces más muestras positivas a especies de *Chlamydia* que en muestras de aves de explotación industrial, a pesar de que fueron las últimas, las que habían mostrado signos respiratorios. Esto se puede deber a la falta de medidas de bioseguridad en los establecimientos de traspatio y la posibilidad de contacto con otros animales, principalmente con aves silvestres, que pueden transmitir el agente (Hulin et al., 2015; Vorimore et al., 2015; Ornelas-Eusebio et al., 2020). Factores como medidas de bioseguridad estrictas, buenas prácticas de limpieza y desinfección, uso de medicina preventiva (antibióticos) y buen manejo de la nutrición han demostrado reducir el riesgo de transmisión de patógenos (Sims, 2006, Hulin et al., 2015, Vorimore et al., 2015). Es de notar, el hallazgo de *C. psittaci* en aves con signos respiratorios en explotaciones comerciales. Los porcentajes de positividad determinados en los dos grupos podrían estar, sin embargo, subestimados, por un lado, porque las bacterias se excretan en forma intermitente en animales asintomáticos (Andersen & Vanrompay, 2003), por el otro lado, porque el ave generalmente excreta la bacteria por faringe o por cloaca, y no de los dos sitios (Sheleby-Elías et al., 2013 y Cechova et al., 2018).

En este estudio se logró determinar por primera vez en Costa Rica y Centroamérica *C. psittaci* en aves gallináceas de producción y de traspatio, lo que debe de alertar a los trabajadores en granjas avícolas, en mataderos y a las personas que tienen contacto directo con estas aves, sobre el riesgo de infección y de enfermarse con la bacteria. *Chlamydia psittaci* se ha determinado en pollos en Australia, Alemania, Bélgica, Francia, Eslovaquia, Italia y China (Yang et al., 2007; Gaede et al., 2008; Zhang et al., 2008; Laroucau et al., 2009; Robertson et al., 2010; Zhou et al., 2010; Dickx et al., 2010; Yin et al., 2013; Guo et al., 2016; Cechova et al., 2018; Donati et al., 2018), causando pérdidas económicas a la industria avícola debido a su reporte obligatorio (Cechova et al. 2018). Los porcentajes de infección en todos estos

países no superan el 6,9 % (Eslovaquia), en contraste a los porcentajes obtenidos en este estudio (45,5 %); sin embargo, estudios serológicos (ELISA específico de *C. psittaci*) en granjas de engorde en Bélgica determinaron seropositividades del 95 %, por lo que los porcentajes obtenidos mediante PCR pudieran estar subestimadas, debido a la excreción intermitente de la bacteria (Dickx et al., 2010). La detección del genotipo A en pollos de nuestro país concuerda con reportes de Bélgica (Van Loock et al., 2005; Lagae et al., 2014) y representa un riesgo para las personas en contacto con estas aves, ya que este genotipo se considera altamente virulento (Beeckman & Vanrompay, 2009). En los diferentes establecimientos, especialmente en los que resultaron positivos a *C. psittaci* se deberían de revisar e implementar las medidas de protección personal, que deben de incluir: protocolo de higiene de las manos y ropa protectora, uso de guantes y máscara de filtro de aire de cara completa. Debe de existir una sala de transición, donde se pueda guardar la ropa de protección, asimismo, se debe de realizar una adecuada limpieza y ventilación natural o mecánica que evite la contaminación cruzada entre los diferentes espacios (Deschuyffeleer et al., 2012).

El diagnóstico de agentes infecciosos que ocasionan problemas respiratorios en aves de producción en Costa Rica se realiza por SENASA como control activo, e incluye la enfermedad de Newcastle, la influenza aviar, la laringotraqueitis infecciosa, la bronquitis infecciosa aviar y especies de *Mycoplasma*. Un estudio reciente realizado por De Boek et al., (2015), determinó problemas de conjuntivitis, enfermedad respiratoria superior y disnea en pollos de engorde infectados con *C. psittaci*, asimismo, se estableció supresión del sistema inmune (Chu et al., 2016), por lo que se recomienda incluir la clamidiosis aviar en el diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias de aves de producción (Dickx et al., 2010, Laroucau et al., 2014, Lagae et al., 2014, Hulin et al., 2015, CDC, 2018).

Se reporta además, por primera vez en Costa Rica y Centroamérica, la presencia de *C. muridarum* (especie no zoonótica) en pollos comerciales y de traspatio. Este hallazgo se considera accidental y esporádico, posiblemente por contacto cercano de las aves con los hospederos naturales (roedores) de la bacteria (Guo et al. 2016).

Finalmente, se reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica, la presencia de *C. gallinacea* en pollos de traspatio, un agente clamidial detectado recientemente a nivel mundial, por lo que no se cuenta con mucha información. Su presencia se reporta en cuatro países europeos (Francia, Grecia, Eslovenia, Crocia), así como en China, Argentina, México y Estados Unidos (Zocevic et al., 2012; Guo et al., 2016; Origlia et al., 2016; Li et al., 2017; Ornelas-Eusebio et al., 2020). Estudios experimentales con *C. gallinacea* mostraron una reducción significativa del peso corporal (desde un 6,5 hasta a un 11,4 %) de los animales sin presentación de signos clínicos (Guo et al., 2016). Sin embargo, trabajadores de mataderos expuestos a pollos infectados con este agente, desarrollaron neumonía atípica, indicando un potencial zoonótico de *C. gallinacea* (Li et al., 2017).

Las técnicas de qPCR resultaron ser más sensibles, que las técnicas de PCR de punto final, lo que está ampliamente documentado en la literatura (DeGraves et al., 2003; Opota et al., 2015; OIE 2018). De las muestras detectadas como positivas en el qPCR de *Chlamydia* spp., un 45,4 % (20/44) se confirmaron como *C. psittaci* mediante el qPCR específico para esta especie, confirmando una presencia significativa del agente en nuestro medio (Sheleby-Elías et al., 2013; Dolz et al., 2013). Los PCR punto final para *Chlamydia* spp. y *C. psittaci*, en contraste, solo lograron detectar un 18,2 % (8/44) y un 15,0 % (3/20) de positivos detectados en los qPCR, respectivamente. En un 40,9 % (18/44) de los casos no fue posible identificar la especie clamidial infectante. Es posible, que el uso de qPCR para otras especies de *Chlamydia* (por ejemplo *C. gallinacea*) ayude a identificar las clamidias no determinadas. Estudios recientes (Hulin et al., 2015, Origlia et al., 2016; Guo et al., 2016; Li et al., 2017; Taylor-Brown & Polkinghorne, 2017; Cechova et al., 2018) han establecido la mayoría de las clamidias sin identificar como pertenecientes a *C. gallinacea* (detectadas mediante qPCR), una especie que se considera endémica y predominante en pollos.

Los resultados de este estudio demuestran la complejidad de la epidemiología de la clamidiosis aviar, y confirma, que las infecciones clamidiales en aves no sólo se deben a *C. psittaci*.

5. Conclusiones

- Se detectó la presencia *Chlamydia* spp. en 8,0 % (12/150) de muestras de aves de establecimientos industriales con sintomatología respiratoria y en un 28,6 % (32/112) de muestras de aves de traspatio sin sintomatología clínica.
- *Chlamydia psittaci* se determinó presente en un 45,5 % (20/44) de las aves de producción positivas a *Chlamydia* spp.
- Se logró determinar por primera vez en Costa Rica y a nivel latinoamericano la presencia de *C. psittaci*, genotipo A tanto en pollos como pavos de establecimientos industriales y de traspatio.
- Se detectó por primera vez en el país y en Centroamérica *C. gallinacea* en pollos de traspatio y *C. muridarum* en pollos comerciales con problemas respiratorios y pollos de traspatio.
- Se confirmó una mayor sensibilidad de la técnica de qPCR en comparación con la PCR convencional para la detección de clamidias.

6. Recomendaciones

- Alertar a personas que laboran en avicultura comercial o posean contacto con aves, sobre el riesgo de contagio con agentes clamidiales, para que tomen las medidas de bioseguridad necesarias.
- Concientizar y alertar a los profesionales de la salud para considerar a las clamidias en el diagnóstico diferencial de agentes causantes de problemas respiratorios en aves de producción.
- Concientizar y alertar al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) para que incluya el diagnóstico de clamidiosis aviar en el control activo de enfermedades respiratorias en aves de producción para evitar el contagio de las personas.
- Utilizar métodos de diagnóstico moleculares, sobre todo la técnica de qPCR por su alta sensibilidad y especificidad para determinar la presencia de especies de *Chlamydia* en aves de producción.

- Investigar la patogenicidad, el efecto en la producción y el posible potencial zoonótico de *C. psittaci* y *C. gallinacea* en aves de producción de Costa Rica.

7. Referencias Bibliográficas

Andersen, A.A., & D. Vanrompay. (2003). Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis), p. 863–879. In Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, and D.E. Swayne (ed.), Diseases of poultry. Iowa State University Press, Ames, IA.

Beeckman, D.S., & D.C. Vanrompay. (2009). Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. Clin. Microbiol. Infect. 15:11-17.

CDC. (2018). Multistate Psittacosis Outbreak Among Poultry Plant Workers. <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/surveillance-reporting/outbreaks/2018-poultry-multistateinvestigation.html>

Čechová, L., Halánová, M., Babinská, I., Danišová, O., Bartkovský, M., Marcinčák, S., Marcinčáková, D., Valenčáková, A. & Čisláková, L. (2018). Chlamydiosis in farmed chickens in Slovakia and zoonotic risk for humans. Ann Agric Environ Med. 2018; 25(2): 320-325. doi: 10.26444/aaem/82948

Chu, J., Zhang, Q., Zhang, T., Han, E., Zhao, P., Khan, A. & Wu, Y. (2016). *Chlamydia psittaci* infection increases mortality of avian influenza virus H9N2 by suppressing host immune response. Scientific Reports. 6: 29421.

De Boeck, C., Kalmar I., Dumont A. & Vanrompay D. (2015). Longitudinal monitoring for respiratory pathogens in broiler chickens reveals co-infection of *Chlamydia psittaci* and *Ornithobacterium rhinotracheale*. J. Med Microbiol. 64, 565-574.

De Graves, F.J., Gao, D., Hehnen HR, Schlapp T. & Kaltenboeck B. (2003). Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-

time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J Clin Microbiol.* 41(4):1726-1729.

Deschuyffeleer, T.P., Tyberghien, L.F., Dickx, V.L., Geens, T., Saelen, J.M., & Vanrompay, D.C. (2012). Risk assessment and management of *Chlamydia psittaci* in poultry processing plants. *Ann Occup Hyg.* 56: 340-349.

Dickx, V., Beeckman, D.S., Dossche, L., Tavernier, P. & Vanrompay, D. (2010). *Chlamydophila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. *Journal Medical Microbiology.* 59: 1348-1353.

Dolz, G., Solórzano-Morales, Á., Angelova, L., Tien, C., Fonseca, L. & Bonilla, M. C. (2013). *Chlamydia psittaci* genotype B in a pigeon (*Columba livia*) inhabiting a public place in San José, Costa Rica. *Open Veterinary Journal.* 3(2): 135-139.

Donati, M., Laroucau, K., Guerrini, A., Balboni, A., Salvatore, D., Catelli, E., Lupini, C., Levi, A. & Di Francesco, A. (2018). Chlamydiosis in backyard chickens (*Gallus gallus*) in Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 18: 222-225. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017>.

Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999). Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 575-580.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Gaede, W., Reckling, K.F., Dresenkamp, B., Kenklies, 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 Public Health.* 55: 184-188.

Guo, W., Li, J., Kaltenboeck, B., Gong, J., Fan, W., Wang, C. (2016). *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Sci. Rep.* 6: 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep19638>.

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.

Heddema, E.R., van Hannen, E.J., Duim, B., Vandenbroucke-Grauls, C.M. & Pannekoek, Z. (2006). Genotyping of *Chlamydothila psittaci* in human samples. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 1989-1990.

Heijne, M., van der Goot, J.A., Fijten, H., van der Giessen, J.W., Kuijt, E. & Maassen, C.B.M. (2018). A cross sectional study on Dutch layer farms to investigate the prevalence and potential risk factors for different *Chlamydia* species. *PLoS ONE*. 13(1): e0190774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190774>.

Herrera, I., Khan, S.R., Kaleta, E.F., Müller, H., Dolz, G. & Neumann, U. (2001). Serological status for *Chlamydothila psittaci*, *Newcastle disease virus*, *Avian polyomavirus*, and *Pacheco disease virus* in scarlet macaws (*Ara macao*) kept in captivity in Costa Rica. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*. 48: 721-726.

Hulin, V., Oger, S., Vorimore, F., Aaziz, R., de Barbeyrac, B. & Berruchon, J. (2015). Host preference and zoonotic potential of *Chlamydia psittaci* and *C. gallinacea* in poultry. *Pathogens and disease*. 73(1):1-11. doi: 10.1093/femspd/ftv005.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, Ed., Munro, H.N., Academic Press, New York, pp. 21-132.

Kaleta, E.F. & Taday E.M. (2003). Avian host range of *Chlamydothila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol*. 32: 435-461.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Lagae, S., Kalmar, I. & Laroucau, K. (2014). Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J Med Microbiol*. 63: 399-407.

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. *Infect Genet Evol.* 9 (6):1240-1247.

Laroucau, K., Aaziz, R., Meurice, L., Servas, V., Chossat, I., Royer, H., De Barbeyrac, B., Vaillant, V.L., Moyen, J., Meziani, F., Sachse, K. & Rolland, P. (2015). Outbreak of psittacosis in a group of women exposed to *Chlamydia psittaci*-infected chickens. *Eurosurveillance* 20: 1-6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.24.21155>.

Longbottom, D. & Coulter, L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal Comparative Pathology*, 128: 217-244.

Li, L., Luther, M., MacKlin, K., Pugh, D., Li, J., Zhang, J., Roberts, J., Kaltenboeck, B. & Wang, C. (2017). *Chlamydia gallinacea*: a widespread emerging *Chlamydia* agent with zoonotic potential in backyard poultry. *Epidemiol. Infect.* 145: 2701-2703. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001650>.

OIE (Office International des Epizooties). (2008). Chapter 1.1.5. Validation and quality control of PCR methods for the diagnosis of infectious disease. In *OIE Terrestrial Manual*.

OIE. (2018). Avian Chlamydiosis. In *Manual of standards for diagnostic test and vaccines*. Office International des epizooties, Paris. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>.

Opota, O., Jatou, K., Branley, J., Vanrompay, D., Erard, V., Borel, N., Longbottom, D. & Greub, G. (2015). Improving the molecular diagnosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* infection with a species-specific duplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 64, 1174-1185.

Ornelas-Eusebio, E., Garcia-Espinosa, G. & Vorimore, F. (2020). Cross-sectional study on *Chlamydiaceae* prevalence and associated risk factors on commercial and

backyard poultry farms in Mexico. *Prev Vet Med.* 176: 104922. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.104922.

Origlia, J., Cadario, E., Herrero-Loyola, M., Arias, N., Netri, C. & Unzaga, F. (2016). Detección molecular de *Chlamydia gallinacea* en aves comerciales de Argentina. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología, Rosario, Argentina. doi: 10.13140/RG.2.2.35165.92645

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. *Vet J.* 181: 145-150.

Robertson, T., Bibby, S., O'Rourke, D., Belfiore, T., Agnew-Crumpton, R. & Noormohammadi, A.H. (2010). Identification of Chlamydial species in crocodiles and chickens by PCR-HRM curve analysis. *Vet Microbiol.* 145: 373–379.

Sachse, K. & Hotzel, H. (2003). Detection and differentiation of Chlamydiae by nested-PCR. *Methods Mol Biol.* 216: 123-36. 178.

Sachse, K., Kuehlewind, S.B., Ruettger, A.A., Schubert, E.A. & Rohde, G. (2012). More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. *Vet Microbiol.* 157476-157480.

Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehrlich, R. & Slickers, P. (2008). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of ompA genes. *BioMed Central Microbiology.* 8: 1471-2180.

Sachse, K., Laroucau, K., Vorimore, F., Magnino, S., Feige, J., Müller, W., Kube, S., Hotzel, H., Schubert, E., Slickers, P. & Ehrlich, R. (2009). DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from cell culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.* 135: 22-30.

Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M. & Creasy, H.H. (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...

Saitou, N. & Nei, M.. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Salisch, H., Von Malottki, K., Ryll, M., & Hinz, K.H. (1996). Chlamydial infections of poultry and human health. Worlds Poult. Sci. J. 52, 279–308. <https://doi.org/10.1079/WPS19960021>.

Sheleby-Elías, J., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J.J. & Dolz, G. (2013). Molecular detection and genotyping of *Chlamydia psittaci* in captive Psittacines from Costa Rica. Vet. Med. Int. 142962: 1-6.

Sims, L.D. (2006). Risks associated with poultry production Systems. Poult. 21st Century. Asia Pacific Vet. Inf. Serv. Palm Cove Aust. 1-24.

Szymańska-Czerwińska, M., Mitura, A., Zaręba, K., Schnee, C., Koncicki, A. & Niemczuk, K. (2017). Poultry in Poland as *Chlamydiaceae* carrier. J. Vet. Res. 61, 411-419. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0072>.

Tanaka, C., Miyazawa, T., Watarai, M. & Ishiguro, N. (2005). Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan. J Vet Med Sci. 67: 951-953.

Taylor-Brown, A. & Polkinghorne, A. (2017). New and emerging chlamydial infections of creatures great and small. New Microbes New Infect. 18, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.04.004>.

Van Loock, M., Verminnen, K., Messmer, T. O., Volckaert, G., Goddeeris, B. M. & Vanrompay, D. (2005). Use of a nested PCR enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. BMC Infect Dis 5, 76. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-76>.

Vanrompay, D., Harkinezhad, T., Van De Walle, M., Beeckman, D., Van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., Leten, R., Martel, A. & Cauwerts, K. (2007).

Chlamydophila psittaci transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1108-1110.

Vanrompay, D., Butaye, P., Van Nerom, A., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1997). The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poults. *Vet Microbiol.* 54, 85-93.

Vorimore, F., Thébault, A., Poisson, S., Cléva, D., Robineau, J., de Barbeyrac, B., Durand, B. & Laroucau, K. (2015). *Chlamydia psittaci* in ducks: a hidden health risk for poultry workers. *Pathog. Dis.* 73, 1-9. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu016>.

Yang, J., Yang, Q., Yang, J. & He, C. (2007). Prevalence of avian *Chlamydophila psittaci* in China. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 51, 347-350.

Yin, L., Kalmar, I.D., Lagae, S., Vandendriessche, S., Vanderhaeghen, W., Butaye, P., Cox, E. & Vanrompay, D. (2013). Emerging *Chlamydia psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydia psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens. *Vet. Microbiol.* 162, 740-749.

Zhang, Z.X., Morrison, S.G., Caldwell, H.D. & Baehr, W. (1989). Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *Chlamydia psittaci* strains. *Infection Immunity* 57, 1621-1625.

Zhang, F., Li, S., Yang, J., Pang, W., Yang, L. & He, C. (2008). Isolation and characterization of *Chlamydophila psittaci* isolated from laying hens with cystic oviducts. *Avian Dis.* 52, 74-78.

Zhou, J., Qiu, C., Lin, G., Cao, X. & Zheng, F. (2010). Isolation of *Chlamydophila psittaci* from laying hens in China. *Vet Res* 3, 43-45.

Zocevic, A., Vorimore, F., Marhold, C., Horvatek, D., Wang, D., Slavec, B. (2012). Molecular characterization of atypical *Chlamydia* and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR. *Environ Microbiol.* 14: 2212-2222.

Artículo II

Especies de *Chlamydia* con potencial zoonótico en animales domésticos y silvestres de Costa Rica.

Resumen

Las especies del género *Chlamydia* son bacterias Gram negativas intracelulares que infectan una amplia gama de animales (aves, reptiles, anfibios y mamíferos, incluyendo humanos), y causan una gran variedad de enfermedades. La amplia diversidad biológica del país crea un nicho apropiado para el desarrollo de ciclos de transmisión de *Chlamydia* spp., lo que representa un peligro para las especies animales y humana. El objetivo del presente trabajo fue diagnosticar y caracterizar molecularmente las especies de *Chlamydia* presentes en animales domésticos y silvestres de Costa Rica. Se recolectó un total de 333 muestras de hisopados o tejidos de animales asintomáticos (299) o con signos clínicos (34); las cuales fueron analizadas mediante diferentes técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y punto final y secuenciación); además se implementó la técnica de aislamiento en cultivo celular. Del total de muestras analizadas, 59 (17,7 %) resultaron positivas a *Chlamydia* spp., encontrándose sobre todo en animales con enfermedad respiratoria (50% de los casos), pero también en animales asintomáticos (14 % de los casos). En aves se determinó un 13,9 % (28/201) de las muestras como positivas, en mamíferos un 25,9 % (21/81) y en reptiles un 19,6 % (10/51). La especie más frecuentemente diagnosticada fue *Chlamydia psittaci* genotipo A (22/59, 39%), encontrándose por primera vez en un gato, en un canario, en un cockatiel, en una lora, y una garza verde, aumentando así el rango de hospederos reportados en el país. Se reporta por primera vez la presencia de *Chlamydia pneumoniae* en siete serpientes (*Boa constrictor*) y de *Chlamydia suis* en cerdos. Estos hallazgos representan los primeros reportes a nivel centroamericano y latinoamericano, respectivamente. Finalmente se diagnosticó la presencia de *C. psittaci* en un hisopado faríngeo de un humano. Estos datos confirman la presencia de diversas especies de *Chlamydia* con potencial zoonótico en una gran variedad de animales domésticos y silvestres que conviven con el ser humano. En vista del riesgo que representan las clamidias para la salud pública se recomienda reglamentar e implementar medidas de bioseguridad en establecimientos de exhibición y venta de animales, y descartar *Chlamydia* spp. en problemas respiratorios de animales y humanos. Además, es importante concientizar y alertar a los profesionales de la salud y

médicos veterinarios a considerar a las clamidias en el diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias.

Palabras clave: *Chlamydiaceae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia suis*, psitacosis, Costa Rica.

Abstract

Species of the genus *Chlamydia* are intracellular Gram-negative bacteria that infect a great range of animals (birds, reptiles, amphibians, and mammals, including humans), and cause a wide variety of diseases. The broad biological diversity of the country creates an appropriate niche for the development of transmission cycles of *Chlamydia* spp., which represents a danger to animal and human species. The objective of this work was to diagnose and molecularly characterize the *Chlamydia* species present in domestic and wild animals of Costa Rica. A total of 333 swabs or tissue samples were collected from asymptomatic (299) and symptomatic (34) animals; which were analyzed by different molecular techniques (real-time and end point polymerase chain reaction and sequencing). In addition, the isolation technique in cell culture was implemented. Of the total samples analyzed, 59 (17.7%) were positive for *Chlamydia* spp., found mainly in animals with respiratory disease (50 % of cases), but also in asymptomatic animals (14 % of cases). In birds, 13.9 % (28/201), in mammals 25.9 % (21/81), and in reptiles 19.6 % (10/51) of the samples were determined as positive. The most frequently diagnosed species was *Chlamydia psittaci* genotype A (22/59, 39 %), detected for the first time in a cat, a canary, a cockatiel, a parrot, and a green heron, thus increasing the range of hosts reported in the country. *Chlamydia pneumoniae* was reported for the first time in seven snakes (*Boa constrictor*) and *Chlamydia suis* in pigs. These findings represent the first reports in Central American and in Latin America, respectively. Finally, the presence of *C. psittaci* was diagnosed in a pharyngeal swab from a human. These data confirm the presence of various species of *Chlamydia* with zoonotic potential in a wide variety of domestic and wild animals that coexist with humans. In view of the risk posed by *Chlamydia* spp. for public health, it is recommended to regulate and implement biosecurity measures in establishments for the exhibition and sale of animals, and to rule out *Chlamydia* spp. in animals and humans with respiratory disease. It is important to raise awareness and alert health professionals to consider *Chlamydia* spp. in the differential diagnosis of respiratory diseases.

Keywords: *Chlamydiaceae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia suis*, psittacosis, Costa Rica.

1. Introducción

Las infecciones zoonóticas son una progresiva amenaza para la salud mundial. *Chlamydia* es el microorganismo más ampliamente distribuido en el reino animal (Jones et al., 2008), infectando aves, reptiles, anfibios y mamíferos, incluyendo humanos, y causando una gran variedad de enfermedades. Actualmente este género comprende 13 especies (Cuadro 1) y cuatro especies candidatas (*Ca. Chlamydia ibidis*, *Ca. Chlamydia corallus*, *Ca. Chlamydia sanzinia* y *Ca. Chlamydia testudinis*). *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia abortus* ocasionan psitacosis y abortos, respectivamente, en los humanos, su potencial zoonótico está ampliamente documentado (Longbottom & Coulter, 2003; Cheong et al., 2019), pero no así el de las restantes especies clamidiales.

Cuadro 1. Especies clamidiales y enfermedades causadas en su hospedero primario y en el humano

Especies	Hospedero primario	Enfermedades en el hospedero primario*	Enfermedades en humanos
<i>Chlamydia abortus</i>	Ovinos, caprinos, bovinos y equinos	Aborto al final de la gestación o parto de un feto débil / muerto	Aborto, muerte fetal, septicemia gestacional, enfermedad pélvica inflamatoria y neumonía atípica
<i>Chlamydia avium</i>	Aves psitácidas y palomas	Problemas respiratorios	Desconocido
<i>Chlamydia caviae</i>	Cobayos	Conjuntivitis e infecciones del tracto urogenital	Conjuntivitis leve y neumonía severa adquirida
<i>Chlamydia corallus</i> / <i>Chlamydia poikilothermis</i> / <i>Chlamydia sanzinia</i> / <i>Chlamydia serpentis</i>	Serpientes	Desconocido	Desconocido
<i>Chlamydia felis</i>	Gatos	Conjuntivitis con enfermedad respiratoria e infección del tracto reproductivo superior	Conjuntivitis
<i>Chlamydia gallinacea</i>	Pollos, patos, gallinas de Guinea y pavos	Reducción del peso corporal	Neumonía atípica
<i>Chlamydia ibidis</i>	Ibis sagrado	Desconocido	Desconocido

<i>Chlamydia muridarum</i>	Roedores y pollos	Infección cervico vaginal, oclusión del oviducto, formación de hidrosalpinx en ratones	Desconocido
<i>Chlamydia pecorum</i>	Koala, ganado vacuno, ovejas, cabras, búfalos de agua, cerdos, bandicuts y palomas	Neumonía, conjuntivitis, ceguera, incontinencia urinaria, cistitis, nefritis, aborto, infertilidad, poliartritis, encefalomiелitis bovina esporádica y enteritis	Desconocido
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Humanos y una amplia gama de mamíferos y reptiles: koalas, caballos, bandicuts, serpientes, iguanas, camaleones, ranas y tortugas	Koalas: enfermedad respiratoria (estornudos, tos, congestión en el pecho, dificultad para respirar, rinitis y secreción nasal)	Neumonía, artritis reactiva, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y faringitis. Asma, cirrosis biliar primaria, arterosclerosis, artritis reactiva y cáncer de pulmón
<i>Chlamydia psittaci</i>	Aves	Conjuntivitis, rinitis, blefaritis, trastornos respiratorios, enteritis	Fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, mialgia y malestar general con o sin síntomas respiratorios.
<i>Chlamydia suis</i>	Cerdos	Trastornos respiratorios, conjuntivitis, enteritis e insuficiencia reproductiva.	Desconocido

Fuente: Cheong et al. (2019) con modificaciones.

* En todas las especies se pueden observar infecciones asintomáticas.

Costa Rica posee una amplia diversidad biológica creando un nicho adecuado para el desarrollo de diversos ciclos de transmisión de *C. psittaci* y de otras especies de *Chlamydia* en animales, representando un peligro para los animales y las personas (Jones et al. 2008). Hasta la fecha se han realizado pocos estudios sobre la presencia de diferentes especies clamidiales en animales de Costa Rica. A nivel latinoamericano sólo un estudio en Argentina ha analizado la presencia de *Chlamydia* spp. en distintos grupos de animales; el mismo determinó un 6,3 % (50/793) en aves, 41,7 % (15/36) en mamíferos y 75 % (15/20) en reptiles (Frutos, 2015). La presencia de anticuerpos contra *C. psittaci* se determinó en nuestro país por primera vez hace 20 años en un 12.4 % de 129 guacamayas (*Ara macao* y *Ara ambiguus*), las cuales se encontraban en cautiverio (Herrera et al., 2001). Posteriormente, Sheleby-Elías et al. (2013) determinaron la presencia de *C. psittaci* (genotipo A) en cuatro psitácidas que convivían en hogares con los costarricenses,

mientras que Dolz et al. (2013) detectaron la presencia de *C. psittaci* (genotipo B) en heces de una paloma (*Columba livia*) que habitaba una plaza pública de San José, en la que los niños solían alimentar a estos animales. Todos estos estudios evidenciaron el riesgo zoonótico al que están expuestas las personas que conviven y trabajan cerca de aves en nuestro país. Finalmente, Tien et al. (2014) describieron el primer posible caso de psitacosis en un adulto mayor de San José, que se contagió por contacto con sus mascotas (cockatiels) enfermas. Debido a la poca información que existe en Costa Rica y Centro América, el objetivo de la presente investigación fue detectar y caracterizar molecularmente especies clamidiales en animales domésticos (de compañía) y silvestres (en cautiverio o vida libre) de nuestro país, e implementar la técnica de cultivo celular para el aislamiento de estas bacterias.

2. Materiales y Métodos

2.1 Tipo de estudio y población de referencia

Se realizó un estudio no probabilístico y un muestreo por conveniencia para determinar la presencia de especies de *Chlamydia* en animales con y sin signos clínicos o con hallazgos histopatológicos compatibles con infecciones clamidiales. Las muestras de los animales (hisopados o tejidos) fueron remitidas por el Hospital de Especies Menores y Silvestres (HEMS) de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA), el Laboratorio de Patología Aviar de la EMV-UNA, estudiantes de la EMV-UNA, cinco Centros Médicos Veterinarios (uno en Heredia, cuatro en San José), cuatro Centros de Rescate y Zoológicos (dos en Alajuela, uno en Guanacaste y uno Puntarenas), una finca ganadera en Alajuela, una finca porcina en Alajuela, y una finca ovina en San José. Asimismo, se visitaron tres Centros de Rescate y Zoológicos (uno en Alajuela y dos en San José).

2.2 Tamaño y tipo de muestras recolectadas de los animales

Se analizaron un total de 333 muestras de mamíferos, aves y reptiles (Cuadro 2). Un total de 34 muestras provenían de animales con sintomatología compatible con infecciones clamidiales, mientras que 299 muestras de animales asintomáticos (Cuadro 2). La descripción de los 333 animales analizados, como especie animal, modo de vida (doméstico o silvestre), tipo de vida (compañía, producción, vida libre o cautiverio) y procedencia se muestra en el Anexo 1.

Cuadro 2. Número de aves, mamíferos y reptiles sintomáticos y asintomáticos analizados y tipo de muestras analizadas

Animales	Tipo muestra	Aves	Mamíferos	Reptiles	Total
Sintomáticos	Hc	-	-	-	0
	Hf	-	1*	-	1
	Hc+Hf	7	-	-	7
	Hco	-	11	-	11
	H	7	-	-	7
	T	8	-	-	8
Subtotal		22	12	0	34
Asintomáticos	Hc	122	-	47	169
	Hc+Hf	45	-	-	45
	Ha	-	42	-	42
	Hco	-	10	-	10
	Hv	-	17	-	17
	H	1	-	4	5
	T	11	-	-	11
Subtotal		175	69	51	299
Total		201	81	51	333

Hc: hisopado cloacal; Hf: hisopado faringeal; Hco: hisopado conjuntival; H: heces; T: tejidos de sacos aéreos; Ha: hisopado anal; Hv: hisopado vaginal; * Muestra tomada a un veterinario.

Las muestras se tomaron de forma aséptica, en 1 mL de medio de transporte Sacarosa-Fosfato-Glutamato (SPG) (Anexo 2) para mantener la infectividad de las clamidias durante el envío y el almacenamiento (Spencer & Johnson, 1983) (Anexo 2). Las muestras se conservaron en frío (hielera), y se remitieron al laboratorio, donde fueron resuspendidas por agitación con vortex, seguidamente se retiró el hisopo y se fraccionó en dos alícuotas. Una alícuota de 200 µL se sometió inmediatamente a análisis molecular, muestras que resultaron positivas se sometieron a aislamiento mediante cultivo celular, para eso se utilizó la segunda alícuota de 200 µL almacenada a -80°C hasta su procesamiento.

2.3 Análisis molecular

Para la extracción de los ácidos nucleicos se empleó el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Venlo, Netherlands), procediendo según instrucciones del fabricante. Se continuó con una cuantificación y verificación de la calidad de los extractos mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Luego se analizaron las muestras mediante PCR en tiempo real (qPCR) para *Chlamydia* spp., utilizando el protocolo descrito por Everett et al. (1999). Muestras que resultaron positivas se sometieron a un segundo qPCR para la detección de *C. psittaci* siguiendo el protocolo de Pantchev et al. (2009). El volumen de la reacción (25 µL) incluyó 12.5 µL de Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix-2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), cada iniciador a una concentración final 400 nM, la sonda a concentración final de 200 nM, 5 µL de ADN y 5 µL de agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Los pasos para la amplificación consistieron en 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Todas las muestras amplificando los segmentos esperados y con una curva de crecimiento superando el umbral (calculado automáticamente) entre los primeros 35 ciclos se consideraron positivas (Everett et al., 1999, Pantchev et al., 2009) (Cuadro 3). Como controles positivos se utilizaron un extracto de ADN del cultivo de la cepa patrón *C. muridarum* ATCC VR-123 y un extracto de ADN de *C. psittaci*, donados por el Laboratorio de Chlamydias y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología, Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Además, se utilizaron los siguientes protocolos de PCR convencionales para caracterización de las muestras positivas: PCR para amplificación de una secuencia parcial de dominios variables del gen ARNr 23S (Guo et al., 2016) para detectar *Chlamydia* spp., PCR anidados para amplificación del dominio variable IV del gen *ompA* (Sachse & Hotzel, 2003), de las especies *C. psittaci* / *C. abortus* y *C. pecorum*. Además, dos PCR anidados para *C. pneumoniae*, uno amplificando el segmento PstI del gen *rpoB* (Campbell et al., 1998; Maass et al., 1998) y el otro, el dominio variable IV del gen *ompA* para la genotipificación de las muestras positivas a esta especie (Bodetti et al., 2002) (Cuadro 3).

Los volúmenes (25 µL) de las reacciones (convencional o anidado) incluyeron 12.5 µL de Dream Taq™ PCR Master Mix-2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), cada iniciador a una concentración final de 800 nM, 5 µL de ADN y 5.5 µL de agua grado biología molecular (Thermo Scientific). Asimismo, los pasos para la amplificación consistieron en: 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C (ARNr 23S) // 55°C (*ompA C. psittaci/C. abortus/C. pecorum*) // 53°C (*rpoβ C. pneumoniae*) // 60°C (*ompA C. pneumoniae*), 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 voltios durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific). Cada producto de PCR fue purificado con el kit QIAquick® (QIAGEN, Venlo, Netherlands), según las indicaciones del proveedor, y enviado a Macrogen (Seoul, Corea) para su secuenciación. Las secuencias parciales se alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y se compararon mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se importaron en MEGA 10 (Kumar et al., 2018), utilizando el algoritmo de Jukes y Cantor (Jukes & Cantor, 1969) y el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) para el diseño de los cladogramas filogenéticos sobre el cálculo de diez mil réplicas (Felsenstein, 1985). Secuencias de cepas de referencia de diferentes especies clamidiales fueron incluidos en los análisis de filogenia para cada gen.

Cuadro 3. Protocolos de PCR en tiempo real (qPCR) y punto final (convencional o anidado) empleados para caracterización de diferentes especies clamidiales.

Especie clamidial	Gen (método)	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Pares bases	Protocolo
<i>Chlamydia</i> spp.	ARNr 23S (qPCR)	TQF TQR TQS	GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG CTTAACCTCCCTGGCTCATCATG FAM-CAAAGGCACGCCGTCAAC-TAMRA	132	Everett et al., 1999
<i>C. psittaci</i>	<i>ompA</i> (qPCR)	CppsOMP1-F CppsOMP1-R CppsOMP1-S	CACTATGTGGGAAGGTGCTTCA CTGCGCGGATGCTAATGG FAM-CGCTACTTGGTGTGAC-TAMRA	77	Pantchev et al., 2009
<i>Chlamydia</i> spp.	ARNr 23S (PCR)	23S-UP 23S-DN	GAGTCCGGGAGATAGACAGC CATGGATCTTACTAGTATCCGC	329	Guo et al., 2016
<i>C. psittaci</i> / <i>C. abortus</i>	<i>ompA</i> (PCR anidado)	191CHOMP 371 CHOMP 218 PSITT 336 CHOMP	GCIYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC TTAGAAICKGAATTGIGCRTTIAYGTGIGCIGC GTAATTTIAGCCCAGCACAAATTYGTG CCRCAAGMTTCTRGAYTTCAWYTTGTTRAT	389	Sachse & Hotzel, 2003
<i>C. pecorum</i>		191CHOMP 371 CHOMP 204 PECOR 336 CHOMP	GCIYTITGGGARTGYGGITGYGCIAC TTAGAAICKGAATTGIGCRTTIAYGTGIGCIGC CCAATAYGCACAATCKAAACCTCGC CCRCAAGMTTCTRGAYTTCAWYTTGTTRAT	441	
<i>C. pneumoniae</i>	<i>rpoB</i> (PCR anidado)	HL1 HR1 N1 N2	GTTGTTTCATGAAGGCCTACT TGCATAACCTACGGTGTGTT AGTTGAGCATATTCGTGAGG TTTATTTCCGTGTCGTCCAG	128	Campbell et al., 1998 Maass et al., 1998
<i>C. pneumoniae</i>	<i>ompA</i> (PCR anidado)	Cpn5P Cpn3P Cpn5N Cpn3N	CCAATATGCACAGTCCAAACCTAAAA CTAGATTTAAACTTGTGATCTGACAG CTCTGTAAACAACCGGGC GATCTGACAGGAAACAATTTGCAT	279	Bodetti et al., 2002
<i>C. psittaci</i>	<i>ompA</i> (PCR)	CPsittGenoFor CPsittGenoRev	GCTACGGGTTCCGCTCT TTTGTGATYTGAAATCGAAGC	1041	Heddema et al., 2006

2.4 Implementación de la técnica de cultivo celular para el aislamiento de *Chlamydia* spp.

Un total de 24 muestras que resultaron positivas a *Chlamydia* spp. en qPCR, se sometieron a aislamiento de la bacteria mediante cultivo celular. Las muestras se descontaminaron antes de ser inoculadas en el cultivo celular de la siguiente

manera: la muestra se descongeló y se agregó 5 ml de solución descontaminante (Andersen & Vanrompay, 2008) durante 24 horas a 5°C, seguido de centrifugación a 1000g por 10 minutos. Después de la centrifugación se eliminó la capa superficial y el sedimento, y se recogió el sobrenadante, el cual se volvió a centrifugar 1000g por 10 minutos. El sobrenadante final se utilizó para la inoculación. Muestras que no fueron posible descontaminar con este método, se pasaron por un filtro con un tamaño de poro medio de 0,45 µm (OIE, 2013). Para el aislamiento de clamidias se usó la línea celular LLC-MK2 (células de riñón de mono Rhesus (*Macaca mulatta*), ATCC, CCL-7). Esta línea celular se mantuvo creciendo y repicaba cada 5 días, se utilizó para inocular o para congelar las bacterias. En el Anexo 2 se describen las soluciones utilizadas y se detalla la metodología utilizada para el cultivo celular de las clamidias. Brevemente, las células se sembraron en medio de cultivo con antibióticos (Anexo 2); hasta formar una monocapa con 100 % de confluencia (1.10^5 cels/mL) en aproximadamente 24 horas. Se inoculó 0.6 mL de la muestra descontaminada sobre la monocapa de células en placas de cultivo de 24 pozos por duplicado, se centrifugó 620 x g durante 60 minutos a 37°C, luego se eliminó el inóculo y se reemplazó por medio de infección (Anexo 2) conteniendo cicloheximida 1 ug/mL, e incubó a 37°C por 2 horas. Finalmente, se reemplazó por medio de cultivo (Anexo 2) e incubó a 37°C con 5 % CO². Los cultivos se examinaron diariamente para detectar el crecimiento de las clamidias. Los cultivos negativos se inocularon al quinto día en medio nuevo, realizando como máximo 3 pasajes (cada pasaje consistió en realizar un raspado de las células con la punta de la micropipeta e inocular 0.6 mL del raspado en un pozo con medio nuevo y continuar con lo descrito). Se consideró un aislamiento como positivo cuando se visualizó al menos 3 inclusiones citoplasmáticas por pozo (Cuffini com. pers., 2016)). La confirmación de los aislamientos mediante tinción con Naranja de Acridina al 1 % (Anexo 2) y visualización en Microscopio de Inmunofluorescencia o detección mediante PCR.

2.7.1 Caracterización genotípica y análisis filogenético de aislamientos de *Chlamydia psittaci*.

Las células de cuatro aislamientos positivos se desprendieron por acción física de los pozos de cultivo y se sometieron a extracción de ADN con el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Venlo, Netherlands), como previamente descrito. Seguidamente se sometieron al análisis molecular de secuencias del gen *ompA* de *Chlamydia psittaci*, abarcando los cuatro dominios variables (Heddema et al., 2006). El volumen de la reacción fue como descrito en 2.3. Los pasos para la amplificación consistieron en: 95°C por 10 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto), extensión (72°C por 1 minuto) y una extensión final a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue visualizado en electroforesis, purificado, secuenciado y analizado filogenéticamente como anteriormente detallado (2.3). Secuencias de referencia de los genotipos A (AY762608), B (AF269265), C (L25436), D (AF269266), E (X12647), F (AF269259), E/B (AY762613), M56 (AF269268) y WC (AF269269) (Sachse et al., 2008) se incluyeron en el análisis. El árbol se comparó con la secuencia *ompA* de *C. caviae* (GPIC, GenBank AF269282) (Zhang et al., 1989).

3. Resultados

De un total de 333 muestras analizadas, 59 (17,7 %) resultaron positivas a *Chlamydia* spp. Las muestras positivas correspondieron a 29 animales domésticos (11 sintomáticos (incluyendo un médico veterinario) y 18 asintomáticos) y 30 animales silvestres (seis sintomáticos y 24 asintomáticos). Del total de animales domésticos positivos, 12 eran animales de compañía y 17 animales de producción, mientras que 29 de los animales silvestres positivos vivían en cautiverio y solo un animal provenía de vida libre, aunque se encontró en estado enfermo en un área urbana. En cuanto a grupos de animales, 13,9 % (28/201) de las muestras positivas se detectaron en aves, 25,9 % (21/81) en mamíferos y 19,6 % (10/51) en reptiles.

La mayoría de los animales positivos, provenían de Alajuela (29) y San José (21); cuatro de Guanacaste, tres de Puntarenas y dos de Heredia (Cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de los animales positivos a *Chlamydia* spp.

Especie (nombre común) (1)	Hallazgos histopatológicos o signos clínicos	Muestra	Procedencia	Modo vida	Tipo vida	Resultado (4)
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 1)	Sacos aéreos con exudado caseoso, esplenomegalia, hepatomegalia, focos necróticos en pulmón. ²	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela ³	Silvestre	Cautiverio	<i>C. psittaci</i>
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 2)	Hepatomegalia, secreción faríngea, esplenomegalia, hidropericardio, secreción espumosa en pulmones, puntos necróticos pancreáticos, nefromegalia. ²	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela ³	Silvestre	Cautiverio	<i>C. psittaci</i>
<i>Ara macao</i> (Lapa roja 1)	Hepatomegalia, lesiones en páncreas, buche con mucha dilatación, sacos aéreos con fibrina, estómago con ulceraciones, nefromegalia. ²	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela ³	Silvestre	Cautiverio	<i>C. psittaci</i>
<i>Ara macao</i> (Lapa roja 3)	Dificultad respiratoria	Hisopado cloacal y faríngeal	Centro Rescate Alajuela	Silvestre	Cautiverio	<i>C. psittaci</i>
<i>Butorides virescens</i> (Garza verde)	Hepatomegalia, exudados caseosos en sacos aéreos, esplenomegalia, cardiomegalia ²	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela ³	Silvestre	Cautiverio	<i>C. psittaci</i>
<i>Leptotila verreauxi</i> (Paloma titibú)	Hepatomegalia, neumonía y aerosaculitis ²	Sacos aéreos	Plaza pública San José	Silvestre	Vida libre	<i>C. psittaci</i>
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel)	Cardiomegalia, neumonía y aerosaculitis ²	Sacos aéreos	Hogar Heredia	Doméstico	Compañía	<i>C. psittaci</i>
<i>Felis catus</i> (Gato)	Secresiones nasales y conjuntivitis ²	Hisopado conjuntival y nasal	Hogar San José	Doméstico	Compañía	<i>C. psittaci</i>
<i>Felis catus</i> (Gato) (8)	Secresiones nasales ²	Hisopado nasal	Hogar Alajuela	Doméstico	Compañía	<i>Chlamydia</i> spp. (2)
<i>Homo sapiens</i> (Humano) (3)	Dificultad respiratoria, dolor de cabeza, malestar generalizado	Hisopado faríngeal	Alajuela			<i>C. psittaci</i>
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo) (7)	Conjuntivitis	Hisopado conjuntival	Finca Alajuela	Doméstico	Producción	<i>C. suis</i> (7)
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde) (61)	Asintomáticas ²	Hisopado cloacal y faríngeal	Centro Rescate Guanacaste	Silvestre	Cautiverio	<i>Chlamydia</i> spp. (2)

<i>Ara macao</i> (Lapa roja) (73)	Asintomáticas ²	Hisopado cloacal y faringeal	Zoológico Alajuela (8)	Silvestre	Cautiverio	<i>Chlamydia</i> spp. (4), <i>C. psittaci</i> (4)
			Centro Rescate Guanacaste (2)			<i>Chlamydia</i> spp. (2).
<i>Serinus canaria</i> (Canario) (2)	Asintomático ²	Heces	Hogar Heredia	Doméstico	Compañía	<i>C. psittaci</i>
<i>Amazona autumnalis</i> (Lora) (3)	Asintomática	Hisopado cloacal	Hogar Alajuela	Doméstico	Compañía	<i>C. psittaci</i>
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel) (4)	Asintomático	Hisopado cloacal	HEMS (Hogar San José)	Doméstico	Compañía	<i>C. psittaci</i>
<i>Columba livia</i> (Paloma mensajera) (32)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Hogar San José	Doméstico	Producción	<i>C. psittaci</i> (5)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelicano) (2)	Asintomático	Hisopado cloacal	Zoológico Puntarenas	Silvestre	Cautiverio	<i>Chlamydia</i> spp.
<i>Aterelix albiventris</i> (Erizo africano) (7)	Asintomático ²	Hisopado cloacal	Hogar San José	Doméstico	Compañía	<i>Chlamydia</i> spp. (3)
<i>Bos Taurus</i> (Vaca) (4)	Asintomáticas ²	Hisopado vaginal	Finca Alajuela	Doméstico	Producción	<i>Chlamydia</i> spp. (4)
<i>Ovis aries</i> (Oveja) (12)	Asintomática ²	Hisopado vaginal	Finca San José	Doméstico	Producción	<i>Chlamydia</i> spp.
<i>Equus caballus</i> (Caballo) (13)	Asintomáticos ²	Hisopado conjuntival	San José	Doméstico	Compañía	<i>Chlamydia</i> spp. (3)
<i>Boa constrictor</i> (Boa) (7)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Zoológico San José	Silvestre	Cautiverio	<i>C. pneumoniae</i> (7)
<i>Trachemys</i> spp. (Tortuga)	Asintomática ²	Heces	Hogar Alajuela	Silvestre	Cautiverio	<i>Chlamydia</i> spp.
<i>Trachemys scripta</i> (Tortugas) (2)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Zoológico Puntarenas	Silvestre	Cautiverio	<i>Chlamydia</i> spp. (2)

(¹) Número de animales analizados, en caso de haberse analizado más de un animal; ² Tejidos o hisopados a los que se les realizó cultivo celular ³Zoológico Alajuela en el que laboraba el médico veterinario que resultó positivo a *C. psittaci*; ⁴Número de animales que resultaron positivos.

Un 50.0 % de las muestras de animales sintomáticos resultaron positivas mientras que un 14,0 % de animales asintomáticos fueron positivos a *Chlamydia* spp. (Cuadro 5). El análisis de las 59 muestras positivas a *Chlamydia* spp. mediante qPCR de *C. psittaci* determinó 23 muestras positivas, nueve provenientes de animales sintomáticos y 14 de asintomáticos (Cuadro 5). De estas 23 muestras positivas, 11 se confirmaron como *C. psittaci* mediante PCR convencional (Cuadro 5), mientras que con el PCR (23S) de *Chlamydia* spp. se detectaron especies clamidiales en 15 muestras. Todas las 59 muestras resultaron negativas para *C. pecorum* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de muestras positivas detectadas con diferentes PCR

Análisis	Animales Sintomáticos	Animales Asintomáticos	Total
qPCR 23S <i>Chlamydia</i> spp. +/total (%)	17/34 (50,0)	42/299 (14,0)	59/333 (17,7)
qPCR <i>ompA</i> <i>C. psittaci</i> +/total (%)	9/17 (52,9)	14/42 (33,3)	23/59 (39,0)
PCR <i>ompA</i> <i>C. psittaci</i> +/total (%)	8/9 (88,8)	3/14 (21,4)	11/23 (43,8)
PCR <i>ompA</i> <i>C. pecorum</i> +/total (%)	0/17 (0)	0/42 (0)	0/59 (0)
PCR 23S <i>Chlamydia</i> spp. +/total (%)	13/17 (76,5)	2/42 (4,8)	15/59 (25,4)
PCR <i>rpoB</i> <i>C. pneumoniae</i> +/total (%)	0/17 (0)	7/42 (16,7)	7/59 (11,9)
PCR <i>ompA</i> <i>C. pneumoniae</i> +/total (%)	0/0 (0)	7/7 (100)	7/7 (100)
Sin identificar especie	1/17 (5,9)	15/42 (35,7)	16/59 (27,1)

De las 17 muestras positivas de animales sintomáticos, ocho se confirmaron como *C. psittaci* mediante PCR específico (Cuadro 6, Figura 1), seis se detectaron además mediante el PCR ARNr 23S de *Chlamydia* spp. como *C. psittaci* (Cuadro 7, Figura 2) y siete muestras se determinaron como *C. suis* (Cuadro 7, Figura 2). En una muestra no se logró la amplificación por PCR convencional y secuenciación para establecer la especie clamidial infectante (Cuadro 5 y Cuadro 7).

En cuanto a los animales sin sintomatología aparente, se logró identificar en tres muestras *C. psittaci* (Cuadro 6, Cuadro 7, Figura 1, Figura 2) y en siete muestras *C. pneumoniae* (Cuadro 5 y Cuadro 8). En 16 muestras de animales asintomáticos no se pudo determinar la especie clamidial (Cuadro 5), 15 de ellas no fueron amplificables mediante PCR convencional y la única que se logró amplificar mediante el PCR ARNr 23S de *Chlamydia* spp. (Cuadro 7, Figura 2) no se logró secuenciar.

Con respecto a la genotipificación de las muestras positivas a *C. psittaci*., la secuenciación parcial del gen *ompA* y análisis molecular de filogenia determinó que 10 muestras pertenecieron al genotipo A y una muestra al genotipo B (Cuadro 6, Figura 1). Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del GenBank y recibieron los números de acceso que se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Identidades nucleotídicas y números de acceso de las secuencias del gen *ompA* de *C. psittaci* depositados en Gen Bank de muestras determinadas como positivas en diferentes especies de animales de Costa Rica

Especie (nombre común)	Signos clínicos	Similitud nucleotídica (pb)	Cepa patrón (Código GenBank)	Genotipo	N° acceso*
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 1)	Sintomático	100,0 % (329/329)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420270
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 2)	Sintomático	100,0 % (329/329)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420271
<i>Ara macao</i> (Lapa roja 1)	Sintomático	100,0 % (329/329)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420272
<i>Butorides virescens</i> (Garza verde)	Sintomático	100,0 % (329/329)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420273
<i>Felis catus</i> (Gato)	Sintomático	99,4 % (325/327)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420278
<i>Leptotila verreauxi</i> (Paloma titibú)	Sintomático	100,0 % (324/324)	<i>C. psittaci</i> (AF269265)	B	2420280
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel 1)	Sintomático	99,7 % (328/329)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420270
<i>Homo sapiens</i> (Humano)	Sintomático	100,0 % (329/329)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420274
<i>Amazona autumnalis</i> (Lora)	Asintomático	100,0 % (313/313)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420275
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel 2)	Asintomático	100,0 % (298/298)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420276
<i>Serinus canaria</i> (Canario)	Asintomático	99,7 % (324/325)	<i>C. psittaci</i> (X56980)	A	2420277

* N° provisional.

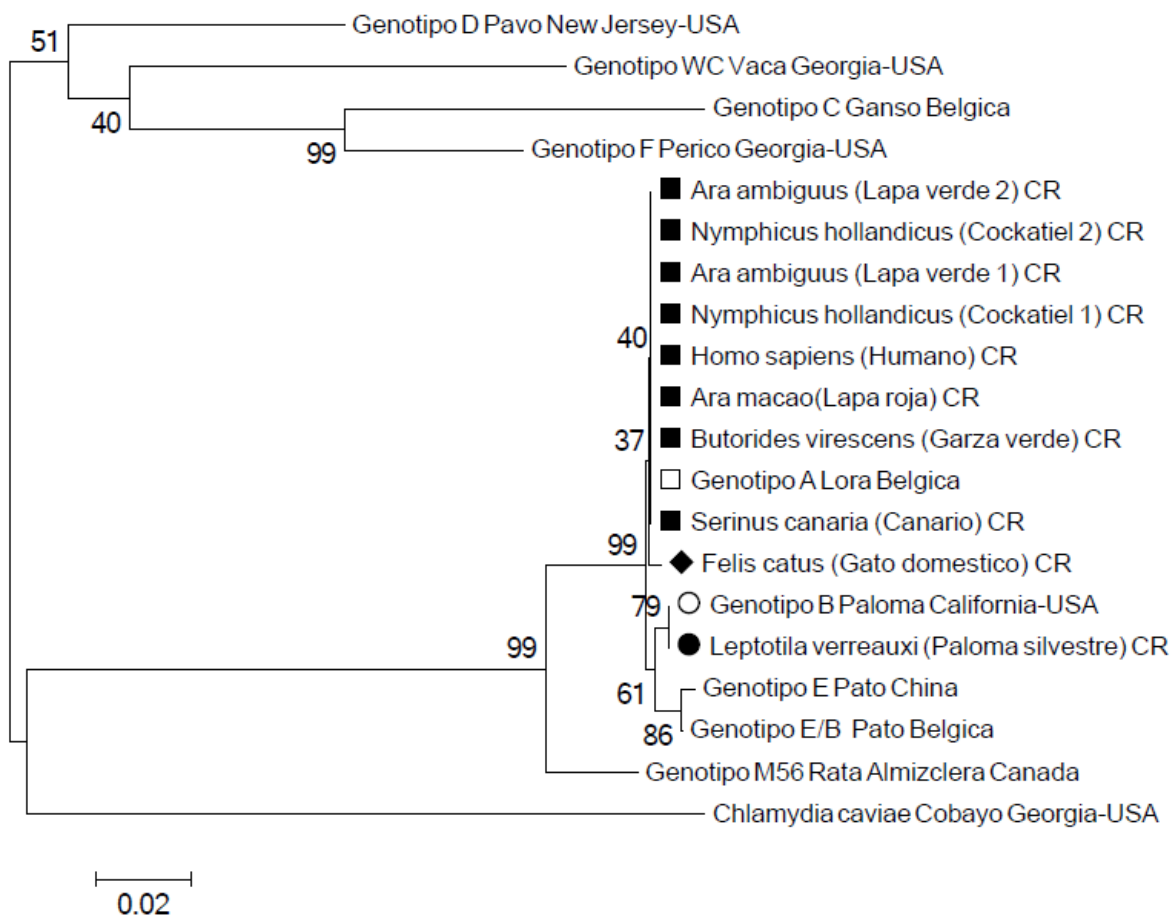


Figura 1. Dendograma obtenido de un fragmento de 298 nucleótidos del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. psittaci*., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. La secuencia de *C. caviae* GPIC (GenBank AF269282) se incluyó como grupo externo. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

El análisis filogenético basado en el gen ARNr 23S demostró que las secuencias de dos especies identificadas en esta investigación (*C. suis* y *C. psittaci*) fueron altamente similares (99,7 %-100 %) a secuencias de estas especies clamidiales presentes en GenBank (Cuadro 7); a excepción de una muestra de un erizo (*Aterelix albiventris*) que se logró amplificar y secuenciar, pero no se logró establecer la especie clamidial. Todas las secuencias se depositaron en el GenBank (Cuadro 7).

Cuadro 7. Identidades nucleotídicas y números de acceso de las secuencias del gen ARNr 23S de *Chlamydia* spp. depositados en Gen Bank de muestras determinadas como positivas en diferentes especies de animales de Costa Rica

Especie (nombre común)	Signos clínicos	Similitud nucleotídica (pb)	Cepa patrón (Código GenBank)	Nº acceso*
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 1)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.1
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 2)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.2
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 3)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.3
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 4)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.4
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 5)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.5
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 6)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.6
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo 7)	Sintomático	99.7 % (323/324)	<i>C. suis</i> (U68420.1)	2420282.7
<i>Aterelix albiventris</i> (Erizo africano)	Asintomático	93.0 % (306/329)	<i>Chlamydia</i> spp. (LT993738.1)	2420291
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel)	Asintomático	100,0 % (328/328)	<i>C. psittaci</i> (NR102574.1)	2420290

* Nº provisional.

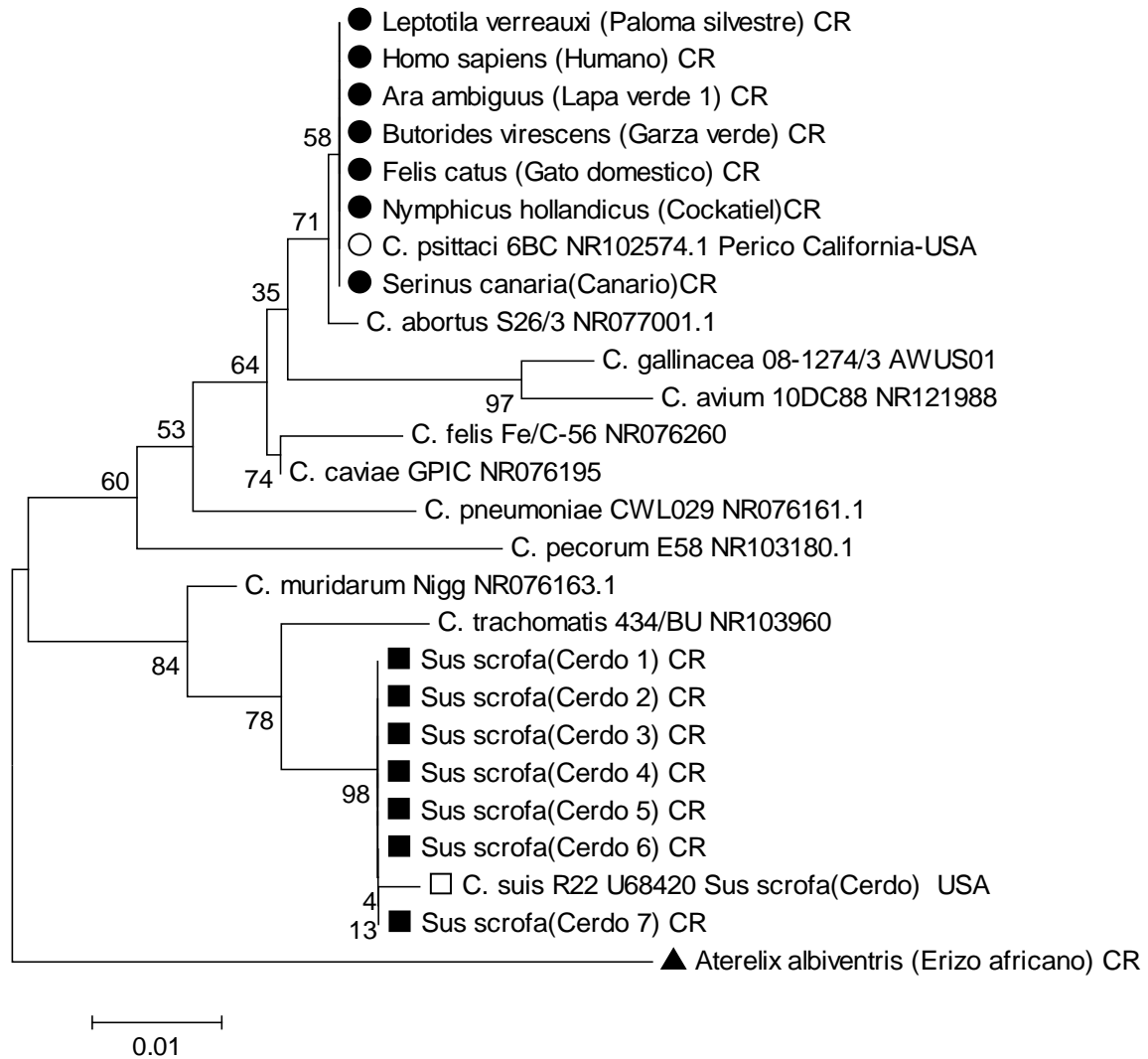


Figura 2. Dendrograma obtenido de un fragmento de 324 nucleótidos de dominios variables del gen ARNr 23S de *Chlamydia* spp., construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. Se muestran once cepas de referencia de *Chlamydia* spp. y las especies clamidiales encontradas en este estudio. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

El análisis de filogenia de las secuencias del dominio variable IV del gen *ompA* de las muestras positivas a *C. pneumoniae* (Cuadro 8), estableció el genotipo A en todas ellas (Figura 3).

Cuadro 8. Identidades nucleotídicas y números de acceso de las secuencias del gen *ompA* de *C. pneumoniae* depositados en Gen Bank de las muestras determinadas como positivas en boas de Costa Rica

Especie (nombre común)	Similitud nucleotídica (pb)	Cepa patrón (Código GenBank)	Genotipo	N° acceso*
<i>Boa constrictor</i> (Boa H1)	100 % (224/224)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420294
<i>Boa constrictor</i> (Boa H2)	100 % (236/236)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420293.1
<i>Boa constrictor</i> (Boa H3)	100 % (236/236)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420293.2
<i>Boa constrictor</i> (Boa B1)	100 % (236/236)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420293.3
<i>Boa constrictor</i> (Boa B2)	100 % (231/231)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420295
<i>Boa constrictor</i> (Boa B3)	100 % (236/236)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420293.4
<i>Boa constrictor</i> (Boa B4)	100 % (236/236)	<i>C. pneumoniae</i> (KY086261.1)	A	2420293.5

* N° provisional.

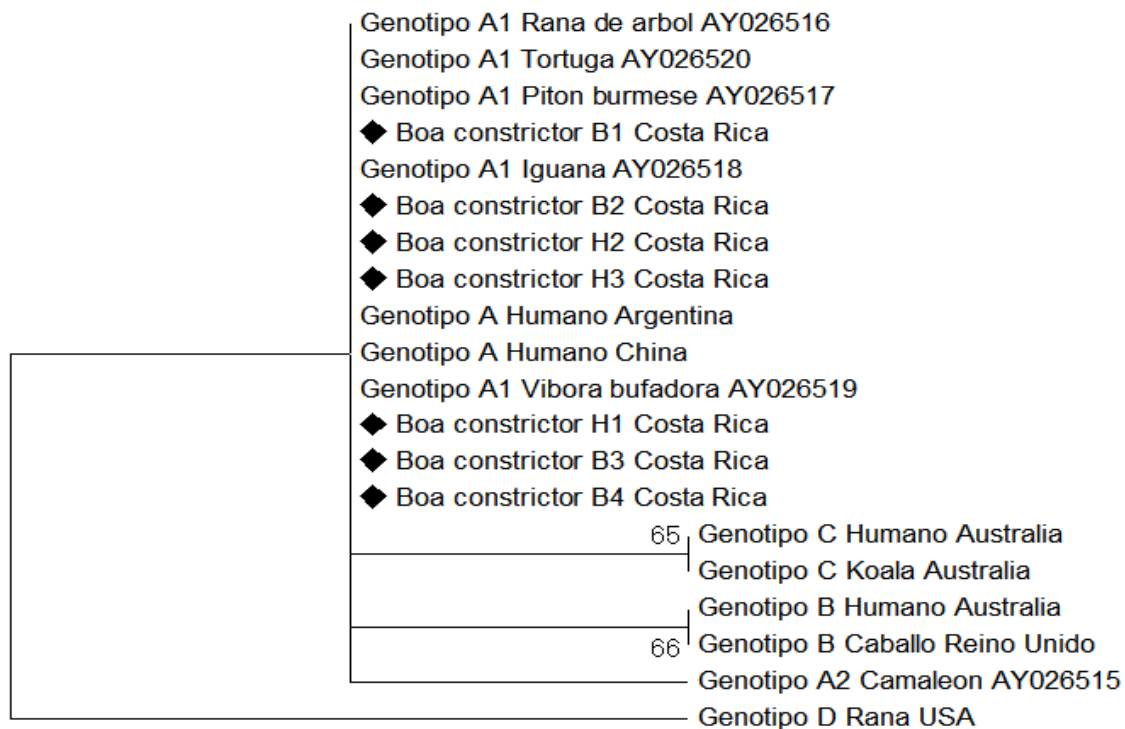


Figura 3. Dendrograma obtenido de un fragmento de 224 nucleótidos del dominio variable IV del gen *ompA* de *C. pneumoniae*, construido por el método de Neighbor joining y el modelo p-distance. Se indican los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas) en los nodos de las ramas.

El aislamiento mediante cultivo celular se hizo con un total de 24 muestras (Cuadro 1). En cuatro casos (lapa verde, garza verde, cockatiel y gato) se logró aislar la bacteria, que resultó ser *C. psittaci* (Figura 4).

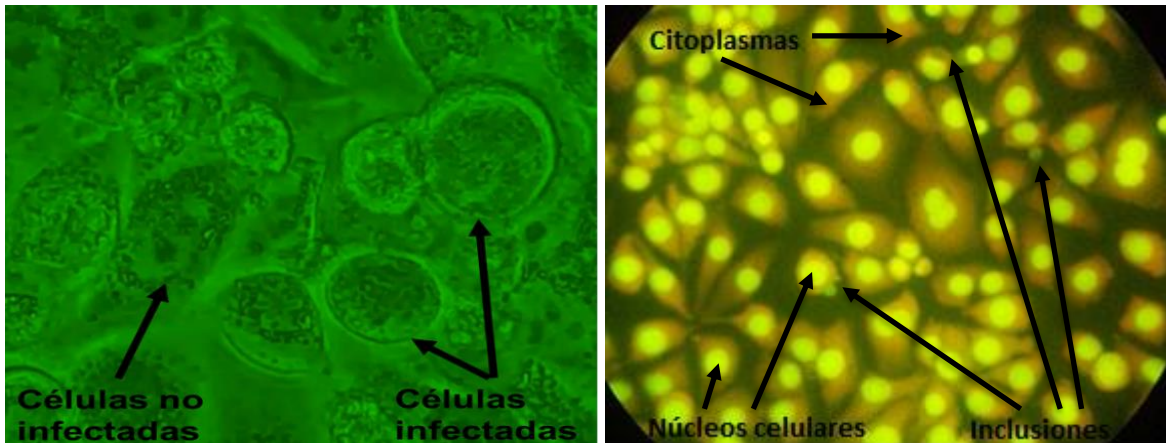


Figura 4. Aislamiento de *Chlamydia psittaci* genotipo A de una lapa verde (*Ara ambiguus*) infectada mediante cultivo celular. A: Inclusiones clamidiales provocando un aumento del volumen de células infectadas y posterior lisis celular. B: Monocapa de células LLCMK2 infectadas, tinción con Naranja de Acridina al 1 % visualizadas en Microscopio de Inmunofluorescencia con un aumento de 100 X. Se pueden visualizar las inclusiones en tonalidad verde junto a los núcleos celulares.

En la Figura 5 se muestra el análisis filogenético de las secuencias de los cuatro dominios variables y las regiones conservadas del gen *ompA* de las cuatro muestras que se lograron aislar mediante cultivo celular, más dos secuencias obtenidas de una muestra de sacos aéreos de una paloma silvestre (Cuadro 4) y de un hisopado faringeal de un humano (Cuadro 4). Se confirmó el genotipo A en cinco de las muestras (lapa verde, garza verde, cockatiel, gato y humano), y el genotipo B en una muestra (paloma silvestre).

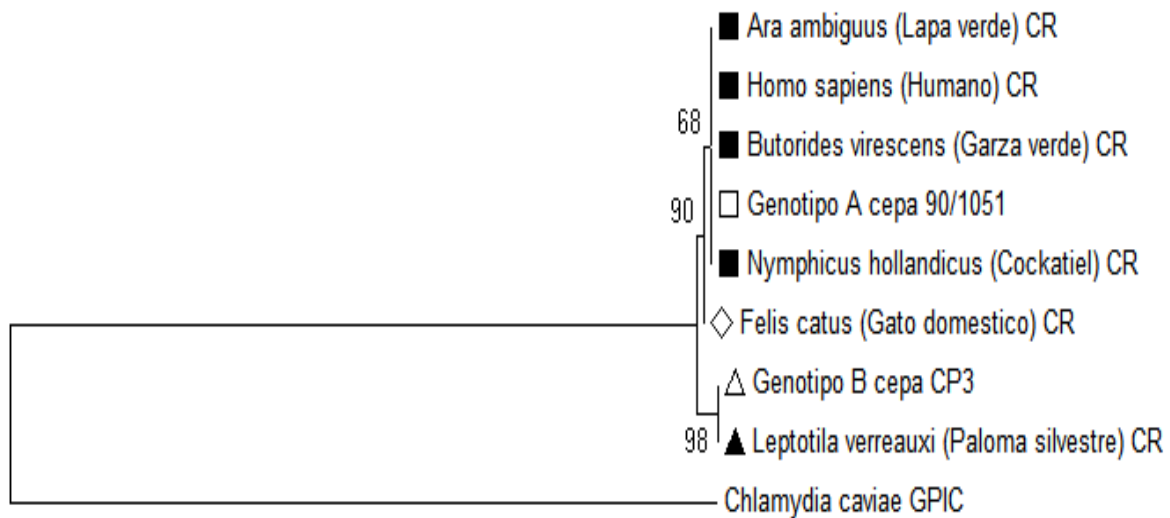


Figura 5. Dendrograma obtenido de un fragmento de 939 nucleótidos comprendiendo los dominios variables I, II, III y IV del gen *ompA* de *C. psittaci*, construido por el método de Neighbor joining y el modelo Jukes y Cantor. La secuencia de *C. caviae* (GenBank AF269282) GPIC se incluyó como grupo externo. Son indicados los valores de bootstrap (10.000 pseudoréplicas), en los nodos de las ramas.

4. Discusión

La detección de *Chlamydia* spp. en un 17,7 % de muestras analizadas es mayor a lo reportado en una investigación similar en Argentina (6.8 %, 80/849) (Frutos, 2015) Estas diferencias se pueden deber a la amplia diversidad biológica de nuestro país, sin embargo, los dos estudios se trataron de análisis no sistemáticos.

Las especies de *Chlamydia* se detectaron en una gran cantidad de animales domésticos, tanto de compañía (gatos, loras, canarios, cockatiels, erizos) como en especies productivas (cerdos, caballos, ovejas, vacas), y además en animales silvestres viviendo en cautiverio (sobre todo aves y reptiles), confirmando que es una bacteria ampliamente distribuida en nuestro país (Jones et al., 2008). Hasta la fecha solamente se había reportado la presencia de *C. psittaci* en aves psitácidas y columbiformes, por lo que los resultados del presente estudio contribuyen a ampliar

el rango de especies de *Chlamydia*, y el de animales infectados con esta bacteria en Costa Rica y Latinoamérica. La extensa mayoría de animales infectados con especies de *Chlamydia* vivían en hogares o en centros de rescate, en contacto con sus cuidadores, por lo que se enfatiza la necesidad de diagnóstico y control de este agente en especies animales domésticas de nuestro país, como la implementación de normas de bioseguridad para personas que laboran con animales en cautiverio, debido al potencial zoonótico documentado para estas bacterias (Longbottom & Coulter, 2003; Cheong et al., 2019), Asimismo, el hecho de encontrar la bacteria en un 50% de animales con signos clínicos, y en algunos casos con lesiones severas, indica la urgencia de incluir a los agentes clamidiales en el diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias.

Los nuevos hospederos de *C. psittaci* reportados por primera vez en nuestro país son lora, gato, canario, garza verde, y paloma silvestre (paloma titibú). Las secuencias analizadas mostraron una alta homología entre ellas, indicando una posible alta clonalidad de esta especie bacteriana en el país, particularmente del genotipo A, ya que fueron similares a secuencias encontradas previamente en el país (Sheleby-Elías et al. 2013). Este genotipo se caracteriza por estar ampliamente distribuido debido posiblemente a su alta virulencia (Beeckman & Vamrompay, 2009). Por otra parte, el genotipo B se encontró en un ave columbiforme, esto ya había sido reportado previamente (Dolz et al., 2013). La transmisión de estos genotipos aviares a humanos ha sido documentado por Heddema et al. (2006) y Vanrompay et al. (2007).

Se reporta por primera vez la presencia de *C. pneumoniae* en nuestro país y en la región centroamericana. Este agente se encontró en siete boas de un centro de exhibición al público, lo que coincide con la literatura, que considera las serpientes como portadores naturales de este agente (Cochrane et al., 2005). Preocupa, sin embargo, que estos reptiles podrían transmitir las bacterias a sus cuidadores o a los visitantes y generar enfermedad severa, sobre todo en personas con sistema inmune debilitado (Cuffini et al., 2006). La máxima variabilidad entre los aislamientos de *C. pneumoniae* en humanos y no humanos se da en la región variable IV del gen

ompA, la cual se seleccionó en el presente trabajo para genotipificar la bacteria, determinando el genotipo A, el cual es el más frecuentemente encontrado en humanos (Bodetti et al., 2002; Cochrane et al., 2005). Hasta la fecha, la transmisión de *C. pneumoniae* solamente se ha documentado entre personas a través de secreciones respiratorias (Yucesan & Sriram, 2001; Cuffini et al., 2006), sin embargo, debe ser considerado como un potencial agente zoonótico (Cochrane et al., 2005; Kutlin et al., 2007).

El hallazgo de *C. suis* en siete cerdos de un establecimiento corresponde al primer reporte en nuestro país y en Latinoamérica. Aunque esta especie se considera endémica en los cerdos domésticos, no se descarta su potencial zoonótico (Marti et al. 2017, De Puyseleyn et al. 2017), lo cual podría representar un riesgo para la salud de las personas que laboran con estas especies en nuestro país. Otro aspecto importante por considerar es que se han establecido cepas de *C. suis* resistentes a antibióticos, específicamente a tetraciclinas, que son las que se usan generalmente en el tratamiento contra las clamidias (Seth-Smith et al. 2017). Marti et al. (2017) advierten, que eventos de recombinación genética entre especies, podrían generar una resistencia generalizada de la familia *Chlamydiaceae*.

En el caso del erizo africano, un animal exótico que se vende en tiendas de mascotas, no se logró identificar la especie clamidial presente, se hipotetiza, que se puede deber a la presencia de una especie de *Chlamydia* no reportada hasta la fecha. Se recomienda caracterizar en futuros estudios la especie de clamidia presente en estos animales exóticos, eventualmente realizando secuenciación del genoma completo (Sigalova et al. 2019).

Considerando el aumento de la tenencia de animales exóticos (reptiles, mamíferos, entre otros, pero también cockatiels y canarios) como mascotas en la población costarricense, es necesario implementar un sistema de vigilancia y control en las tiendas de mascotas, para evitar el contagio de los animales que ahí conviven, y para asegurar la venta de animales libres de *Chlamydia*, que podrían ocasionar enfermedad en hogares con personas inmunosupresas (Frutos, 2015; CDC, 2018).

En el presente trabajo se logró implementar la técnica de cultivo celular y aislar por primera vez en Costa Rica y Centroamérica varias cepas de *C. psittaci*. El aislamiento mediante cultivo celular se considera la prueba de oro (Andersen & Franson, 2007; Andersen & Vanrompay, 2008), permite producir controles positivos (antígenos) que pueden ser empleados en el diagnóstico rutinario, además permite la caracterización molecular de los aislamientos. Sin embargo, debido al tiempo necesario, la dificultad y el riesgo biológico, el cultivo no es recomendado para el diagnóstico rutinario (Frutos, 2015). Las técnicas de PCR están reemplazando el aislamiento de clamidias en cultivo de tejidos, ya que la sensibilidad y especificidad del PCR para *C. psittaci* suele ser superior a la técnica de cultivo celular. Adicionalmente, la sensibilidad es aún mayor si se utiliza un PCR anidado o un PCR en tiempo real (qPCR) (Everett et al., 1999; Pantchev et al., 2009).

Por primera vez en nuestro país se reporta la presencia de *C. psittaci* en un hisopado faringeal de un médico veterinario, que presentó fiebre y signos respiratorios. El profesional había atendido un brote y fallecimiento de aves psitácidas (*Ara macao* y *Ara ambiguus*), realizando la necropsia de los animales sin medidas adecuadas de bioseguridad. En las aves se confirmó mediante hallazgos histológicos y diagnóstico molecular la presencia de *C. psittaci* genotipo A. Tres meses después se diagnosticó el mismo genotipo de *C. psittaci* en este médico veterinario, el cual estaba presentando desde hace 22 días tos productiva, sinusitis, ligera insuficiencia respiratoria y malestar generalizado con fiebre intermitente.

En el presente trabajo se implementaron técnicas de diagnóstico, que facilitan la detección de especies de *Chlamydia*. El uso de estas técnicas determinó la presencia de diversas especies de *Chlamydia* con potencial zoonótico en una gran variedad de animales domésticos y silvestres que conviven con el ser humano. En vista del riesgo que representan las clamidias para la salud pública se recomienda reglamentar e implementar medidas de bioseguridad en establecimientos de exhibición y venta de animales, y descartar *Chlamydia* spp. en problemas respiratorios de animales y humanos.

5. Conclusiones

- Se determinó la presencia de especies de *Chlamydia* en un 17.7 % (59/333) de muestras analizadas, encontrándose sobre todo en animales con enfermedad respiratoria (50% de los casos), pero también en animales asintomáticos (14 % de los casos).
- La especie más diagnosticada fue *C. psittaci* genotipo A, determinándose por primera vez en el país en un gato, en un canario, en una lora, en un cockatiel y una garza verde, aumentando el rango de hospederos reportados.
- Se reporta por primera vez en América Central la presencia de *C. pneumoniae* en serpientes (*Boa constrictor*).
- Se reporta por primera vez a nivel latinoamericano la presencia de *C. suis* en cerdos.
- Se reporta por primera vez en América Central la presencia de *C. psittaci* en un humano.
- Con la implementación de técnicas moleculares se logró ampliar el conocimiento sobre *Chlamydia* spp. de importancia para la salud animal y salud pública en Costa Rica.
- Con la implementación de la técnica de aislamiento en cultivo celular se logró aislar varias cepas de *C. psittaci*.

6. Recomendaciones

- Alertar a los profesionales de la salud de la presencia de clamidias con potencial zoonótico en animales domésticos y silvestres
- Implementar medidas de bioseguridad en centros de rescate, para evitar el contagio de los animales que ahí conviven, y para prevenir el contagio del personal de cuidado y de los visitantes.
- Implementar un sistema de vigilancia y control en las tiendas de mascotas para evitar el contagio de los animales que ahí conviven y asegurar la venta de

animales libres de *Chlamydia*, que podrían ocasionar enfermedad en hogares con personas inmunosupresas.

- Considerar a las clamidias en el diagnóstico diferencial de problemas respiratorios en animales y humanos.
- Transferir la técnica molecular de *Chlamydia* spp. al INCIENSA, a la CCSS y al SENASA para facilitar la detección temprana y tratamiento certero de las personas y de los animales infectados.
- Realizar investigaciones para establecer la importancia de *C. pneumoniae* como agente zoonótico en Costa Rica.
- Investigar la prevalencia de *C. suis* en cerdos y determinar si las cepas circulantes en el país poseen genes de resistencia a antibióticos.
- Investigar la presencia de nuevas especies de *Chlamydia* mediante métodos más robustos como secuenciación del genoma completo.

7. Referencias Bibliográficas

Andersen, A. & Vanrompay, D. (2003). Avian chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In Diseases of Poultry, Eds., Saif, Y.M., H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald & D.E. Swayne (editors), Ames, Iowa, State University Press, USA, 11th edition, pp. 863-887.

Andersen, A. & Franson, J. (2007). Avian chlamydiosis. In: Infectious diseases of wild birds. Edited by Thomas, N.; Hunter, B. and Atkinson, C. Blackwell Publishing Professionals, Ames, Iowa, USA. pp: 303-316.

Andersen, A. & Vanrompay, D. (2008). Chlamydiosis. In: A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens, 5 edition. Edited by Dufour-Zavala, L.; Swayne, D.E.; Glisson, J.; Pearson, J.; Reed, W. and Jackwood, M. American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, USA. pp: 65-74.

Beeckman, D.S. & Vanrompay D.C. (2010). Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydophila psittaci* strains in chicken macrophages. *Vet. Microbiol.* 141: 342-353.

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. *Syst Appl Microbiol.* 25:146-152.

Campbell, L.A., Kuo, C.C. & Grayston, J.T. (1998). *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis.* 4: 571-579.

CDC. (2018). Multistate Psittacosis Outbreak Among Poultry Plant Workers. <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/surveillance-reporting/outbreaks/2018-poultry-multistateinvestigation.html>

Cheong, H.C., Lee, C.Y.Q., Cheok, Y.Y., Grace, M.Y., Looi, Chung Y. & Wong, W.F. (2019). *Chlamydiaceae*: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. *Microorganisms.* 7 (5): 146.

Cochrane, M., Walker, P., Gibbs, H. & Timms, P. (2005). Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiol.* 151: 2285-2290.

Cuffini, C., Guzmán, L.A., Villegas, N., Alonso, C.E., Martínez-Riera, L., Rodríguez-Fermepín, M., Entrocassi, A., Adamo, M.P., Pedranti, M. & Zapata, M. (2006). Isolation of *Chlamydophila pneumoniae* from Atheromas of the Carotid Artery and their antibiotics susceptibility profile. *Rev Enf Infec y Microbiol Clín.* 24:81-85.

De Puysseleir, K., De Puysseleir, L., Dhondt, H., Geens, T., Braeckman, L. & Morre, S.A. (2014). Evaluation of the presence and zoonotic transmission of *Chlamydia suis* in a pig slaughterhouse. *BMC Infect Dis.* 14:560.

Dolz, G., Solórzano-Morales, Á., Angelova, L., Tien, C., Fonseca, L. & Bonilla, M. C. (2013). *Chlamydia psittaci* genotype B in a pigeon (*Columba livia*) inhabiting a public place in San José, Costa Rica. *Open Veterinary Journal.* 3(2): 135-139.

Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999). Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 575-580.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Frutos, M.C. (2015). Eco-epidemiología de *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*: Impacto en la Salud Pública. Tesis -Doctorado en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. 169 pp. http://lildbi.fcm.unc.edu.ar/lildbi/tesis/frutos_maria_celia.pdf

Guo, W., Li, J., Kaltenboeck, B., Gong, J., Fan, W. & Wang, C. (2016). *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Sci. Rep.* 6: 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep19638>.

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.

Heddema, E.R., van Hannen, E.J., Duim, B., Vandenbroucke-Grauls, C.M. & Pannekoek, Z. (2006). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 1989-1990.

Herrera, I., Khan, S.R., Kaleta, E.F., Müller, H., Dolz, G. & Neumann, U.. (2001). Serological status for *Chlamydophila psittaci*, *Newcastle disease virus*, *Avian polyomavirus*, and *Pacheco disease virus* in scarlet macaws (*Ara macao*) kept in captivity in Costa Rica. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*. 48: 721-726.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 451: 990-993.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, Ed., Munro, H.N., Academic Press, New York, pp. 21-132

Kaleta, E.F. & Taday E.M. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32: 435-461.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Kutlin, A., Roblin, P.M., Kumar, S., Kohlhoff, S., Bodetti, T., Timms, P. & Hammerschlag, M.R. (2007). Molecular characterization of *Chlamydophila pneumoniae* isolates from Western barred bandicoots. *J Med Microbiol.* 56:407-417.

Longbottom, D. & Coulter, L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal Comparative Pathology*, 128: 217-244.

Maass, 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. *J Am Coll Cardiol.* 31(4): 827-832.

Marti, H., et al. 2017. Tet(C) gene transfer between *Chlamydia suis* strains occurs by homologous recombination after co-infection: Implications for spread of tetracycline-resistance among *Chlamydia*. *Front Microbiol.* 8: 156.

OIE. (2018). Avian Chlamydiosis. In *Manual of standards for diagnostic test and vaccines.* Office International des epizooties, Paris. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>.

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. *Vet J.* 181: 145-150.

Seth-Smith, H.M., Wanninger, S., Bachmann, N., Marti, H., Qi, W., Donati, M., di Francesco, A., Polkinghorne, A. & Borel, N. (2017). The *Chlamydia suis* Genome Exhibits High Levels of Diversity, Plasticity, and Mobile Antibiotic Resistance: Comparative Genomics of a Recent Livestock Cohort Shows Influence of Treatment Regimes. *Genome Biol Evol.* 9(3):750-760. doi: 10.1093/gbe/evx043.

Sachse, K. & Hotzel, H. (2003). Detection and differentiation of Chlamydiae by nested-PCR. *Methods Mol Biol.* 216: 123-36. 178.

Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehricht, R. & Slickers, P. 2008. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BioMed Central Microbiology.* 8: 1471-2180.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Sheleby-Elías, J., Solórzano-Morales, A., Romero-Zuñiga, J.J. & Dolz, G. (2013). Molecular detection and genotyping of *Chlamydia psittaci* in captive Psittacines from Costa Rica. *Vet. Med. Int.* 142962: 1-6.

Sigalova, O.M., Chaplin, A.V. & Bochkareva, O.O. (2019). *Chlamydia* pan-genomic analysis reveals balance between host adaptation and selective pressure to genome reduction. *BMC Genomics* 20, 710 <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6059-5>

Spencer, W.N. & Johnson, F.W.A. (1983). Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.* 113: 535-536.

Tien, C., Arrieta, M., Solórzano-Morales, A. & Dolz, G. (2014). *Chlamydia psittaci*: agente zoonótico diagnosticado en aves y en el ser humano en Costa Rica. II Encuentro Anual de Medicina Veterinaria. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Vanrompay, D., Harkinezhad, T., Van De Walle, M., Beeckman, D., Van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., Leten, R., Martel, A. & Cauwerts, K. (2007). *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1108-1110.

Yucesan, C. & Sriram, S. (2001). *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system. *Curr Opin Neurol.* 14(3):355-359.

Zhang, Z.X., Morrison, S.G., Caldwell, H.D. & Baehr, W. (1989). Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *Chlamydia psittaci* strains. *Infection Immunity* 57, 1621-1625.

Discusión general

La primera parte de esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de especies clamidiales en aves de producción de Costa Rica. Se reporta por primera vez la detección de diferentes especies de *Chlamydia* en aves gallináceas de granjas comerciales y de traspatio de Costa Rica y Centroamérica. El porcentaje de positividad determinado en granjas comerciales (8,0 %) fue mayor que lo reportado en México (3,4%), en Polonia (2,2 %) y Eslovaquia (6,9 %) (Szymańska-Czerwińska et al., 2017; Cechova et al., 2018; Ornelas-Eusebio et al., 2020), pero menor que lo encontrado en granjas avícolas comerciales de Holanda (9,8 %) y Argentina (40,3 %) (Heijne et al., 2018; Origlia et al., 2016). Asimismo, el porcentaje determinado en granjas de traspatio de nuestro país (28,6 %) fue superior que el de otros países como Estados Unidos (13.6 %), Italia (15 %) y China (24.7 %) (Li et al., 2017; Guo et al., 2016; Donati et al., 2018), pero similar al que recientemente se reportó en México (28,6 %) (Ornelas-Eusebio et al., 2020).

En las aves de traspatio se determinó cuatro veces más muestras positivas a especies de *Chlamydia* que en muestras de aves de explotación industrial, a pesar de que fueron las últimas, las que habían mostrado signos respiratorios. Esto se puede deber a la falta de medidas de bioseguridad en los establecimientos de traspatio y la posibilidad de contacto con otros animales, principalmente con aves silvestres, que pueden transmitir el agente (Hulin et al., 2015; Vorimore et al., 2015; Ornelas-Eusebio et al., 2020). Factores como medidas de bioseguridad estrictas, buenas prácticas de limpieza y desinfección, uso de medicina preventiva (antibióticos) y buen manejo de la nutrición han demostrado reducir el riesgo de transmisión de patógenos (Sims, 2006, Hulin et al., 2015, Vorimore et al., 2015). Es de notar, el hallazgo de *C. psittaci* en aves con signos respiratorios en explotaciones

comerciales. Los porcentajes de positividad determinados en los dos grupos podrían estar, sin embargo, subestimados, por un lado, porque las bacterias se excretan en forma intermitente en animales asintomáticos (Andersen & Vanrompay, 2003), por el otro lado, porque el ave generalmente excreta la bacteria por faringe o por cloaca, y no de los dos sitios (Sheleby-Elías et al., 2013 y Cechova et al., 2018).

En este estudio se logró determinar por primera vez en Costa Rica y Centroamérica *C. psittaci* en aves gallináceas de producción y de traspatio, lo que debe de alertar a los trabajadores en granjas avícolas, en mataderos y a las personas que tienen contacto directo con estas aves, sobre el riesgo de infección y de enfermarse con la bacteria. *Chlamydia psittaci* se ha determinado en pollos en Australia, Alemania, Bélgica, Francia, Eslovaquia, Italia y China (Yang et al., 2007; Gaede et al., 2008; Zhang et al., 2008; Laroucau et al., 2009; Robertson et al., 2010; Zhou et al., 2010; Dickx et al., 2010; Yin et al., 2013; Guo et al., 2016; Cechova et al., 2018; Donati et al., 2018), causando pérdidas económicas a la industria avícola debido a su reporte obligatorio (Cechova et al. 2018). Los porcentajes de infección en todos estos países no superan el 6,9 % (Eslovaquia), en contraste a los porcentajes obtenidos en este estudio (45,5 %); sin embargo, estudios serológicos (ELISA específico de *C. psittaci*) en granjas de engorde en Bélgica determinaron seropositividades del 95 %, por lo que los porcentajes obtenidos mediante PCR pudieran estar subestimados, debido a la excreción intermitente de la bacteria (Dickx et al., 2010). La detección del genotipo A en pollos de nuestro país concuerda con reportes de Bélgica (Van Loock et al., 2005; Lagae et al., 2014) y representa un riesgo para las personas en contacto con estas aves, ya que este genotipo se considera altamente virulento (Beeckman & Vanrompay, 2009). En los diferentes establecimientos, especialmente en los que resultaron positivos a *C. psittaci* se deberían de revisar e implementar las medidas de protección personal, que deben de incluir: protocolo de higiene de las manos y ropa protectora, uso de guantes y máscara de filtro de aire de cara completa. Debe de existir una sala de transición, donde se pueda guardar la ropa de protección, asimismo, se debe de realizar una adecuada limpieza y

ventilación natural o mecánica que evite la contaminación cruzada entre los diferentes espacios (Deschuyffeleer et al., 2012).

El diagnóstico de agentes infecciosos que ocasionan problemas respiratorios en aves de producción en Costa Rica se realiza por SENASA como control activo, e incluye la enfermedad de Newcastle, la influenza aviar, la laringotraqueitis infecciosa, la bronquitis infecciosa aviar y especies de *Mycoplasma*. Un estudio reciente realizado por De Boek et al., (2015), determinó problemas de conjuntivitis, enfermedad respiratoria superior y disnea en pollos de engorde infectados con *C. psittaci*, asimismo, se estableció supresión del sistema inmune (Chu et al., 2016), por lo que se recomienda incluir la clamidiosis aviar en el diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias de aves de producción (Dickx et al., 2010, Laroucau et al., 2014, Lagae et al., 2014, Hulin et al., 2015, CDC, 2018).

Además, por primera vez en Costa Rica y Centroamérica, la presencia de *C. muridarum* (especie no zoonótica) en pollos comerciales y de traspatio. Este hallazgo se considera accidental y esporádico, posiblemente por contacto cercano de las aves con los hospederos naturales (roedores) de la bacteria (Guo et al. 2016). Finalmente, se reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica, la presencia de *C. gallinacea* en pollos de traspatio, un agente clamidial detectado recientemente a nivel mundial, por lo que no se cuenta con mucha información. Su presencia se reporta en cuatro países europeos (Francia, Grecia, Eslovenia, Crocia), así como en China, Argentina, México y Estados Unidos (Zocevic et al., 2012; Guo et al., 2016; Origlia et al., 2016; Li et al., 2017; Ornelas-Eusebio et al., 2020). Estudios experimentales con *C. gallinacea* mostraron una reducción significativa del peso corporal (desde un 6,5 hasta a un 11,4%) de los animales sin presentación de signos clínicos (Guo et al., 2016). Sin embargo, trabajadores de mataderos expuestos a pollos infectados con este agente, desarrollaron neumonía atípica, indicando un potencial zoonótico de *C. gallinacea* (Li et al., 2017).

Las técnicas de qPCR resultaron ser más sensibles, que las técnicas de PCR de punto final, lo que está ampliamente documentado en la literatura (DeGraves et al., 2003; Opota et al., 2015; OIE 2018). De las muestras detectadas como positivas en

el qPCR de *Chlamydia* spp., un 45,4 % (20/44) se confirmaron como *C. psittaci* mediante el qPCR específico para esta especie, confirmando una presencia significativa del agente en nuestro medio (Sheleby-Elías et al., 2013; Dolz et al., 2013). Los PCR punto final para *Chlamydia* spp. y *C. psittaci*, en contraste, solo lograron detectar un 18,2 % (8/44) y un 15,0 % (3/20) de positivos detectados en los qPCR, respectivamente. En un 40,9 % (18/44) de los casos no fue posible identificar la especie clamidial infectante. Es posible, que el uso de qPCR para otras especies de *Chlamydia* (por ejemplo *C. gallinacea*) ayude a identificar las clamidias no determinadas. Estudios recientes (Hulin et al., 2015, Origlia et al., 2016; Guo et al., 2016; Li et al., 2017; Taylor-Brown & Polkinghorne, 2017; Cechova et al., 2018) han establecido la mayoría de las clamidias sin identificar como pertenecientes a *C. gallinacea* (detectadas mediante qPCR), una especie que se considera endémica y predominante en pollos. Los resultados de este estudio demuestran la complejidad de la epidemiología de la clamidiosis aviar, y confirma, que las infecciones clamidiales en aves no sólo se deben a *C. psittaci*.

La segunda parte del estudio tuvo como objetivo diagnosticar las especies de *Chlamydia* presentes en animales domésticos y silvestres de Costa Rica. La detección de *Chlamydia* spp. en un 17,7 % de muestras analizadas es mayor a lo reportado en Argentina (6.8%, 80/849) (Frutos, 2015), estas diferencias se pueden deber a la amplia diversidad biológica de nuestro país, sin embargo, en los dos estudios se trató de análisis no sistemáticos. Las especies de *Chlamydia* se detectaron en una gran cantidad de animales domésticos, tanto de compañía (gatos, loras, canarios, cockatiels, erizos) como en especies productivas (cerdos, caballos, ovejas, vacas), y además en animales silvestres viviendo en cautiverio (sobre todo aves y reptiles), confirmando que es una bacteria ampliamente distribuida en nuestro país (Jones et al., 2008). Hasta la fecha solamente se había reportado la presencia de *C. psittaci* en aves psitácidas y columbiformes, los resultados del presente estudio contribuyen a ampliar el rango de especies de *Chlamydia*, y el de animales infectados con esta bacteria en Costa Rica y Latinoamérica. La extensa mayoría de animales infectados con especies de *Chlamydia* vivían en hogares o en

centros de rescate, en contacto con sus cuidadores, por lo que se enfatiza la necesidad de diagnóstico y control de este agente en especies animales domésticas de nuestro país, como la implementación de normas de bioseguridad para personas que laboran con animales en cautiverio, debido al potencial zoonótico documentado para estas bacterias (Longbottom y Coulter, 2003; Cheong et al., 2019), Asimismo, el hecho de encontrar la bacteria en un 50% de animales con signos clínicos, y en algunos casos con lesiones severas, indica la urgencia de incluir a los agentes clamidiales en el diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias.

Los nuevos hospederos de *C. psittaci* reportados por primera vez en nuestro país son lora, gato, canario, garza verde, y paloma silvestre (paloma titibú). Las secuencias analizadas mostraron una alta homología entre ellas, indicando una posible alta clonalidad de esta especie bacteriana en el país, particularmente del genotipo A, ya que fueron similares a secuencias encontradas previamente en el país (Sheleby-Elías et al. 2013). Este genotipo se caracteriza por estar ampliamente distribuido debido posiblemente a su alta virulencia (Beeckman & Vamrompay, 2009). Por otra parte, el genotipo B se encontró en un ave columbiforme, esto ya había sido reportado previamente (Dolz et al., 2013). La transmisión de estos genotipos aviares a humanos ha sido documentado por Heddema et al. (2006) y Vanrompay et al. (2007).

Se reporta por primera vez la presencia de *C. pneumoniae* en nuestro país y en la región centroamericana. Este agente se encontró en siete boas de un centro de exhibición al público, lo que coincide con la literatura, que considera las serpientes como portadores naturales de este agente (Cochrane et al., 2005). Preocupa, sin embargo, que estos reptiles podrían transmitir las bacterias a sus cuidadores o a los visitantes y generar enfermedad severa, sobre todo en personas con sistema inmune debilitado (Cuffini et al., 2006). La máxima variabilidad entre los aislamientos de *C. pneumoniae* en humanos y no humanos se da en la región variable IV del gen *ompA*, la cual se seleccionó en el presente trabajo para genotipificar la bacteria (Wardrop et al., 1999), determinando el genotipo A, el cual es el más frecuentemente encontrado en humanos (Bodetti et al., 2002; Cochrane et al.,

2005). Hasta la fecha, la transmisión de *C. pneumoniae* solamente se ha documentado entre personas a través de secreciones respiratorias (Yucesan & Sriram, 2001; Cuffini et al., 2006), sin embargo, debe ser considerado como un potencial agente zoonótico (Rivero, 2001, Cochrane et al., 2005; Kutlin et al., 2007). El hallazgo de *C. suis* en siete cerdos de un establecimiento corresponde al primer reporte en nuestro país y en Latinoamérica. Aunque esta especie se considera endémica en los cerdos domésticos, no se descarta su potencial zoonótico (Marti et al. 2017, De Puysseleir et al. 2017), lo cual podría representar un riesgo para la salud de las personas que laboran con estas especies en nuestro país. Otro aspecto importante por considerar es que se han establecido cepas de *C. suis* resistentes a antibióticos, específicamente a tetraciclinas, que son las que se usan generalmente en el tratamiento contra las clamidias (Helena et al. 2017). Marti et al. (2017) advierten, que eventos de recombinación genética entre especies, podrían generar una resistencia generalizada de la familia *Chlamydiaceae*.

En el caso del erizo africano, un animal exótico que se vende en tiendas de mascotas, no se logró identificar la especie clamidial presente, se hipotetiza, que se puede deber a la presencia de una especie de *Chlamydia* no reportada hasta la fecha. Se recomienda caracterizar en futuros estudios la especie de clamidia presente en estos animales exóticos, eventualmente realizando secuenciación del genoma completo (Sigalova et al. 2019).

Considerando el aumento de la tenencia de animales exóticos (reptiles, mamíferos, entre otros, pero también cockatiels y canarios) como mascotas en la población costarricense, es necesario implementar un sistema de vigilancia y control en las tiendas de mascotas, para evitar el contagio de los animales que ahí conviven, y para asegurar la venta de animales libres de *Chlamydia*, que podrían ocasionar enfermedad en hogares con personas inmunosupresas (Frutos, 2015; CDC, 2018). En el presente trabajo se logró implementar la técnica de cultivo celular y aislar por primera vez en Costa Rica y Centroamérica varias cepas de *C. psittaci*. El aislamiento mediante cultivo celular se considera la prueba de oro (Andersen & Franson, 2007; Andersen & Vanrompay, 2008), permite producir controles positivos (antígenos) que pueden ser empleados en el diagnóstico rutinario, además permite

la caracterización molecular de los aislamientos. Sin embargo, debido al tiempo necesario, la dificultad y el riesgo biológico, el cultivo no es recomendado para el diagnóstico rutinario (Frutos, 2015). Las técnicas de PCR están reemplazando el aislamiento de clamidias en cultivo de tejidos, ya que la sensibilidad y especificidad del PCR para *C. psittaci* suele ser superior a la técnica de cultivo celular. Adicionalmente, la sensibilidad es aún mayor si se utiliza un PCR anidado o un PCR en tiempo real (qPCR) (Everett et al., 1999; Pantchev et al., 2009).

Por primera vez en nuestro país se reporta la presencia de *C. psittaci* en un hisopado faringeal de un médico veterinario, que presentó fiebre y signos respiratorios. El profesional había atendido un brote y fallecimiento de aves psitácidas (*Ara macao* y *Ara ambiguus*), realizando la necropsia de los animales sin medidas de bioseguridad. En las aves se confirmó mediante hallazgos histológicos y diagnóstico molecular la presencia de *C. psittaci* genotipo A. Tres meses después se diagnosticó el mismo genotipo de *C. psittaci* en este médico veterinario, el cual estaba presentando desde hace 22 días tos productiva, sinusitis, ligera insuficiencia respiratoria y malestar generalizado con fiebre intermitente.

En el presente trabajo se implementaron técnicas de diagnóstico, que facilitan la detección de especies de *Chlamydia*. El uso de estas técnicas determinó la presencia de diversas especies clamidiales con potencial zoonótico en una gran variedad de animales domésticos y silvestres que conviven con el ser humano. En vista del riesgo que representan estos agentes para la salud pública se recomienda reglamentar e implementar medidas de bioseguridad en establecimientos de exhibición y venta de animales, y descartar *Chlamydia* spp. en problemas respiratorios de animales y humanos.

Conclusiones generales

- Se detectó la presencia *Chlamydia* spp. en 8,0% (12/150) de muestras de aves de establecimientos industriales con sintomatología respiratoria y en un 28,6 % (32/112) de muestras de aves de producción traspatio sin sintomatología clínica.
- *Chlamydia psittaci* se determinó presente en un 45,5 % (20/44) de las aves de producción positivas a *Chlamydia* spp.
- Se logró determinar por primera vez en Costa Rica y a nivel latinoamericano la presencia de *C. psittaci*, genotipo A tanto en pollos como pavos de establecimientos industriales y de traspatio.
- Se detectó por primera vez en el país y en Centroamérica *C. gallinacea* en pollos de traspatio y *C. muridarum* en pollos comerciales con problemas respiratorios y pollos traspatio.
- Se confirmó una mayor sensibilidad de la técnica de qPCR en comparación con la PCR convencional para la detección de clamidias.
- Se determinó la presencia de especies de *Chlamydia* en un 17.7 % (59/333) de muestras de animales domésticos y silvestres analizados, encontrándose sobre todo en animales con enfermedad respiratoria (50% de los casos), pero también en animales asintomáticos (14 % de los casos).
- La especie más diagnosticada fue *C. psittaci* genotipo A (22/59), determinándose por primera vez en el país en un gato, en un canario, en una lora, en un cockatiel y una garza verde, aumentando el rango de hospederos reportados.

- Se reporta por primera vez en América Central la presencia de *C. pneumoniae* en serpientes (*Boa constrictor*).
- Se reporta por primera vez a nivel latinoamericano la presencia de *C. suis* en cerdos.
- Se confirma molecularmente por primera vez en América Central la presencia de *C. psittaci* en un humano.
- Con la implementación de técnicas moleculares se logró ampliar el conocimiento sobre *Chlamydia* spp. de importancia para la salud animal y salud pública en Costa Rica.
- Con la implementación de la técnica de aislamiento en cultivo celular se logró aislar varias cepas de *C. psittaci*.

Recomendaciones generales

- Concientizar y alertar a los profesionales de la salud a considerar a las clamidias en el diagnóstico diferencial de agentes causantes de problemas respiratorios en animales y humanos.
- Concientizar y alertar al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) para que incluya el diagnóstico de clamidiosis aviar en el control activo de enfermedades respiratorias en aves de producción para evitar el contagio de las personas.
- Alertar a los profesionales de la salud y población en general de la presencia de clamidias con potencial zoonótico en animales domésticos y silvestres.

- Implementar medidas de bioseguridad en establecimientos de producción animal, centros de rescate, zoológicos y tiendas de mascotas; para evitar el contagio de los animales que ahí conviven, asegurar liberación al ambiente, venta o exposición de animales libres de *Chlamydia* y para prevenir el contagio del personal de cuidado y de los visitantes.
- Utilizar métodos de diagnóstico moleculares, sobre todo la técnica de qPCR por su alta sensibilidad y especificidad para determinar la presencia de especies de *Chlamydia* en animales y humanos.
- Transferir la técnica molecular de *Chlamydia* spp. al INCIENSA, a la CCSS y al SENASA para facilitar la detección temprana y tratamiento certero de las personas y de los animales infectados.
- Investigar la patogenicidad, el efecto en la producción y el posible potencial zoonótico de *C. psittaci* y *C. gallinacea* en aves de producción de Costa Rica.
- Realizar investigaciones para establecer la importancia de *C. pneumoniae* como agente zoonótico en Costa Rica.
- Investigar la prevalencia de *C. suis* en cerdos y determinar si las cepas circulantes en el país poseen genes de resistencia a antibióticos.
- Investigar la presencia de nuevas especies de *Chlamydia* mediante métodos más robustos como secuenciación del genoma completo.

ANEXOS

Anexo 1: Descripción de los animales muestreados (333)

Especie (nombre común) (1)	Hallazgos histopatológicos o signos clínicos	Muestra	Procedencia	Modo vida	Tipo vida
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 1)	Sacos aéreos con exudado caseoso, , esplenomegalia, hepatomegalia, focos necróticos en pulmón.	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 2)	Hepatomegalia, secreción faríngea, , esplenomegalia, hidropericardio, secreción espumosa en pulmones, puntos necróticos pancreáticos, nefromegalia.	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde 3)	Hepatomegalia, esplenomegalia, aerosaculitis	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara macao</i> (Lapa roja 1)	Hepatomegalia, lesiones en páncreas, buche con mucha dilatación, sacos aéreos con fibrina, estómago con ulceraciones, nefromegalia.	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara macao</i> (Lapa roja 2)	Aerosaculitis,.	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara macao</i> (Lapa roja 3)	Dificultad respiratoria	Hisopado cloacal y faringeal	Centro Rescate Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Butorides virescens</i> (Garza verde)	Hepatomegalia, exudados caseosos en sacos aéreos, esplenomegalia, cardiomegalia	Sacos aéreos	Zoológico Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Leptotila verreauxi</i> (Paloma tibibú)	Hepatomegalia, neumonía y aerosaculitis	Sacos aéreos	Plaza pública San José	Silvestre	Vida libre
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel)	Cardiomegalia, neumonía y aerosaculitis	Sacos aéreos	Hogar Heredia	Doméstico	Compañía
<i>Felis catus</i> (Gato)	Secresiones nasales y conjuntivitis	Hisopado conjuntival y nasal	Hogar San José	Doméstico	Compañía
<i>Felis catus</i> (Gato) (8)	Secresiones nasales	Hisopado nasal	Hogar Alajuela	Doméstico	Compañía
<i>Homo sapiens</i> (Humano) (3)	Dificultad respiratoria, dolor de cabeza, malestar generalizado	Hisopado faringeal	Alajuela		
<i>Sus scrofa domestica</i> (Cerdo) (7)	Conjuntivitis	Hisopado conjuntival	Finca Alajuela	Doméstico	Producción

<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde) (61)	Asintomáticas	Hisopado cloacal y faringeal	Centro Rescate Guanacaste	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara ambiguus</i> (Lapa verde)	Asintomática	Sacos aéreos	Centro Rescate Puntarenas	Silvestre	Cautiverio
<i>Ara macao</i> (Lapa roja) (73)	Asintomáticas	Hisopado cloacal+ y faringeal	Zoológico Alajuela (28) Centro Rescate Guanacaste (45)	Silvestre	Cautiverio
<i>Psittacara finschi</i> (Perico) (5)	Asintomáticos	Hisopado cloacal	HEMS	Silvestre	Cautiverio
<i>Quiscalus nicaraguensis</i> (Zanate) (3)	Asintomáticos	Hisopado cloacal	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Serinus canaria</i> (Canario) (2)	Asintomático	Heces	Hogares Heredia	Doméstico	Compañía
<i>Amazona autumnalis</i> (Lora) (3)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Hogar Alajuela	Doméstico	Compañía
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel) (3)	Asintomáticos	Hisopado cloacal	HEMS (Hogares San José)	Doméstico	Compañía
<i>Nymphicus hollandicus</i> (Cockatiel)	Asintomático	Hisopado cloacal	HEMS (Hogar Heredia)	Doméstico	Compañía
<i>Coturnix coturnix</i> (Codorniz)	Asintomático	Hisopado cloacal	Hogar San José	Doméstico	Producción
<i>Columba livia</i> (Paloma mensajera) (32)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Hogar San José	Doméstico	Producción
<i>Gallus gallus</i> (Gallina)	Asintomático	Sacos aéreos	Finca Alajuela	Doméstico	Producción
<i>Pavo cristatus</i> (Pavo real) (2)	Asintomáticos	Sacos aéreos	Finca Heredia	Doméstico	Producción
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelicano) (2)	Asintomáticos	Hisopado cloacal	Zoológico Puntarenas	Silvestre	Cautiverio
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelicano) (9)	Asintomáticos	Sacos aéreos	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Ramphastos sulfuratus</i> (Tucán)	Asintomático	Sacos aéreos	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Aterelix albiventris</i> (Erizo africano) (7)	Asintomáticos	Hisopado cloacal	Hogares San José	Doméstico	Compañía
<i>Bos Taurus</i> (Vaca) (4)	Asintomáticas	Hisopado vaginal	Finca Alajuela	Doméstico	Producción
<i>Bradypus variegatus</i> (Perezoso) (2)	Asintomáticos	Hisopado anal	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Saimiri sciureus</i> (Mono ardilla) (3)	Asintomáticos	Hisopado anal	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Cebus capucinus</i> (Mono cariblanco) (8)	Asintomáticos	Hisopado anal	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Equus caballus</i> (Caballo) (6)	Asintomáticos	Hisopado conjuntiv al	San José	Doméstico	Compañía

<i>Equus caballus</i> (Caballo) (7)	Asintomáticos	Hisopado conjuntiv al	Limón	Doméstico	Compañía
<i>Ovis aries</i> (Oveja) (12)	Asintomáticas	Hisopado vaginal	Finca San José	Doméstico	Producción
<i>Tamandua</i> spp. (Oso hormiguero) (3)	Asintomáticos	Hisopado anal	HEMS	Silvestre	Vida libre
<i>Boa constrictor</i> (Boa) (7)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Zoológico San José	Silvestre	Cautiverio
<i>Boa constrictor</i> (Boa) (11)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	HEMS	Silvestre	Cautiverio
<i>Boa constrictor</i> (Boa) (4)	Asintomáticas	Heces	HEMS	Silvestre	Cautiverio
<i>Crotalus simus</i> (Serpiente cascabel) (25)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Serpentario San José	Silvestre	Cautiverio
<i>Ctenosaura similis</i> (Saurio)	Asintomático	Hisopado cloacal	Zoológico Puntarenas	Silvestre	Cautiverio
<i>Trachemys</i> spp. (Tortuga)	Asintomática	Heces	Hogar Alajuela	Silvestre	Cautiverio
<i>Trachemys scripta</i> (Tortugas) (2)	Asintomáticas	Hisopado cloacal	Zoológico Puntarenas	Silvestre	Cautiverio

(¹) Número de animales analizados por especie, en caso de haberse analizado más de un animal.

Anexo 2: Soluciones utilizadas en el cultivo celular

Medio de transporte SPG (sacarosa/fosfato/glutamato)

- Sacarosa (74,6 g/L);
- KH₂PO₄ (0,512 g/L);
- KH₂PO₄ (1,237 g/L);
- Ácido L-glutámico (0,721 g/L).

Se puede esterilizar en autoclave o por filtración. A esto se de añadir suero fetal bovino (SFB) (10%), vancomicina, kanamicina y estreptomycin (200-500 µg/ml), anfotericina B y gentamicina (50 µg/ml). La adición de antibióticos reduce el efecto de la contaminación, aunque las muestras se envíen a temperatura ambiente. En ausencia de un almacenaje en refrigeración, el microorganismo sigue viable durante incluso 30 días y a 4°C durante incluso 34 días (Spencer & Johnson, 1983). Este medio también puede usarse como diluyente en el laboratorio y para congelar las clamidias.

Asimismo, se puede emplear como medio de transporte: Medio de Cultivo para células suplementado con SFB y los antibióticos descritos.

Medio de Cultivo para Células

Opción A: Medio DMEM (Gibco™ 11995065) (Glucosa (4500mg/L), Piruvato (110mg/L), 4mM de L-Glutamina (200mM 100X, estabilizado el pH con rojo fenol y 2.2 g/L de NaHCO₃) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino descomplementado y con antibióticos que no inhiban las clamidias (vancomicina,

kanamicina y estreptomina (200-500 µg/ml), anfotericina B y gentamicina (50 µg/ml)). Se conserva a 4°C.

Opción B:

Para 1000 ml:

- 1 sobre de MEM (Minimum Essential Medium) para 1 litro.
- Agua miliQ en cantidad suficiente.
- Agua destilada.
- Suero Fetal Bovino descomplementado (irradiado e inactivado a 56°C por 1 hora para eliminar complemento) (se conserva a -20°C hasta su uso).
- Buffer HEPES 1M (se conserva a 4°C).
- L-Glutamina 200mM 100X (se conserva a -20°C hasta su uso).
- NaOH 1N estéril.
- Aminoácidos no esenciales 10mM 100X (se conserva a 4°C).
- Gentamicina 40mg/mL (se conserva a 4°C).
- NaHCO₃ 7,5% estéril (se conserva a 4°C).

Preparación:

Se prepara primero el MEM, disolviendo el contenido del sobre en una pequeña porción de agua miliQ. Una vez disuelto completamente, se lleva el volumen a 820 ml con agua miliQ. Se fracciona en cinco frascos con 164 ml cada uno y se esteriliza a 121-124°C durante 15 min. Una vez frío, o a temperatura ambiente, se agrega a cada frasco en condiciones de esterilidad:

1. 20 ml Suero Fetal Bovino.
2. 3 ml buffer HEPES, de a 1 mL y agitando cada vez.
3. 3 ml glutamina.
4. 6 ml de NaHCO₃, de a 1 mL y agitando cada vez.
5. 2 ml de aminoácidos no esenciales.
6. 250 µl de gentamicina.
7. Agregar solución de NaOH gota a gota hasta lograr un rojo claro (unas 12 gotas aproximadamente). Vancomicina, kanamicina y estreptomina (200-500 µg/ml), anfotericina B y gentamicina (50 µg/ml). Se conserva a 4°C.

Medio de Infección

Preparación:

Misma que para medio de cultivo. Se conserva a 4°C. Antes de su uso se añade 1ml de solución 100 ug/ml de cicloheximida por cada 100ml de medio de infección, para una concentración final de cicloheximida en el medio de 1 ug/mL.

Medio de Congelamiento para Células

- Suero Fetal Bovino: 20% v/v.
- Dimetil Sulfóxido: 5% v/v.

- MEM: 75% v/v.

Solución para repique de las líneas celulares

- 0,7 g tripsina cristalizada.
- 2,24 g NaCl; 0,112 g KCl; 0,28 g glucosa.
- 0,1624 g NaHCO₃; 0,056 g EDTA Na₂
- 1,54 mL Rojo de fenol
- Agua miliQ

Preparación: se colocan 238 mL de agua miliQ en un Erlenmeyer, se agregan todos los componentes sólidos, de uno en uno y disolviendo totalmente cada uno antes de agregar el siguiente, se ajusta el pH a 7,4 empleando NaOH y HCl, luego se afora con agua miliQ hasta 280 mL. Se esteriliza por filtración, y se fracciona en botellas estériles en alícuotas de 40 mL. Se conserva a -20°C hasta su uso. Las botellas en uso se conservan a 4°C.

Subcultivo: Se realizan 3 lavados de la monocapa celular con 5 mL de solución de PBS. Se realiza el desprendimiento de las células de la botella de 25cm² con acción de 0,5mL de Tripsina / EDTA; 0.25% / 0.1%.

Buffer PBS (solución tamponada con Fosfato Salino)

Para 1000 ml:

- 8 g NaCl; 0,2 g KCl.
- 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄.
- Solución HCl 1N.
- Agua destilada: cantidad suficiente.

Preparación: Se pesan exactamente todos los componentes, y disolverlos completamente en 800 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4. Se adiciona agua destilada hasta llegar al volumen final. Se esteriliza a 121-124°C durante 15 minutos. Se conserva a temperatura ambiente.

Tinción Naranja de Acridina:

Transcurrido el tiempo de incubación de los cultivos celulares inoculados (48-72 horas), se puede tomar la placa y extraer cuidadosamente el medio de infección, con la precaución de no dañar el cultivo adherido al fondo del pozo. El cultivo celular (monocapa infectada) se fija colocando en cada pozo 1 ml de metanol puro durante 20 minutos al menos. Se retira restos de metanol y se deja secar al aire. Se tiñe con solución de Naranja de Acridina al 1% durante 10 minutos y posteriormente se descartó. Se realizan 3 lavados consecutivos con PBS y se observaron las placas con las células en microscopio de inmunofluorescencia con un aumento de 100x.