

Evidencia de *Chlamydia no psittaci* en psitácidos en cautiverio de Venezuela

Carlos Rodríguez-Leo¹ / Vianellys Hernández-Aguilera² / Daria Camacho³ / Yender Díaz⁴ / Sandra Abou Orm⁵

Resumen

Chlamydia psittaci (Cp) es una bacteria intracelular obligada causante de la clamidiosis aviar, capaz de infectar a más de 460 especies de aves. Sin embargo, desde 2008 han sido identificadas otras especies chlamydiales en aves de vida libre y en cautiverio. El presente estudio tuvo como objetivo la identificación de un segmento del gen 16s ADN de Cp a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada en dos psitácidos del género *Ara ararauna* y *Ara chloropterus* de un parque zoológico de Venezuela. Los resultados revelaron que las aves no poseían ADN compatible con Cp, pero sí para la familia Chlamydiaceae. En este sentido se aporta evidencia de la presencia de otra posible especie chlamydiales en las *Ara* muestreadas en estado portador asintomático. Dichas aves provenían de decomisos y se desconocía su origen. Estos factores favorecen la infección por otra especie de *Chlamydia*. Si bien los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos no fueron secuenciados, existen altas probabilidades de ser una *Chlamydia no psittaci* debido a que un elevado número de reportes a escala mundial afirman la capacidad de transmisión del resto de las especies en aves. En este sentido es necesaria la notificación de los hallazgos chlamydiales para el estudio de su capacidad patogénica en nuevos reservorios, riesgo zoonótico y la protección de la fauna silvestre y en cautiverio, principalmente la que se encuentra en riesgo de extinción.

Palabras clave: *Ara*, chlamydiales, PCR, reservorios.

- 1 Licenciado en Bioanálisis. Estudiante del Posgrado de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. Jefe del Laboratorio de investigación BIOBASE AGRO-LAB. Orcid: 0000-0002-8291-0563. ✉ leogod1985@hotmail.com
- 2 Licenciada en Bioanálisis. Estudiante del Posgrado de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas "Francisco Triana Alonzo" de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC). ✉ vianellys0102@hotmail.com.
- 3 Doctora en Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. Jefa del Lardidev. Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. "Francisco Triana Alonzo" de la Universidad de Carabobo. ✉ dcamacho7@uc.edu.ve
- 4 Licenciado en Bioanálisis. Adscrito al Laboratorio de Investigación Biobase Agrolab. ✉ diaz.yender@hotmail.com
- 5 MSc. en Ciencias Veterinarias, mención Microbiología, Universidad Central de Venezuela. Orcid: 0000-0002-7914-9611. ✉ santrax98@hotmail.com.

Cómo citar este artículo: Rodríguez-Leo C, Hernández-Aguilera V, Camacho D, Díaz Y, Abou Orm S. Evidencia de *Chlamydia no psittaci* en psitácidos en cautiverio de Venezuela. Rev Med Vet. 2018;(37):43-48. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss37.5>

Evidence of non-*psittaci* *Chlamydia* in parrots in captivity in Venezuela

Abstract

Chlamydia psittaci (Cp) is an obligate intracellular bacterium that causes avian chlamydiosis, capable of infecting more than 460 bird species. However, since 2008, other chlamydial species have been identified in free-living and captive birds. This study aimed to identify a segment of the 16s rDNA gene of Cp using nested polymerase chain reaction in two Psittacidae birds of the genus *Ara ararauna* and *Ara chloropterus* from a zoo in Venezuela. The results revealed that these birds did not have DNA compatible with Cp, but they did have for the *Chlamydiaceae* family. Thus, the paper evidences the presence of another possible chlamydial species in the sampled *Ara* in an asymptomatic carrier state. These birds were confiscated and their origin was unknown. These factors favor infection by another species of *Chlamydia*. Although the resulting polymerase chain reaction (PCR) products were not sequenced, there is a high probability of being a non-*psittaci* *Chlamydia*, because a large number of reports on a global scale affirm the transmission capacity of the rest of the species in birds. In this sense, it is necessary to report chlamydial findings in order to study their pathogenic capacity in new reservoirs,

zoonotic risk, and the protection of wildlife and animals in captivity, mainly those at risk of extinction.

Keywords: *Ara*, chlamydial, PCR, reservoirs.

Evidência de *Chlamydia não psittaci* em psitacídeos em cativeiro na Venezuela

Resumo

Chlamydia psittaci (*Cp*) é uma bactéria intracelular obrigada causadora da clamidiose aviar, capaz de infectar a mais de 460 espécies de aves. Entretanto, desde 2008 foram identificadas outras espécies chlamydiais em aves de vida livre e em cativeiro. O presente estudo teve como objetivo a identificação de um segmento do gene 16s ADNr de *Cp* através da reação em cadeia da polimerase aninhados em dois psitacídeos do género *Ara ararauna* e *Ara chloropterus* de um parque zoológico da Venezuela. Os resultados revelaram que as aves não possuíam DNA compatível com *Cp*, mas sim para a família Chlamydiaceae. Neste sentido se aponta evidência da presença de outra possível espécie chlamydial nas *Ara* amostradas em estado portador assintomático. Tais aves provinham de apreensões e se desconhecia sua origem. Estes fatores favorecem a infecção por outra espécie de *Chlamydia*. Ainda que os produtos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) obtidos não foram sequenciados, existem altas probabilidades de ser uma *Chlamydia não psittaci* devido a que um elevado número de relatos em escala mundial afirma a capacidade de transmissão do resto das espécies em aves. Neste sentido é necessária a notificação das descobertas chlamydiais para o estudo de sua capacidade patogênica em novos reservatórios risco zoonótico e a proteção da fauna silvestre e em cativeiro, principalmente a que se encontra em risco de extinção.

Palavras-chave: *Ara*, chlamydial, PCR, reservatórios.

INTRODUCCIÓN

Los psitaciformes, mejor conocidos como loros, guacamayos, pericos y cacatúas, se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo. Se agrupan en 84 géneros y 398 especies (1). Son aves de elevado interés biológico y comercial, víctimas del tráfico ilegal debido sus atractivos colores y fácil domesticación (2,3). El 28% de los psitaciformes se encuentran en estado de conservación crítico, lo cual atenúa el número de ejemplares en vida libre (1) e incrementa la cantidad de psitácidos en cautiverio, lo que predispone la adquisición de agentes infecciosos como *Chlamydia*, género de elevada frecuencia en el reino animal (4).

Actualmente *Chlamydia* es el único género perteneciente a la familia Chlamydaceae (5,6). Se describe como bacteria intracelular obligada con una elevada virulencia. *Chlamydia psittaci* (*Cp*) posee la capacidad de infectar a más de 460 especies de aves (7); es un agente causal de clamidiosis aviar en aves, mamíferos y humanos, asociada a neumonía, pericarditis, peritonitis, hepatitis y esplenitis (7,8). La gravedad de los síntomas clínicos dependerá del sistema inmunitario, edad, estado general del huésped y de la cepa chlamydial (7,9). *C. trachomatis* posee la capacidad de generar tracoma en animales y humanos, y en estos últimos puede originar infecciones urogenitales, linfogranuloma venéreo e infertilidad. *C. abortus* produce abortos en mamíferos rumiantes y hu-

manos (10). *C. pneumoniae* en inicio fue considerado un patógeno exclusivamente humano; sin embargo, puede causar infecciones oculares, respiratorias y urogenitales en koalas, equinos, anfibios y reptiles. *C. pecorum* ocasiona infecciones genitales que pueden ser transmitidas por vía sexual, siendo aislada en semen y muestras de heces de porcinos (11). *C. suis*, *C. felis*, *C. muridarum* y *C. caviae* conforman el resto de las especies chlamydiales (7,8).

Recientemente fueron identificadas tres nuevas especies de chlamydias: *C. ibidis*, aislada en ibis sagrado (*Threskiornis aethiopicus*) (12); *C. avium*, detectada en columbiformes y psitaciformes, y *C. gallinácea*, en aves de corral (13,14). Ascendieron a doce el número de especies chlamydiales. Los aislamientos de chlamydias continúan originándose, por ello existe la posibilidad de descubrir nuevas especies. Szymanska-Czerwinka et al. (15) afirman que la variedad de especies chlamydiales aún continúa incompleta y las ya identificadas se adaptan a huéspedes susceptibles, lo que genera nuevos reservorios para identificar.

De forma reiterada se han producido aislados de *Chlamydia no psittaci* en aves de vida libre y cautiverio, como *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum* y *C. abortus* detectadas en passeriformes, psitaciformes, columbiformes y en humanos (11,16,17), así como la detección del genotipo WC de *Cp* en passeriformes de vida libre (11). De este modo, se manifiesta la capacidad evolutiva de la familia Chlamydiaceae, en la que *Cp* era la única especie causante de infecciones aviares y ahora otras chlamydias se están adaptando a huéspedes susceptibles. Esto trae nuevos reservorios con riesgo de generar manifestaciones clínicas severas que en algunos casos pueden ser fatales para la vida del animal. En este sentido, es necesaria la notificación de nuevos aislamientos chlamydiales que faciliten la identificación de nuevas especies y reservorios para la determinación de capacidad patogénica y el potencial zoonótico que genera riesgo para la salud pública. Por ello se planteó en este trabajo la identificación de un segmento del gen 16s ADN_r de *Cp* a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada en hisopados cloacales de dos psitácidos del género *Ara* en condición de cautiverio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante 2016 se realizó un estudio de tipo descriptivo y corte transversal en un parque zoológico de Venezuela; fueron muestreados dos de ocho ejemplares pertenecientes a las especies *Ara ararauna* y *Ara chloropterus*, ubicadas en el aviario principal de dicho parque. Los ocho ejemplares fueron sometidos a una evaluación clínica. Estos demostraron poseer buen peso, tamaño y coloración de plumas, así como la ausencia de síntomas respiratorios, neurológicos y gastrointestinales. De este modo, fue descartada la presencia de signos clínicos de clamidiosis aviar.

A pesar de la ausencia de signos clínicos de clamidiosis aviar, fueron seleccionadas dos aves del género *Ara* y recolectados cuatro hisopados cloacales por cada psitácido para el descarte de *Cp* (18). La manipulación de las aves fue realizada de acuerdo con la *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio* del Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council, y con la autorización de la Dirección General de Diversidad Biológica, a través del permiso para el acceso a recursos genéticos (oficio 0283) y la licencia de caza (folio 1370) entregado por el Ministerio del Poder Popular de Ecosocialismo y Aguas de la República Bolivariana de Venezuela. Una vez obtenidas las muestras fueron refrigeradas y transportadas al Laboratorio 8, sección de biología molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana-Alonso” (Biomed-UC), donde fueron almacenadas a -70 °C hasta realizar el protocolo de extracción y purificación de ADN.

El aislamiento del ADN bacteriano se realizó a través de la extracción con solventes orgánicos y precipitación con alcohol, mediante el protocolo de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (19). Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de PCRa, descrita por Rodríguez-Leo et al. (19), la cual emplea en la primera reacción de PCR un par de cebadores específicos sentido *Cp1F* (ACG GAA TAA TGA CTT CGG), antisentido *Cp1R* (TAC CTG GTA CGC TCA ATT. T), dirigidos a los miembros de la familia Chlamydiaceae, específicamente a la secuencia de una porción del gen 16s ADN_r, donde se

esperaba un amplicón de 436 pb. Posteriormente, en la segunda reacción de amplificación se utilizó un segundo par de cebadores dirigidos a las regiones variables de la especie *Cp* CpintF sentido (ATA ATG ACT TCG GTT GTT ATT) y CpintR antisentido (TGT TTT AGA TGC CTA AAC AT), que se une a las copias de secuencias de los productos formados en la primera reacción de PCR, a partir de los cebadores dirigidos a los miembros de la familia antes mencionada. En esta segunda reacción se esperaba obtener un amplicón de 126 pb. Fue utilizado como control positivo el ADN de *Cp* (CP018) donado por el laboratorio de biología molecular de la Universidad del Zulia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron la amplificación de un fragmento de ADN de 436 pb correspondiente a la familia Chlamydiaceae. Sin embargo, en estos casos no se originó el segundo producto de 126 pb correspondiente a la región del gen 16S ADNr de *Cp*. En este sentido, las aves no poseían infección por *Cp*, pero sí poseían ADN complementario para la familia Chlamydiaceae. Dicho resultado permite inferir sobre la posible presencia de otra especie de Chlamydia.

Hasta 2008, se desconocía la presencia de nuevas especies del género *Chlamydia* que actualmente se encuentran documentadas (*C. ibidis*, *C. avium* y *C. gallinacea*) y de su capacidad infecciosa en aves psitácidas (11,13,14,20). Al igual que la presente investigación, Origlia et al. (21) obtuvieron aislamientos positivos solo para la familia Chlamydiaceae. Sin embargo, al emplear la secuenciación nucleotídica no se relacionaron con *Cp*. En este estudio, por limitaciones económicas, no se logró realizar la secuenciación de los productos obtenidos para la familia Chlamydiaceae. Esto hubiera sido altamente significativo para la identificación de la especie chlamydial que se encontraba presente en dichas aves. Es importante señalar que se desconocía el origen de estos ejemplares provenientes de incautas; de este modo, incrementa el riesgo de infección por cualquiera otra especie chlamydial.

La evidencia solo de ADN complementario para la familia Chlamydiaceae no descarta completamente la presencia *Cp* debido a que esta posee una elevada tasa de recombinación homóloga en varios sitios de su genoma (22). Sin embargo, han sido reportadas cepas de *Cp* con secuencias similares a otras especies, como la cepa 84/2334 de *Cp* que posee mayor similitud a *C. abortus* (23). Estos aislamientos son cada vez más frecuentes. Nuevamente fue identificado en aves de centros de rehabilitación un nuevo genotipo de Chlamydia que al estudio filogenético se encuentra más próximo a *C. abortus*. De esta forma, proponen que esta especie, además que ser aislada en mamíferos, debe ser reconocida como causante de infecciones atípicas en aves (24).

En este sentido, existen aislados de *Cp* que poseen mayor relación filogenética con otra especie chlamydial. En Venezuela fueron detectados 93 % de anticuerpos contra *Cp*, mediante una técnica dirigida a la *principal proteína de membrana externa* de la familia Chlamydiaceae. Dichos anticuerpos podían reaccionar contra otras especies de chlamydias, pero debido a las limitaciones de la técnica no fueron identificadas (25). Estos resultados demuestran la necesidad de identificar, nuevamente, los aislados de chlamydias y aplicar una caracterización molecular para confirmar si todos corresponden a *Cp*, si existe una coinfección con otra especie chlamydial o si hay un nuevo genotipo circulante.

El aumento de la diversidad genética en la familia Chlamydiaceae y su capacidad de infectar nuevos huéspedes ha generado un abanico de nuevas posibilidades diagnósticas en esta familia de bacterias, con genotipos altamente heterogéneos (26). Esto representa nuevos retos para la identificación y el control en poblaciones de animales silvestres y en cautiverio que posean mayor vulnerabilidad a ser infectadas por especies chlamydiales. Es por ello por lo que la identificación de hallazgos sobre la familia Chlamydiaceae es de vital importancia y necesaria para el entendimiento de su biología, principalmente en países como Venezuela, que alberga 1361 especies de aves y cuenta con 350 especies de mamíferos, entre las cuales 28 son autóctonas (27). Este país, al igual que los del resto del continente americano, debe

velar por la preservación y conservación de estas especies, sobre todo aquellas que se encuentran en riesgo de extinción y en estado de cautiverio sin posibilidades de reincorporación a su estado silvestre.

AGRADECIMIENTOS

A los médicos veterinarios Dulce Benavides y Gerardo González, por su colaboración para la ejecución de la presente investigación y por demostrar un elevado compromiso con la preservación de las aves en cautiverio de Venezuela, y a la MSc. Marifel Carrozza, por su apoyo y capacitación técnica para la ejecución de la investigación.

REFERENCIAS

- Olah G, Butchart S, Symes A, Medina I, Cunningham R, Brightsmith DJ, Heinsohn R. Ecological and socio-economic factors affecting extinction risk in parrots. *Biodivers Conserv*. 2016;25(2):205-23. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-1036-z>
- Birdlife International Americas. Project: building the foundation for effective conservation of Vinaceous Amazon Parrot (*Amazona vinacea*) in Paraguay. Birdlife International. [internet]. 2013 [citado 2016 oct. 25] Disponible en: <http://www.birdlife.org/americas/news/project-building-foundation-effective-conservation-vinaceous-amazon-parrot-amazona>.
- Bravo A, Porzencanski AL. Overexploitation of parrots in the neotropics. *Lessons in Conservation*. 2014;(4):45-50.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;(451):990-3.
- Kuo CC, Stephens RS, Bavoil PM, Kaltenboeck B. Genus *Chlamydia*. Jones, Rake and Stearns 1945, 55. En: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB, editores. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2a. ed. Heidelberg: Springer; 2011. p. 846-65.
- Bavoil P, Kaltenboeck B, Greub G. In *Chlamydia veritas*. *Pathog Dis*. 2013;67(2):89-90.
- Organismo Internacional de Epizootia. Clamidirosis Aviar. Manual de la OIE sobre animales terrestres [internet]. 2012 [citado 2016 oct. 25]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.01_Clamidirosis_aviar.pdf
- Balsamo G, Maxted A, Midla J, Murphy J, Wohrle R, Edling T, et al. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (Avian chlamydiosis). *J Avian Med Surg*. 2017;31(3):1-21.
- Mitura A, Szymańska-Czerwińska M, Niemczuk K, Anara J. *Chlamydia* in birds-occurrence, new species and zoonotic potential-a review. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2014;58(4):503-6. <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0076>
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Chlamydia y Chlamydophila*. En: *Microbiología médica*. 7a. ed. Barcelona: Elsevier; 2013. p. 441-9.
- Frutos MC, Monetti MS, Vaulet LG, Cadario ME, Fermepin MR, Ré VE, Cuffini CG. Genetic diversity of *Chlamydia* among captive birds from central Argentina. *Avian Pathol*. 2015;44(1):50-6. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.993593>
- Vorimore F, Hsia R-C, Huot-Creasy H, Bastian S, Deryuter L, Passet A, et al. Isolation of a new *Chlamydia* species from the feral sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS One*. 2013;8(9):e74823.
- Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy HH, et al. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2014;37(2):79-88.
- Guo W, Li J, Kaltenboeck B, Gong J, Fan W, Wang Ch. *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Sci Rep*. 2016;6:19638. <https://doi.org/10.1038/srep19638>
- Szymaska-Czerwinska M, Niemczuk K, Sachse K, Mitura A, Karpinska TA, Reichert M. Detection of a new non-classified *Chlamydia* species in hens in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2013;57(1):25-8. <https://doi.org/10.2478/bvip-2013-0005>

16. Pantchev A, Sting R, Bauerfeind R, Tyczka J, Sachse K. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet J.* 2009;181(2):145-50.
17. Sachse K, Kuehlewind S, Ruettger A, Schubert E, Rohde G. More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. *Vet Microbiol.* 2012;157(3-4):476-80.
18. Rodríguez-Leo C, Camacho D, Hernández V, Briceño A, Mora M, Perez L, Prieto K. *Chlamydia psittaci* en aves en cautiverio del Aquarium de Valencia, Venezuela. *Saber.* 2017;29:801-8.
19. Rodríguez-Leo C, Hernández V, Abou Orm S, Díaz Y, Camacho D, Arraiz N, Useche E. *Chlamydia psittaci* en aves Psitácidas en dos parques zoológicos de Venezuela. *Acta Biol Colomb.* 2017;22(3):394-7.
20. Zocevic A, Vorimore F, Vicari N, Gasparini J, Jacquin L, Sachse K, et al. A real-time PCR assay for the detection of atypical strains of chlamydiaceae from pigeons. *PLoS One.* 2013;8(3):e58741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058741>
21. Origlia J, López N, Cadario M, Arias N, Netri C, Florencia M, et al. Detección de *Chlamydia psittaci* en aves mascotas y de producción durante marzo de 2013 a marzo de 2014. *Rev Argent Zoonosis Enferm Infec Emerg.* 2015;10(2):51-2.
22. Read TD, Joseph SJ, Didelot X, Liang B, Patel L, Dean D. Comparative analysis of *Chlamydia psittaci* genomes reveals the recent emergence of a pathogenic lineage with a broad host range. *MBio.* 2013;4(2):e00604-12.
23. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DSA, Jolley KA, Keijzers WC, Evangelia Vretou E, et al. Multi locus sequence typing of chlamydia reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species. *PLoS One.* 2010;5(12):e14179.
24. Szymańska-Czerwińska M, Mitura A, Niemczuk K, Zaręba K, Jodeoko A, Pluta A, et al. Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: Isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174599.
25. Rodríguez C, Mogollón C, Nazila B, Fernández E. Detección de anticuerpos IgG contra *Chlamydophila psittaci* en aves psitácidas en cautiverio Maracay, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2011; 31:26-30.
26. Rodríguez-Leo C, Camacho D, Hernández V, Vietri M, Flores C, Henríquez H, González M. Primera evidencia de *Chlamydia psittaci* en hurón sable (*Mustela putorius furo*) en Venezuela. *Rev Med Vet Zoot.* 2018;65(2):172-8. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v65n2.75639>
27. Giraldo D, Rojas-Suárez F, Romero V. Una mano a la naturaleza, conservando las especies amenazadas venezolanas. Venezuela: Ediciones Provita y Shell Venezuela; 2009.