

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Determinación de la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae  
mediante reacción en cadena de la polimerasa PCR en las aves  
psittaciformes de dos centros de manejo de fauna silvestre: Zoológico de  
Quito en Guayllabamba y Centro de Rescate Hacienda Santa Martha**

**Viviana Valdivieso Vega**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito, Abril 2010

**Universidad San Francisco de Quito**

**Universidad San Francisco de Quito  
Colegio de Ciencias de la Salud  
Programa de Medicina Veterinaria**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Determinación de la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae  
mediante reacción en cadena de la polimerasa PCR en las aves  
psittaciformes de dos centros de manejo de fauna silvestre: Zoológico de  
Quito en Guayllabamba y Centro de Rescate Hacienda Santa Martha**

**Viviana Valdivieso Vega**

Dr. Gabriel Trueba  
Director de la Tesis

.....

Dra. Ivette Dueñas  
Miembro del Comité de Tesis

.....

Dr. Andrés Ortega  
Miembro del Comité de Tesis

.....

Dr. Germán Romo  
Miembro del Comité de Tesis

.....

Dr. Luis Donoso  
Director del Programa de  
Medicina Veterinaria

.....

Quito, Abril 2010

© Derechos de Autor  
Viviana Valdivieso Vega  
2010

## Resumen

*Chlamydophila psittaci*, conocida anteriormente como *Chlamydia psittaci*, es una bacteria intracelular obligada que infecta a personas y a una gran variedad de animales (Everett *et al*, 1999). Con más de 400 especies afectadas, las aves psittaciformes son uno de los principales reservorios de este patógeno (Kaleta y Taday, 2003), lo cual convierte a estas aves en un factor importante para la transmisión a humanos.

Tanto la psitacosis (enfermedad en humanos) como la clamidiosis aviar (enfermedad en aves) es difícil de diagnosticar ya que puede variar desde un cuadro respiratorio leve hasta una enfermedad sistémica que puede causar la muerte (Ecco *et al*, 2009; Petrovay y Balla, 2008). Las aves afectadas pueden estar incluso clínicamente sanas, a pesar de lo cual diseminan la bacteria en el medio ambiente (Maluping *et al*, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae en las aves psittaciformes de dos centros de manejo de fauna silvestre de Pichincha: Zoológico de Quito en Guayllabamba y Centro de Rescate Hacienda Santa Martha, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se obtuvieron 39 muestras fecales: 12 hisopos cloacales, 20 hisopos fecales, y 7 citobrush cloacales. Dos muestras fueron positivas a bacterias de la familia Chlamydiaceae, de acuerdo al análisis de regresión lineal, lo que indica que esta bacteria está presente en las aves de los dos centros de manejo de fauna silvestre.

Palabras clave: *Chlamydophila psittaci*, aves psittaciformes, psitacosis, clamidiosis aviar, PCR

## Abstract

*Chlamydophila psittaci*, formerly known as *Chlamydia psittaci*, is an obligate intracellular bacterium that infects humans and a wide range of animals (Everett *et al*, 1999). With more than 400 species susceptible, psittaciformes birds are one of the most important hosts of this pathogen, which gives them an important role in the transmission for humans (Kaleta y Taday, 2003).

Psitacosis (disease in humans) as well as avian chlamydiosis (disease in birds) is difficult to diagnose as it may vary from a mild respiratory disease to a systemic illness which can lead to death (Ecco *et al*, 2009; Petrovay y Balla, 2008). It is even possible that infected birds are asymptomatic; nevertheless they continue shedding the organism in the environment (Maluping *et al*, 2007).

The aim of this study was to determine the presence of bacteria from the Chlamydiaceae family among psittaciformes birds, in two wildlife management centres from Pichincha: Zoológico de Quito en Guayllabamba and Centro de Rescate Hacienda Santa Martha,

We obtained 39 fecal samples: 12 cloacal swabs, 20 fecal swabs and 7 cloacal citobrushs. Two samples were positive to bacterium from the Chlamydiaceae family, according to a lineal regression analysis, which means this bacterium is present among the birds in the two centres.

Key words: *Chlamydophila psittaci*, psittaciformes, avian chlamydiosis, psittacosis, PCR

## Tabla de contenido

|                                                                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                                                                                 | <b>8</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                    | <b>10</b> |
| 2.1. Objetivo general .....                                                                                                                                  | 10        |
| 2.2. Objetivos específicos.....                                                                                                                              | 10        |
| <b>3. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....</b>                                                                                                                     | <b>11</b> |
| 3.1 Clasificación taxonómica .....                                                                                                                           | 11        |
| 3.2. Ciclo evolutivo .....                                                                                                                                   | 13        |
| 3.3. Hospedadores aviares .....                                                                                                                              | 14        |
| 3.4. <i>Chlamydophila psittaci</i> en aves: clamidiosis aviar.....                                                                                           | 15        |
| 3.4.1. Transmisión .....                                                                                                                                     | 15        |
| 3.4.2. Signos clínicos.....                                                                                                                                  | 16        |
| 3.4.3. Tratamiento.....                                                                                                                                      | 17        |
| 3.4.4. Diagnóstico.....                                                                                                                                      | 17        |
| 3.4.5. Prevalencia de <i>Chlamydophila psittaci</i> mediante PCR en las aves psittaciformes .....                                                            | 23        |
| 3. 5. <i>Chlamydophila psittaci</i> en humanos.....                                                                                                          | 24        |
| 3. 6. Estudios sobre <i>Chlamydophila psittaci</i> en el Ecuador.....                                                                                        | 26        |
| <b>4. METODOLOGÍA.....</b>                                                                                                                                   | <b>28</b> |
| 4.1. Área de estudio .....                                                                                                                                   | 28        |
| 4.1.1. Zoológico de Quito en Guayllabamba.....                                                                                                               | 28        |
| 4.1.2. Centro de Rescate Hacienda Santa Martha .....                                                                                                         | 28        |
| 4.2 Factores de estudio .....                                                                                                                                | 29        |
| 4.3. Materiales .....                                                                                                                                        | 29        |
| 4.3.1. Campo.....                                                                                                                                            | 29        |
| 4.3.2. Laboratorio .....                                                                                                                                     | 30        |
| 4.4. Métodos .....                                                                                                                                           | 33        |
| 4.4.1. Muestreo .....                                                                                                                                        | 33        |
| 4.4.2. Extracción de ADN por el método de CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amónico).....                                                                      | 34        |
| 4.4.3. Valoración del ADN de las muestras en un espectrofotómetro.....                                                                                       | 35        |
| 4.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers que amplifican la subunidad 16S rRNA de bacterias (Muyzer et al, 1993).....                     | 35        |
| 4.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen 16S rRNA de las bacterias de la familia Chlamydiaceae (Condon y Oakey, 2007)..... | 36        |
| 4.4.6. Electroforesis en gel de agarosa .....                                                                                                                | 37        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                   | <b>40</b> |
| 5.1. Muestras del Zoológico de Quito en Guayllabamba .....                                                                                                   | 40        |
| 5.2. Muestras del Centro de Rescate Hacienda Santa Martha .....                                                                                              | 40        |
| 5.3. Valoración del ADN de las muestras en un espectrofotómetro.....                                                                                         | 40        |
| 5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....                                                                                                          | 40        |
| <b>6. DISCUSIÓN .....</b>                                                                                                                                    | <b>42</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES .....</b>                                                                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>8. RECOMENDACIONES .....</b>                                                                                                                              | <b>48</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>                                                                                                                                     | <b>50</b> |

## **LISTA DE TABLAS Y FIGURAS**

**Tabla 1: Especies y número de aves muestreadas en el Zoológico de Quito en Guayllabamba.**

**Tabla 2: Especies y número de aves muestreadas en el Centro de Rescate Hacienda Santa Martha.**

**Tabla 3: Valoración de la calidad del ADN de las muestras en un espectrofotómetro.**

**Tabla 4: Número de aves positivas de acuerdo a la procedencia y a la toma de las muestras.**

**Figura 1: Amplicones específicos de Chlamydiaceae obtenidos a partir de muestras fecales, separados en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.**

**Figura 2: Amplicones específicos de bacteria obtenidos a partir de muestras fecales, separados en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.**

**Figura 3: Amplicones específicos de Chlamydiaceae obtenidos a partir de muestras fecales de aves, separados en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Muestras 21-30.**

**Figura 4: Amplicones específicos de Chlamydiaceae obtenidos a partir de muestras fecales de aves, separados en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Muestras 1-12 y 31-33.**

**Figura 5: Amplicones específicos de Chlamydiaceae obtenidos a partir de muestras fecales de aves, separados en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Muestras 13-20 y 34-39.**

**Figura 6: Amplicones específicos de Chlamydiaceae obtenidos a partir de muestras fecales de aves, separados en electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Amplicones 13-20 y 34-39.**

**Figura 7: Regresión lineal de los resultados de tamaños de las bandas**

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias de la familia Chlamydiaceae son pequeñas bacterias Gram negativas, intracelulares obligadas, responsables de transmitir enfermedades a humanos y a una gran variedad de animales, entre ellos muchas especies aviares tanto domésticas como silvestres (Schwarzová *et al*, 2006; Everett *et al*, 1999). El orden de las psittaciformes parece ser uno de los reservorios principales de *Chlamydophila* spp. (Kaleta y Taday, 2003), lo cual convierte a estas aves en un factor importante para la transmisión de la bacteria a humanos (Kaibu *et al*, 2006).

La clamidiosis aviar, como se denomina a la enfermedad en aves, se puede confundir con cualquier enfermedad infecciosa ya que las aves no presentan síntomas específicos (Smith *et al*, 2008; Raso *et al*, 2004). Las aves infectadas pueden estar clínicamente sanas, a pesar de lo cual diseminan la bacteria, infectando así tanto a aves como a humanos que entran en contacto con ellas (Ecco *et al*, 2009; Maluping *et al*, 2007).

Todas las personas en contacto con aves están en riesgo de contraer psitacosis, (infección por *Chlamydophila psittaci*), especialmente quienes manejan aves silvestres (Vanrompay *et al*, 2007; Heddema *et al*, 2006a; León *et al*, 2005). También están en riesgo todas las personas que visitan lugares donde exista alta densidad de aves, ya que una breve exposición a las aves infectadas puede resultar en la transmisión de la bacteria (Koene *et al*, 2007; Matsui *et al*, 2007).

En nuestro país, solo se conoce de investigaciones que han encontrado *Chlamydophilla psittaci* en aves de vida libre en las Islas Galápagos; en pingüinos (Travis *et al*, 2006a), en cormoranes no voladores (Travis *et al*, 2006b), y en tórtolas (Padilla *et al*, 2004). Hasta donde se ha podido investigar, parecería que no hay estudios acerca de la presencia de *Chlamydophilla psittaci* en aves exóticas en cautiverio en Ecuador. El



propósito del presente estudio es determinar la presencia de estas bacterias en las aves psittaciformes de dos centros de manejo de fauna silvestre ecuatorianos, localizados en la provincia de Pichincha: Zoológico de Quito en Guayllabamba y Centro de Rescate Hacienda Santa Martha, mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae en las aves psittaciformes mantenidas en cautiverio en dos centros de manejo de fauna silvestre de Pichincha, el Zoológico de Quito en Guayllabamba y el Centro de Rescate Hacienda Santa Martha, mediante reacción en cadena de la polimerasa.

### **2.2. Objetivos específicos**

**2.2.1.** Tomar muestras fecales de aves psittaciformes mantenidas en cautiverio en dos centros de manejo de fauna silvestre: Zoológico de Quito en Guayllabamba y Centro de Rescate Hacienda Santa Martha en Tambillo.

**2.2.2.** Extraer el ADN de las muestras obtenidas en los dos centros mediante el método de CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amónico).

**2.2.3** Amplificar el gen 16S rRNA específico de bacterias de la familia *Chlamydiaceae* mediante PCR.

**2.2.4.** Observar los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

**2.2.5.** Determinar si los productos obtenidos en la PCR corresponden a bacterias de la familia Chlamydiaceae, de acuerdo a la distancia que migraron en el gel de agarosa, mediante análisis de regresión lineal.

### 3. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 3.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica actual de esta bacteria fue propuesta por Everett *et al* (1999), y se basa en los análisis de secuencia de los genes 16S y 23S rRNA. Las bacterias del orden de las Chlamydiales se dividen ahora en cuatro familias: *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* y *Waddliaceae*. La familia *Chlamydiaceae* comprende dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*. *Chlamydia* comprende las especies *trachomatis*, *muridarum* y *suis*, en tanto que el género *Chlamydophila* abarca las especies *psittaci*, *pneumoniae*, *pecorum*, *caviae*, *felis* y *abortus*. Las bacterias del género *Chlamydia* tienen un genoma de 1.0 a 1.1 Mpb, y todas producen glucógeno. El gen 23S rRNA se diferencia en menos del 2% entre estas especies (Everett *et al*, 1999).

*Chlamydia trachomatis* ahora solo incluye las bacterias que afectan a humanos, en los cuales produce tracoma, infecciones venéreas, artritis, conjuntivitis y neumonía neonatal. La bacteria tiene 18 serovares que se distribuyen en dos biovares, el biovar tracoma que contiene 14 serovares y afecta principalmente a células de las membranas mucosas, y el biovar linfogranuloma venéreo que agrupa 4 serovares que afectan el tejido linfático primordialmente (Everett *et al*, 1999). *Chlamydia muridarum* es ahora una bacteria que solo afecta a ratones y hámsters, y que anteriormente estaba considerada dentro de *Chlamydia trachomatis* (Everett *et al*, 1999). *Chlamydia suis* es una bacteria recientemente descubierta que afecta únicamente al cerdo, en quien produce conjuntivitis, enteritis y neumonía. La elevada incidencia de esta bacteria en el intestino del cerdo hace pensar que tal vez sea endémica en esta especie (Everett *et al*, 1999).

El género *Chlamydophila* contiene seis especies: *pecorum*, *pneumoniae*, *abortus*, *felis*, *caviae* y *psittaci*. Las bacterias de este género tienen un genoma de alrededor de 1.2

Mpb, y no producen glucógeno. La secuencia del gen 23S rRNA varía en menos del 5% entre estas especies (Everett *et al*, 1999).

*Chlamydophila pecorum* es una bacteria de los mamíferos, siendo sus hospedadores variados ya que ha sido aislada en rumiantes (vacas, ovejas y cabras), en un marsupial (koala) y en porcinos. En los koalas la bacteria tiene efectos en el tracto reproductivo y en el sistema urinario. En los demás animales provoca conjuntivitis, abortos, encefalomiелitis, enteritis, neumonía y poliartritis (Everett *et al*, 1999). *Chlamydophila pneumoniae*, que es una bacteria primordialmente respiratoria, ha sido aislada en humanos, koalas y equinos (Everett *et al*, 1999), y también en reptiles (Soldati *et al*, 2004). *Chlamydophila abortus* es endémica entre los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos), en quienes produce abortos y terneros débiles. Se han confirmado casos esporádicos de abortos debido a esta bacteria en mujeres que estaban expuestas a ella a través de las ovejas (Everett *et al*, 1999). *Chlamydophila felis* afecta principalmente al gato, en quien produce conjuntivitis y rinitis, y también se han confirmado casos de infección en humanos (Everett *et al*, 1999). *Chlamydophila caviae* ataca a los cuyes, en quienes produce conjuntivitis, y una infección del tracto genital parecida a la infección en humanos (Everett *et al*, 1999).

*Chlamydophila psittaci* es una bacteria cuyo hospedador principal son las aves, aunque también puede afectar a mamíferos incluyendo a los humanos. El mayor reservorio de esta bacteria son las aves del orden de los psittaciformes (Everett *et al*, 1999).

*Chlamydophila psittaci* tiene varios serovares o genotipos, dependiendo de si son identificados mediante anticuerpos monoclonales (Vanrompay *et al*, 1993), o por secuenciación o análisis de restricción enzimática del gen *ompA* (Pannekoek, 2006; Geens *et al*, 2005b; Everett *et al*, 1999) respectivamente. Es posible encontrar los mismos serovares o genotipos en distintos hospedadores así como varios genotipos en un mismo hospedador (Geens *et al*, 2005b). Las aves psittaciformes son el hospedador natural del

serovar A, que es el más común de todos los serovares, y el responsable de la mayoría de los casos de zoonosis (Heddema *et al*, 2006a; Andersen, 2005). En pavos también se ha encontrado el serovar A (Verminnen *et al*, 2008). El serovar B se encuentra en las palomas, tórtolas y pavos (Heddema *et al*, 2006b; Andersen, 2005; Geens *et al*, 2005a). El serovar C ha sido aislado en pavos, patos (Geens *et al*, 2005b). El serovar D ha sido aislado de pavos, y se le atribuye junto con el serovar C, los casos de zoonosis en mataderos (Everett *et al*, 1999). El serovar E se aisló en humanos, patos y palomas. Otro serovar, el E/B se ha encontrado en pavos (Geens *et al*, 2005a), patos (Geens *et al*, 2005b), y también en algunos casos de infección en psitácidos y en humanos (Harkinezhad *et al*, 2007).

El estudio de Pannekoek (2006), reveló la presencia de los genotipos A, B, C y 05/02 (un nuevo genotipo parecido a la cepa 6BC de *Chlamydophila psittaci*) en personas diagnosticadas con psitacosis.

### **3.2. Ciclo evolutivo**

Las bacterias del orden de las Chlamydiales son bacterias intracelulares obligadas que se multiplican dentro de inclusiones citoplasmáticas al interior de las células eucarióticas, y cuyo ciclo evolutivo se divide en dos fases, una infectante en forma de cuerpo elemental, y una reproductiva, en forma de cuerpo reticulado. Los cuerpos elementales son circulares, miden entre 0.2 y 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro, y son altamente electrodensos (Everett *et al*, 1999).

El ciclo de vida de las clamidias inicia cuando los cuerpos elementales ingresan mediante endocitosis al citoplasma de las células eucarióticas, donde al poco tiempo sufren un proceso de diferenciación, mediante el cual crecen hasta tener un diámetro de 0.6 a 1.5  $\mu\text{m}$ , pierden la capacidad de infectar, alteran la membrana celular, aumentan el número de

ribosomas y la actividad metabólica. Los cuerpos reticulados, como se llaman en ese momento, se multiplican por fisión binaria al interior de las inclusiones citoplasmáticas que se forman por transformación de la membrana fagocítica que envuelve al cuerpo elemental. A las 20 horas post infección, los cuerpos reticulados han disminuido su tamaño, se han vuelto electrodensos y su pared celular se ha vuelto más rígida, diferenciándose en cuerpos elementales nuevamente. A las 40 horas post infección hay un gran número de cuerpos elementales listos para ser expulsados de la célula, ya sea por rompimiento de la inclusión citoplasmática o por fusión de su membrana con la membrana plasmática de la célula del hospedador. Todo el ciclo dura unas 48 horas aproximadamente. Al romperse las células eucarióticas se liberan los cuerpos elementales, cuerpos reticulados y formas intermedias (Everett *et al*, 1999; Moulder, 1991).

Las bacterias se replican localmente, y luego invaden otros órganos a través del sistema circulatorio (Andersen, 1996). Las inclusiones citoplasmáticas son un tipo único de vacuola que no sufre procesos de acidificación, o de fusión lisosomal (Everett *et al*, 1999). Los antibióticos interrumpen la eliminación de la bacteria al medio ambiente, ya que pueden inhibir la transformación de los cuerpos elementales hacia cuerpos reticulados. En el estudio de Vanrompay *et al*, 2007, en el cual se evaluó la presencia de *Chlamydophila psittaci* en criaderos de psittaciformes en Bélgica, no se pudo aislar el organismo en los centros que usaban antibióticos regularmente, mas sí se encontró la bacteria mediante PCR.

### **3.3. Hospedadores aviares**

Las bacterias del género *Chlamydophila* spp. afectan al menos a 469 especies de aves comprendidas en 30 órdenes que incluyen tanto aves domésticas como silvestres. El orden de los Psittaciformes es el que tiene más especies positivas a *Chlamydophila* spp.

(163 de 342, es decir el 47,66%), y es también el orden con más especies positivas (163 de 469) (Chahota *et al*, 2006; Kaleta y Taday, 2003).

### **3.4. *Chlamydophila psittaci* en aves: clamidiosis aviar**

#### **3.4.1. Transmisión**

Los cuerpos elementales son eliminados en las secreciones orales, oculares y respiratorias, y en las heces de las aves infectadas (Andersen, 1996). La transmisión ocurre por inhalación, ingestión o contacto de estos cuerpos elementales con las mucosas conjuntivales. Las aves pueden tener una infección latente, la misma que puede activarse por factores estresantes, y en cuyo caso se eliminan nuevamente los cuerpos elementales en el medio ambiente. Los factores que reactivan o exacerban la infección pueden ser: el transporte, el hacinamiento, la llegada de la madurez sexual, la malnutrición, e incluso el manejo por parte de las personas para realizar tratamientos, un traumatismo, o una enfermedad concomitante (Smith *et al*, 2008; Maluping *et al*, 2007). Heddema *et al*, 2006b, encontraron que la prevalencia de *Chlamydophila psittaci* en palomas en Amsterdam era el doble en la época de crianza. Lublin *et al*, 1999, encontraron un aumento en la diseminación de *Chlamydophila psittaci* en palomas en Israel durante los meses de julio y agosto, que son los más calientes del año. Se ha encontrado mayores prevalencias de *Chlamydophila psittaci* en los lugares donde había muchas aves confinadas en un espacio pequeño, o en donde ocurren cambios frecuentes de las aves (Sareyyupoglu *et al*, 2007; McElena y Cross, 1999).

Los cuerpos elementales son eliminados intermitentemente, así lo demuestra el estudio de Raso *et al* (2002) de Brasil, en el cual se realizó inmunofluorescencia directa a

un mismo grupo de aves en dos días distintos. En la primera toma, 29 de 95 aves tuvieron el antígeno contra *Chlamydophila psittaci*, mientras que a las 48 horas, solo 20 aves dieron resultados positivos.

El estudio de Verminnen *et al*, 2008, demostró la presencia de *Chlamydophila psittaci* en el aire de una granja de pavos de Bélgica, al realizarse PCR de muestras de aire, tomadas el día 0 del estudio (antes de que lleguen los pavos), y a las 9 semanas; sin embargo no se pudo aislar la bacteria de estas muestras. Los cuerpos elementales pueden permanecer viables al menos por un mes en el medio ambiente, sobre todo si están protegidos por material orgánico. Una vez que los desechos son eliminados, las bacterias son fácilmente eliminadas con detergentes como el amonio cuaternario (Billington, 2005).

### **3.4.2. Signos clínicos**

El periodo de incubación suele ser de 3 días a varias semanas, o incluso meses o años, y depende de algunos factores como son la especie aviar, la virulencia de la cepa, la dosis infectante y la presencia de factores estresantes (Smith, 2008). Las aves afectadas presentan síntomas inespecíficos, y en la mayor parte de casos las aves están clínicamente sanas, a pesar de lo cual continúan diseminando el microorganismo o manteniendo anticuerpos contra la bacteria (Ecco *et al*, 2009; Maluping *et al*, 2007; Chahota *et al*, 2006; Travis *et al*, 2006b; Raso *et al*, 2002; Herrera *et al*, 2001; Phalen, 2001; McElnea y Gross, 1999). Los síntomas más comunes son letargia, anorexia y mal estado de las plumas. Los síntomas respiratorios incluyen disnea, rinitis, sinusitis (Vanrompay *et al*, 2007). Otros síntomas son conjuntivitis, diarrea y emaciación (Verminnen *et al*, 2008; Sareyyupoglu *et al*, 2007). Se presentan también cuadros graves de la enfermedad, con elevadas tasas de mortalidad. Raso *et al* (2004) reportaron un brote de clamidiosis aviar en un centro de



rehabilitación de vida silvestre de Brasil, en el cual murieron 56 de 58 (96,5%) amazonas rescatadas del tráfico ilegal.

### **3.4.3. Tratamiento**

El tratamiento de elección para la clamidiosis aviar es con doxiciclina (Heddema *et al*, 2006a), ya que una concentración plasmática mayor a 1 µg/ml interrumpe la replicación de la bacteria (Flammer *et al*, 2001). La dosis oral de doxiciclina para la mayoría de psittaciformes es de 25 a 50 mg/kg cada 24 horas por 45 días, aunque varía de una especie a otra, mientras que la dosis inyectable es de 75 a 100 mg/kg IM, cada 5 a 7 días durante las primeras 4 semanas, y luego cada 5 días hasta cumplir los 45 días. Los guacamayos y las cacatúas pueden regurgitar la medicación, por lo que se recomienda administrar las dosis más bajas de doxiciclina para estas especies (Smith *et al*, 2008; Billington, 2005). La doxiciclina también puede medicarse en el agua de bebida, en dosis de 800 mg/L (Flammer *et al*, 2001).

### **3.4.4. Diagnóstico**

#### **a. Cultivo**

Por ser una bacteria intracelular, el cultivo de las Chlamydiaceae solo se da en células vivas; es decir, cultivos celulares o huevos de gallina embrionados. Por esta razón se requiere un laboratorio altamente equipado, y con nivel de bioseguridad 3, debido a que representa un riesgo para el personal que lo maneja. Otro inconveniente es que el cultivo de la bacteria requiere de muchos días para su crecimiento (al menos 6), por lo que no se obtienen resultados rápidamente (Çelebi y Ak 2006; McElnea y Cross, 1999).

Adicionalmente, el cultivo tiene el inconveniente de detectar únicamente organismos viables, de manera que las muestras requieren un manejo y transporte cauteloso (Vanrompay *et al*, 2007).

El cultivo y aislamiento de la bacteria ha sido considerada la prueba “gold standard” para diagnosticar la presencia de *Chlamydophila psittaci*, sin embargo, debido a que presenta muchos inconvenientes, se han desarrollado otros métodos más sencillos y eficaces, que obtienen iguales resultados en menor tiempo e implican un menor riesgo para las personas que trabajan con ellos (Çelebi y Ak, 2006).

## **b. Serología**

Aproximadamente a las dos semanas post infección, se empiezan a producir anticuerpos anti *Chlamydophila psittaci* del tipo IgM, y luego de unos pocos días a una semana, se empiezan a producir los anticuerpos IgG (Phalen, 2001). Es decir que si se toma la muestra al inicio de la infección, es posible que aun no haya habido seroconversión y que por lo tanto se obtenga un resultado falso negativo (Smith *et al*, 2008). Los anticuerpos IgM permanecen altos al inicio de la infección, y luego van disminuyendo, por lo que en infecciones crónicas no es posible identificarlos. Los anticuerpos IgG, por su parte, permanecen en niveles elevados durante mucho tiempo, aun cuando ya se haya eliminado la bacteria, de manera que puede obtenerse un resultado falso positivo si se realiza la prueba antes de que haya habido la seroconversión, o luego de que haya terminado la infección y el ave continúe manteniendo anticuerpos IgG elevados (Phalen, 2001). Un resultado serológico positivo indica que el ave ha estado en contacto con la bacteria, pero no significa necesariamente que el ave tiene una infección activa en ese momento (Smith *et al*, 2008).

Para considerar que un ave tiene la infección con *Chlamydophila psittaci* de acuerdo a serología, es necesario que haya un incremento de los anticuerpos de 4 veces el valor de la primera toma, entre dos tomas separadas al menos por 15 días. Las pruebas de serología tienen mayor validez cuando se acompañan con signos clínicos de la enfermedad (Smith *et al*, 2008).

La microinmunofluorescencia (MIF) ha sido considerada una de las mejores herramientas para detectar anticuerpos contra *Chlamydophila psittaci*; sin embargo, estudios recientes sugieren que esta técnica no es tan sensible ni tan específica como se pensaba. En un estudio realizado por Verminnen *et al* (2008) se vio que mientras las personas resultaron positivas a *Chlamydophila psittaci* mediante PCR y cultivo, el MIF realizado con una prueba comercial en dos laboratorios distintos no mostró presencia de anticuerpos anti *Chlamydophila psittaci*. Al mismo tiempo, un MIF hecho por otro laboratorio no solo que no detectó la presencia de los anticuerpos anti *Chlamydophila psittaci*, si no que dio positivo para anticuerpos anti *Chlamydia pneumoniae*, lo cual no fue corroborado ni por la PCR ni por el cultivo.

Lastimosamente, los resultados de los estudios serológicos son muy variables. Deem *et al* (2005), no encontraron anticuerpos contra *Chlamydophila psittaci* en ninguna de las 50 loras (*Amazona aestiva*) a las cuales se les realizó una prueba de fijación de complemento en la provincia del Chaco, Bolivia; el estudio incluyó aves en cautiverio como aves en libertad. Herrera *et al*, 2001, encontraron que el 12.39% de las aves psittaciformes (*Ara macao*) mantenidas en cautiverio en centros de fauna silvestre de Costa Rica, presentaban anticuerpos contra *Chlamydophila psittaci*, lo cual fue determinado mediante una prueba comercial de ELISA que detectaba anticuerpos IgG (Immunocomb Biogal, Israel).

Utilizando la misma prueba comercial, en un centro de rescate de vida silvestre en las Filipinas, se encontró que el 50% de las aves psittaciformes (6 de 12) tenía anticuerpos IgG contra *Chlamydophila psittaci*. Las aves estudiadas estaban aparentemente sanas según la exploración física. De acuerdo con los autores, uno de los factores que contribuyeron para que la presencia de anticuerpos sea tan alta entre las aves psittaciformes es que las jaulas de estas aves estaban una a lado de otra, y que además había muchas aves compartiendo una jaula (Maluping *et al*, 2007). Raso *et al*, 2002, obtuvieron una seroprevalencia del 77% mediante ELISA en su estudio en especies de *Amazonas* en Brasil. En un estudio realizado en pingüinos en las Islas Galápagos en 2004, Travis *et al* (2006) encontraron anticuerpos contra *Chlamydophila psittaci* en 75 de 84 aves analizadas (89%). Sin embargo, al realizar PCR a 30 de las 75 aves seropositivas, no se encontró ADN de la bacteria en ninguna de ellas.

### **c. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una prueba molecular diseñada por primera vez en 1983 por Kary Mullis, y por cuyo trabajo ganó el Premio Nobel de Química en 1993. El objetivo de la PCR es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular. Para realizar la PCR se requiere de una enzima termoestable, la Taq polimerasa, que fue aislada por primera vez de la bacteria *Thermus aquaticus*; esta enzima tiene la capacidad de soportar los continuos aumentos de la temperatura que ocurren en cada ciclo de la PCR. También se necesita cebadores o primers, que son secuencias de nucleótidos, y de cuyo largo y secuencia depende la temperatura de hibridación o alineamiento con las cadenas de ADN; otros reactivos necesarios son los desoxinucleótidos trifosfatos, un cation divalente como el Magnesio, ADN extraído de una muestra, y una solución tampón. Los primers están diseñados para

reconocer secuencias específicas del ADN que se busca amplificar, y adherirse a esta región, para que a partir de allí se vaya sintetizando la doble cadena de ADN (Loeffelholz y Deng, 2006).

La PCR consiste de tres pasos que son, la desnaturalización, el alineamiento y la extensión. En la primera etapa de desnaturalización, que ocurre a temperaturas de 93° a 94° C, la doble cadena de ADN se separa. A continuación, los primers se alinean con cada cadena de ADN en los extremos 3', lo cual ocurre a una temperatura entre 50° y 60° C. A estas temperaturas, los primers están en continuo movimiento y gracias a las uniones iónicas se juntan y separan constantemente de las cadenas de ADN. Al juntarse el primer con la secuencia complementaria, las uniones que se forman son lo suficientemente estables para que la enzima Taq polimerasa se asiente e inicie la síntesis de la cadena complementaria de ADN. En la etapa de extensión, que ocurre generalmente a 72° C, los desoxinucleótidos se van adhiriendo a la cadena de ADN y la Taq polimerasa sintetiza el ADN. El producto que se obtiene luego de una PCR es llamado amplicón. Por cada ronda de una PCR se dobla la cantidad de ADN, de manera que el ADN es amplificado de forma exponencial. Todo el proceso ocurre dentro de un termociclador, que es un equipo programado para realizar los cambios de temperatura en el tiempo deseado. Una vez que finaliza la amplificación de las secuencias en el termociclador, es necesario observar o cuantificar de alguna manera el amplicón. Para ello se debe correr la muestra en un gel de agarosa y observarlo en un espectrofotómetro. Allí se podrá ver si hay muestras amplificadas y el tamaño de las mismas, al tiempo que se compara con el control positivo (Loeffelholz y Deng, 2006).

Una ventaja de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, es que no necesita que la muestra contenga organismos vivos (Harkinezhad *et al*, 2007).

La PCR busca amplificar dos tipos de genes. Los primeros son los específicos para la familia Chlamydiaceae, mientras que los segundos son específicos de especie. Dentro del primer grupo encontramos las PCR que amplifican los genes 16S rRNA y 23S rRNA, que tienen más de 90% de similitud entre todas las especies de Chlamydiaceae (Everett y Andersen, 1999).

Dentro de las PCR específicas de especie, se busca amplificar varios genes, como pueden ser los genes de la proteína mayor de membrana externa (MOMP). Un ejemplo es el gen *ompA*, con el cual se realizan análisis de secuencia y se logra diferenciar entre genotipos dentro de una misma especie (Chahota *et al*, 2006; Pannekoek, 2006; Heddema *et al*, 2006a); el gen *pmp* (Sareyyupoglu *et al*, 2007). Al comparar la PCR con el cultivo, la PCR es más sensible (Çelebi y Ak, 2006; Messmer *et al*, 1997). McElnea y Gross (1999), determinaron que el cultivo celular tenía una sensibilidad del 68% comparada con la PCR.

Existen varios métodos para la toma de muestras; hisopos conjuntivales (Laroucau *et al*, 2007), hisopos faríngeos (Schwarzová *et al*, 2006; Geens *et al*, 2005a), hisopos cloacales (Sharples y Baines, 2009; Heddema *et al*, 2006a; Raso *et al*, 2006), hisopos fecales (Sareyyupoglu *et al*, 2007; Çelebi y Ak, 2006; Heddema *et al*, 2006b). Algunos autores prefieren el uso de un mismo hisopo para tomar distintas muestras, que pueden ser conjuntival, coanal y cloacal, en este orden (Travis *et al*, 2006b). Como los cuerpos elementales son eliminados intermitentemente, algunos autores realizan un pool de al menos dos muestras (Smith *et al*, 2008; Heddema *et al*, 2006b).

La PCR acompañada del análisis de fragmentos de ADN obtenidos por enzimas de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP) permite diferenciar entre las nueve especies de la familia Chlamydiaceae. Para ello se puede utilizar un primer forward que amplifica el gen 16S rRNA y un primer reverse que amplifica el gen 23S rRNA (Everett y Andersen, 1999). El análisis de restricción enzimática también permite la

diferenciación de los distintos serovares, como lo demuestra el estudio de Laroucau *et al* (2007), en el cual utilizaron la PCR-RFLP para diferenciar los distintos serovares de *Chlamydophila psittaci*.

### **3.4.5. Prevalencia de *Chlamydophila psittaci* mediante PCR en las aves psittaciformes**

Los resultados de las investigaciones que utilizaron la PCR como método de diagnóstico son muy variables, y arrojan prevalencias que van desde el 8 al 90%. La investigación de Chahota *et al*, 2006, reveló una prevalencia de clamidiosis aviar en el 8,87% de las aves psittaciformes estudiadas en Japón (97 de 1093). Vanrompay *et al* (2007) encontraron que el 19.2% de las aves psittaciformes pertenecientes a varios centros de crianza de estas aves en Bélgica, eran positivas a *Chlamydophila psittaci* mediante PCR de muestras obtenidas con hisopo fecal. Raso *et al*, 2006, hallaron 18 aves positivas a *Chlamydophila psittaci*, entre un grupo de 77 aves que incluía loros y guacamayos, lo cual arroja una prevalencia de 23, 4%. Çelebi y Ak (2006) hallaron que el 45% de las aves psittaciformes analizadas en Turquía eran positivas a *Chlamydia* sp. mediante PCR que buscaba amplificar parte del gen 16S-23S rRNA. Mediante PCR específico para *Chlamydophila psittaci*, Sareyyupoglu *et al* (2007), detectaron una prevalencia de 91.5%. Las aves estudiadas pertenecían a varios órdenes y se encontraban agrupadas en 4 centros aviarios de Turquía. En cada lugar solo una de las aves salió negativa en la PCR.

### 3. 5. *Chlamydophila psittaci* en humanos

La infección por *Chlamydophila psittaci* se conoce en humanos como psitacosis. Otros nombres son fiebre del loro y ornitosis. Desde el punto de vista de salud pública, la psitacosis es una enfermedad importante que está subdiagnosticada en la actualidad. Existen casos aislados así como brotes (Petrovay *et al*, 2008; Heddema *et al*, 2006a).

Entre 2000 y 2006, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos recibió reportes de 125 casos de psitacosis, si bien se cree que estos datos no representan el número real de casos debido a la falta de diagnóstico (Smith *et al*, 2008).

El periodo de incubación en humanos va de 5 a 14 días, aunque puede prolongarse (Smith *et al*, 2008; Heddema *et al*, 2006a). Debido a que la sintomatología no tiene características particulares, se puede confundir con un simple cuadro gripal. Los síntomas son muy variables, pero es posible encontrar dolor muscular, de cabeza y de garganta, fiebre, disnea, escalofríos, rinitis, tos, faringitis y sonidos respiratorios anormales (Verminnen, 2008; Vanrompay *et al*, 2007; Heddema *et al*, 2006a). La infección puede ser subclínica, como lo demuestra el estudio de Harkinezhad *et al* (2007), o puede llegar a un cuadro de sepsis con falla multiorgánica (Heddema *et al*, 2006a). Actualmente, con el uso de antibióticos adecuados, los casos de muerte por la infección con *Chlamydophila psittaci* son muy escasos (Petrovay y Balla, 2008; León *et al*, 2005).

La neumonía por *Chlamydophila psittaci* es común en los cuadros complicados de psitacosis. Haas *et al*, 2006, revelan un caso de neumonía severa en un criador de aves exóticas de 67 años, quien fuera diagnosticado de psitacosis mediante serología y PCR de fluido de lavado broncoalveolar. El paciente primero fue tratado con antibióticos beta lactámicos que no resolvieron el cuadro, hasta que una vez confirmado el diagnóstico se le



trató con doxiciclina y mejoró. En cualquier cuadro de neumonía que no cede a beta lactámicos debe sospecharse la infección con *Chlamydophila psittaci* (León *et al*, 2005).

En el año 2005, cuatro miembros de una familia en Japón adquirieron psitacosis a partir de un loro que uno de los miembros de la familia había comprado como mascota un mes antes. La enfermedad fue diagnosticada serológicamente, por el aumento de anticuerpos en más de 4 veces el valor inicial (Kaibu *et al*, 2006). La clave del diagnóstico consiste en determinar si ha habido exposición reciente a aves (Petrovay y Balla, 2008). La psitacosis es una enfermedad ocupacional que afecta a veterinarios, criadores de aves, trabajadores de plantas de procesamiento avícola, trabajadores de zoológicos, entre otros (Iijima *et al*, 2009; Verminnen *et al*, 2008; Vanrompay *et al*, 2007; Heddema *et al*, 2006a).

Heddema *et al*, 2006a, comentan sobre un brote de psitacosis que ocurrió en un hospital veterinario de docencia en Holanda. El brote se inició luego de que los alumnos tuvieran una práctica en la cual utilizaron 9 cacatúas ninfa que no eran del hospital, junto con 9 loros y 144 palomas que sí formaban parte del hospital. Tanto personas como aves (10 de 29 personas, 6 de 9 loros y 1 de 23 palomas estudiadas) resultaron positivas a *Chlamydophila psittaci* ya sea mediante PCR en tiempo real o por pruebas de serología (rELISA o CFI). Se secuenció el gen *ompA* de *Chlamydophila psittaci* que se amplificó a partir de las muestras y se determinó que se trataba del genotipo A de *Chlamydophila psittaci*. Aparentemente, el origen del brote fueron las 9 cacatúas ninfa prestadas para la práctica ya que anteriormente tanto los loros como las palomas habían sido examinadas para *Chlamydophila psittaci* y siempre dieron resultados negativos.

En el estudio de Geens *et al*, 2005a, el veterinario responsable de los pavos que fueron analizados se infectó con los mismos genotipos de *Chlamydophila psittaci* que tenían las aves: E/B, D y F. El análisis se realizó mediante PCR en tiempo real específico para el genotipo. Mediante PCR anidada y ensayo inmunoenzimático específico para

*Chlamydophila psittaci*, el cual amplifica el gen *ompA*, se detectó la bacteria en aves que eran mascotas y en sus propietarios. Cuando se estableció la transmisión zoonótica, se realizó una PCR en tiempo real específica para el genotipo, la cual determinó que las aves enfermas presentaban en su mayoría el genotipo A, mientras que una de las aves mostró el genotipo E/B (Vanrompay *et al*, 2007). En Granada en el año 2003 se desató un brote de psitacosis entre personas que trabajan con aves exóticas en sitios de venta de estos animales. El brote se debió a que el centro distribuidor de las aves incumplió con la cuarentena (León *et al*, 2005). Petrovay y Balla (2008), relatan la muerte de dos mujeres que trabajaban en dos plantas procesadoras de pollos y que contrajeron psitacosis. El diagnóstico se confirmó mediante serología y PCR. La tardanza en el diagnóstico, y el uso de antibióticos que no funcionaron agravaron la situación de las pacientes, que finalmente murieron por complicaciones respiratorias.

El riesgo de contraer la infección con *Chlamydophila psittaci* a partir de un ave infectada es muy alto, ya que una breve exposición a la misma puede resultar en enfermedad (Heddema *et al*, 2006a). El tratamiento de la psitacosis en personas también es con tetraciclina o doxiciclina. Por vía oral, la dosis de clorhidrato de tetraciclina es de 500 mg cada seis horas, mientras que la dosis de doxiciclina es de 100 mg cada doce horas. En pacientes graves se puede iniciar el tratamiento con hclato de doxiciclina por vía intravenosa en dosis de 4.4 mg/kg/d, dividida en dos infusiones diarias (Smith *et al*, 2008).

### **3. 6. Estudios sobre *Chlamydophila psittaci* en el Ecuador**

Solo se tiene conocimiento de investigaciones sobre *Chlamydophila psittaci* en algunas especies de aves de vida libre en las Islas Galápagos. Los estudios de Travis *et al* (2006a, 2006b) han detectado anticuerpos contra *Chlamydophila psittaci* mediante fijación

de complemento en pingüinos y en cormoranes no voladores de las islas Isabela y Fernandina en las Islas Galápagos, respectivamente. En ambos estudios también se realizó PCR de algunas muestras, pero solo se obtuvo resultados positivos en los cormoranes (Travis *et al*, 2006b). Mediante PCR de hisopos cloacales, Padilla *et al* (2003), detectaron la presencia de *Chlamydophila psittaci* en tortolas de la Isla Española en Galápagos.

Otras investigaciones, en cambio, no han encontrado la presencia de la bacteria o de anticuerpos contra esta en palomas, albatros, fragatas, gaviotas, piqueros de Nazca o piqueros de patas rojas (Padilla *et al*, 2006; Padilla *et al*, 2004; Padilla *et al*, 2003). En resumen, algunos estudios han encontrado evidencia de infección por *Chlamydophila psittaci* en pingüinos, en tortolas, y en cormoranes no voladores en las Islas Isabela, Fernandina y Española.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Área de estudio**

Las muestras fueron obtenidas en dos centros de manejo de fauna silvestre: Zoológico de Quito en Guayllabamba y Centro de Rescate Hacienda Santa Martha en Tambillo. Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

#### **4.1.1. Zoológico de Quito en Guayllabamba**

El Zoológico de Quito en Guayllabamba se encuentra a 3 km hacia el sudeste de la parroquia Guayllabamba, y a 24 km de Quito en dirección noreste. La altura es de 2.139 m.s.n.m., el clima es cálido-seco, las temperaturas mínima y máxima son 9° C y 29° C, respectivamente, la humedad relativa media es de 40-60%, y los vientos son de noreste y de sudeste (Ortega, 2002). La colección del Zoológico incluye anfibios (varias especies de sapos y ranas), reptiles (varias especies de tortugas, boas, iguanas, caimanes), aves (águilas, cóndores, gallinazos, gavilanes, búhos, tucanes, loros, guacamayos), mamíferos (osos de anteojos, lobos de páramo, jaguares, pumas, tigrillos, varias especies de monos, ardillas, puercos saínos, capibaras, tapires, cuchuchos, cusumbos, perezosos, cabezas de mate) animales de otros continentes (leones africanos, canguros) y animales domésticos de granja (vacas, ovejas, conejos, cuyes).

#### **4.1.2. Centro de Rescate Hacienda Santa Martha**

El Centro de Rescate Santa Martha se localiza en Tambillo, al suroeste de Quito en la provincia de Pichincha, a 3.000 msnm, tiene un clima frío-húmedo, la temperatura

promedio es de 18°C en el día y 10°C en la noche. La colección del Centro abarca una gran variedad de especies nativas, incluyendo reptiles (varias especies de tortugas, boas), aves (loros, guacamayos, tucanes, águilas), mamíferos (pumas, tigrillos, jaguares, osos de anteojos, cabezas de mate, cuchuchos, cusumbos, puercos espines, armadillos, varias especies de primates del nuevo mundo) y animales de otros continentes (leones africanos).

## **4.2 Factores de estudio**

Se obtuvieron 39 muestras en total, que fueron tomadas ya sea mediante hisopos cloacales, hisopos fecales o citobrushs cloacales, de diferentes especies de aves del orden de las Psittaciformes. 29 muestras fueron tomadas en el Zoológico de Quito en Guayllabamba y 10 muestras fueron tomadas en el Centro de Rescate Hacienda Santa Martha.

## **4.3. Materiales**

### **4.3.1. Campo**

- Hisopos de uso comercial (Carlitos®)
- Microtubos 1,5 ml (Marsh®)
- Citobrushs
- Tubos cónicos 25 ml (Axygen®)
- PBS
- Marcadores (Edding®)
- Guantes de examinación
- Mascarillas

- Guantes de cuero
- Red
- Termo pequeño
- Hielo
- Funda plástica para desechos

### **4.3.2. Laboratorio**

#### **a. Esterilización hisopos**

- Autoclave Automático 2164

#### **b. Extracción ADN de las muestras**

- Microtubos 1,5 ml (Marsh<sup>®</sup>)
- TE (10X: 100 mM Tris Cl (pH 7.6); 100 mM EDTA pH 8)
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, pH 8, HCl 100 Mm, pH 8)
- Etanol 100% (Merck<sup>®</sup>)
- Etanol 75% (Merck<sup>®</sup>)
- TE estéril (Sigma<sup>®</sup>)
- Acetato de sodio (Merck<sup>®</sup>)
- Cloroformo/isoamil (Merck<sup>®</sup>)
- PBS 10X (Gibco<sup>®</sup>)
- PBS 1X (Gibco<sup>®</sup>) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7)
- Baño de arena con termómetro (Dinko<sup>®</sup>)

- Cámara de flujo laminar (Kalstein<sup>®</sup>)
- Centrífuga para tubos 2 ml (Eppendorf<sup>®</sup> 5415D)
- Sorbona (Labotec<sup>®</sup>)
- Vórtex (Genie<sup>®</sup>)

### **c. Valoración del ADN de las muestras en un espectrofotómetro**

- Nanodrop Spectrophotometer ND-100

### **d. Amplificación gen 16S rRNA de bacterias mediante PCR**

- Microtubos para PCR de 0.2 ml (Axygen<sup>®</sup>).
- Primer Forward: 341f 10  $\mu$ M, 5'CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG3' (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Primer Reverse: 534r 10  $\mu$ M, 5'ATT ACC GCG GCT GCT GG3' (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Termociclador (Biometra<sup>®</sup>)
- Agua ultra pura para PCR (libre de RNAasas y DNAsas) (GIBCO<sup>®</sup>)
- dNTP's 2 mM (Invitrogen<sup>®</sup>)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega<sup>®</sup>)
- Buffer 5X (Promega<sup>®</sup>)
- Taq DNAPolimerasa (Promega<sup>®</sup>)
- Control positivo: ADN puro de *E. coli*
- Micropipetas de 10 y 200  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas de 10 y 200  $\mu$ l

### **e. Amplificación gen 16S rRNA bacterias de la familia Chlamydiaceae mediante PCR**

- Microtubos para PCR de 0.2 ml (Axygen<sup>®</sup>).
- Primer Forward: CHYF 100  $\mu$ M, 5'GCC TAC CGG CTT ACC AAC-3' (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Primer Reverse: CHYR 100  $\mu$ M, 5'GGC GCA ATG ATT CTC GAT-3' (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Termociclador (Biometra<sup>®</sup>)
- Agua ultra pura para PCR (libre de RNAasas y DNAsas) (GIBCO<sup>®</sup>)
- dNTP's 2 mM (Invitrogen<sup>®</sup>)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega<sup>®</sup>)
- Buffer 5X (Promega<sup>®</sup>)
- Taq DNAPolimerasa (Promega<sup>®</sup>)
- Control positivo: ADN de muestra vaginal de *Chlamydia trachomatis*
- Micropipetas de 10 y 200  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas de 10 y 200  $\mu$ l

### **f. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio**

- Gel de agarosa al 1.5%
- Cámara de electroforesis (50 ml Minicell<sup>®</sup> Primo<sup>™</sup> EC320, 150 ml BIO-RAD Wide Mini Sub<sup>™</sup> Cell)



- TBE (5X: 54g Tris base, 27.5 g ácido bórico, 20 ml de 0.5M EDTA en 1lt de agua)
- Buffer de carga (20% ficoil en agua  $\frac{3}{4}$  del volumen, 0,196 de azul de bromofenol)
- Ladder 100 bp (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Bromuro de etidio al 1% (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Fuente de poder (E-C Apparatus Corporation EC 2060P)
- Cámara (Kodak DC120<sup>®</sup>)

## 4.4. Métodos

### 4.4.1. Muestreo

Las muestras se tomaron en el Zoológico de Quito en Guayllabamba y en el Centro de Rescate Santa Martha. Todos los individuos del estudio son aves del orden de los Psittaciformes. La toma de las muestras se realizó mediante una de estas tres formas: con un hisopo cloacal, con un citobrush cloacal, o con un hisopo de heces frescas (se observó que al ave defecara y se procedió a tomar la muestra). A continuación los hisopos fueron colocados en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 1.5 ml que contenían PBS estéril. Los citobrushs fueron puestos en tubos cónicos de 25 ml que también contenían PBS estéril. Las muestras fueron transportadas en un termo con hielo al Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Una vez en el laboratorio, los tubos Eppendorf<sup>®</sup> y cónicos eran colocados en el vórtex a fin de que las partículas se desprendieran del hisopo o citobrush, y estos eran descartados a continuación. Las muestras de los tubos cónicos fueron trasladadas a un tubo Eppendorf<sup>®</sup>.

#### **4.4.2. Extracción de ADN por el método de CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amónico)**

Para obtener el pellet celular de las muestras se centrifugaron los tubos Eppendorf® a 13.362 g durante 5 minutos. A continuación se descartó el sobrenadante, con lo cual se obtuvo el pellet celular. Se añadió 1 ml de PBS 1X para resuspender el pellet y centrifugar nuevamente. Se repitió el lavado dos veces, luego de lo cual se eliminó el sobrenadante para digerir el pellet celular en 700 µl de solución CTAB. Se incubó en baño de arena por dos horas a 65° C; cada 15 minutos se agitaron los tubos en el vórtex para favorecer la ruptura de las membranas celulares.

Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente para continuar con la extracción del ADN. Para ello se preparó dentro de una sorbona la solución de cloroformo/alcohol isoamílico en relación 24:1. Se añadieron 700 µl de esta solución en los tubos Eppendorf®, y se mezcló vigorosamente hasta formar una emulsión.

Se centrifugaron los tubos a 13.362 g durante 5 minutos, luego de lo cual se obtuvieron una fase inferior u orgánica (cloroformo/isoamil), una fase superior o acuosa que contiene el ADN en suspensión, y una interfase blanca que contiene las proteínas celulares. Se transfirieron 500 µl de la fase superior a un nuevo tubo Eppendorf®, con cuidado de no topar la interfase para evitar la contaminación de la muestra con proteínas celulares. A continuación se realizó la precipitación de ADN, para lo cual se agregó 50 µl de acetato de sodio 3M pH 5 y 1000 µl de etanol al 100% helado. Se mezcló por inversión y se congeló a -20° C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 16.168 g durante 10 minutos, y una vez visualizado el pellet de ADN se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Para lavar el pellet de ADN se añadió 1000 µl de etanol al 70% y se invirtió hasta conseguir una mezcla

uniforme. Se centrifugó nuevamente a 16.168 g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el tubo Eppendorf<sup>®</sup> boca abajo sobre papel absorbente y, una vez que esto ocurrió, se resuspendió la muestra con 50 µl de buffer TE estéril. Las muestras se guardaron a -20° C hasta ser utilizadas.

#### **4.4.3. Valoración del ADN de las muestras en un espectrofotómetro**

Se procesaron las muestras en un espectrofotómetro para determinar la concentración de ADN presente en cada una, así como la contaminación con proteínas (relación 260/280). Para hacer esto se colocó 1 µl de cada muestra en el lector del espectrofotómetro.

#### **4.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers que amplifican la subunidad 16S rRNA de bacterias (Muyzer et al, 1993)**

Se preparó la PCR con las siguientes concentraciones y cantidades para un volumen total de 25 µl:

- 8,3 µl de agua ultra pura para PCR (libre de RNAsas y DNAsas) (GIBCO<sup>®</sup>)
- 5 µl de buffer 5x (Promega<sup>®</sup>)
- 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega<sup>®</sup>)
- 2,5 µl de dNTP's 2 mM (Invitrogen<sup>®</sup>)
- 2,5 µl del primer 341F 10 µM (Invitrogen<sup>®</sup>)
- 2,5 µl del primer 534R 10 µM (Invitrogen<sup>®</sup>)
- 0,2 µl, de Taq DNA polimerasa (Promega<sup>®</sup>)
- 2,5 µl de ADN extraído de las muestras
- 2,5 µl de ADN puro de *E. coli*

El protocolo utilizado para el PCR fue estandarizado en 94°C durante 4 minutos seguido de 39 ciclos de amplificación que consisten en la desnaturalización a 94°C por 30 segundos, seguido por la hibridación del primer a 54°C por 30 segundos y la extensión de la cadena de ADN a 72°C por 30 segundos, y 20 minutos adicionales para completar la extensión final de los primers. Los primers 341f y 534r amplifican la región 16S rDNA de todas las bacterias, y corresponden a las posiciones 341 a 534 de *E. coli*. El producto amplificado mide 233 pares de bases (Muyzer *et al*, 1993).

#### **4.4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen 16S rRNA de las bacterias de la familia Chlamydiaceae (Condon y Oakey, 2007)**

Luego de varios ensayos, se estableció la PCR con las siguientes concentraciones y cantidades de reactivos, para un volumen total de 25 µl:

- 1,3 µl de agua ultra pura para PCR (libre de RNAsas y DNAsas) (GIBCO®),
- 5 µl de buffer 5X (Promega®)
- 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega®)
- 5 µl del primer CHYF 100 µM 5'GCC TAC CGG CTT ACC AAC3'(Invitrogen®)
- 5 µl del primer CHYR 100 µM 5'GGC GCA ATG ATT CTC GAT3'(Invitrogen®)
- 2,5 µl de dNTP's 2 mM (Invitrogen®)
- 0,2 µl, de Taq DNAPolimerasa (Promega®)
- 5 µl de ADN extraído de las muestras
- 5 µl de ADN de muestra vaginal de *Chlamydia trachomatis*

El protocolo utilizado para el PCR fue estandarizado en 95°C durante 75 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificación que consisten en la desnaturalización a 94°C por 45 segundos, seguido por la hibridación del primer a 56°C por 45 segundos y la extensión de la cadena de ADN a 72°C por 45 segundos, y 1 minuto adicional para completar la extensión final de los primers a 72°C. En el caso de la PCR anidada, se utilizó 5 µl del producto de la PCR anterior, en lugar de los 5 µl de ADN, de acuerdo con lo recomendado por Condon y Oakey, 2007

#### **4.4.6. Electroforesis en gel de agarosa**

Se observaron los productos de las PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Para ello se mezcló 0,75g o 2,25 g de agarosa con 50 o 150 ml de TBE 1X, respectivamente, en un matraz de Erlenmeyer, y se calentó en el microondas hasta que los gránulos de agarosa estuvieran totalmente disueltos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Mientras tanto se preparó la cámara, para lo cual se selló con cinta adhesiva dos costados de la bandeja donde se vertió el gel, y se colocó la peineta encima de la bandeja. A continuación se vierte el gel aún líquido en la cámara y se deja que se solidifique. Una vez que este sólido el gel, se retira con cuidado la peineta y las cinta adhesiva. Se cubre la cámara con TBE 1X. Mezclamos 10 µl de cada muestra con 2 µl de buffer de carga, y colocamos un total de 10 µl por muestra en cada pocillo, empezando por el segundo. Al terminar de poner las muestras se debe poner el control positivo y luego el control negativo. Finalmente ponemos 2 µl de ladder en el primer y último pocillo. Colocamos la tapa de la cámara, y conectamos a la fuente de poder a 80 voltios durante 1h a 1h 30m aproximadamente. A continuación fotografiamos el gel de agarosa con una cámara fotográfica Kodak, y observamos en el computador. El tamaño de

las bandas fue corroborado por regresión lineal, utilizando el estándar de tamaño (ladder de 100 pares de bases) y la distancia corrida por las muestras.



## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Muestras del Zoológico de Quito en Guayllabamba**

Se obtuvo 10 muestras de heces frescas de aves en la jaula 1, 12 muestras de hisopos cloacales de aves en la jaula 2 y 7 muestras de citobrush cloacales del exhibidor. (Tabla 1)

### **5.2. Muestras del Centro de Rescate Hacienda Santa Martha**

Se obtuvo 10 muestras de heces frescas en total, 5 muestras de aves en la jaula 1, 1 muestra de la jaula 2, 3 muestras de la jaula 3 y una muestra de un ave suelta. (Tabla 2)

### **5.3. Valoración del ADN de las muestras en un espectrofotómetro**

Se obtuvo ADN en 35 de las 39 muestras analizadas (concentración ng/ul). Así mismo, se determinó la contaminación con proteínas (relación 260/280). (Tabla 3)

### **5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se realizó primero una estandarización de la prueba de PCR utilizando un control positivo de *Chlamydia trachomatis* facilitado por el laboratorio de Microbiología de la USFQ y se obtuvo amplificación cuando se utilizó los primers a una concentración de 100  $\mu$ M, (Figura 1) en lugar de 10  $\mu$ M que fue la concentración indicada en la literatura (Condon y Oakey, 2007). También se realizó varios ensayos con diferentes concentraciones de ADN para optimizar la reacción. Para descartar la presencia de sustancias inhibitorias para el PCR y comprobar la presencia de ADN bacteriano se corrió



una PCR con primers específicos para la región bacteriana 16S ribosomal (Muyzer *et al*, 1993) (Figura 2).

Una vez que la PCR estuvo estandarizada y se comprobó que los extractos de ADN no contenían sustancias inhibitorias, se corrió las muestras obtenidas de aves (Figuras 3, 4, 5, 6). Las muestras en las que se amplificó bandas de tamaño aparentemente correcto, se procedió a corroborar mediante regresión lineal (Figura 7). En el caso de la muestra número 16 (Figura 6), el amplicón migró 61,5 mm, por lo tanto corresponde aproximadamente a 238 pares de bases, mientras que el amplicón de la muestra número 35 (Figura 6) migró 61 mm, por lo tanto es de aproximadamente 250 pares de bases.

Se obtuvo 2 muestras fecales positivas a la PCR específica para Chlamydiaceae. Estas muestras correspondieron a una muestra fecal del Centro de Rescate Hacienda Santa Martha y a una muestra obtenida con citobrush del Zoológico de Quito en Guayllabamba (Tabla 4).

El ave positiva del Zoológico de Quito en Guayllabamba es un guacamayo escarlata (*Ara macao*), que fue donado en el año 2004, y que ha vivido en cautiverio por más de 20 años. El ave positiva del Centro de Rescate Hacienda Santa Martha es un loro coroninegro (*Pionites melanocephala*), pero no se tiene información sobre su procedencia.

## 6. DISCUSIÓN

La presente investigación sugiere la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae en las aves exóticas presentes en el Zoológico de Quito en Guayllabamba y en el Centro de Rescate Hacienda Santa Martha en Tambillo. Estos resultados están de acuerdo con reportes en los que se indica que *Chlamydophila psittaci* está presente en aves de todos los continentes (Maluping *et al*, 2007; Sareyyupoglu *et al*, 2007; Vanrompay *et al*, 2007; Raso *et al*, 2006; Travis *et al*, 2006b; Chahota *et al*, 2006; Andersen, 2005; Herrera *et al*, 2001; McElnea y Cross, 1999). Muchos estudios de prevalencia de infección con *Chlamydophila psittaci*, sobre todo los realizados en aves en libertad, revelan infecciones asintomáticas, dejando ver que más bien se trata de una relación hospedador-huésped estable (Raso *et al*, 2006; Herrera *et al*, 2001). Los estudios en aves en cautiverio, en cambio, indican que al concurrir algunos factores estresantes, la enfermedad es más aparente en estas aves (Ecco *et al*, 2009; Sareyyupoglu *et al*, 2007; Vanrompay *et al*, 2007; Chahota *et al*, 2006; Raso *et al*, 2004).

Este estudio también corrobora la información presentada previamente de acuerdo la cual la prueba de PCR es fácil y puede ser empleada para monitorear la circulación y las tasas de portación de esta bacteria en animales exóticos confinados en jaulas (Chahota *et al*, 2006; McElnea y Cross, 1999). La PCR también sería una excelente alternativa para confirmar infecciones clínicas por *Chlamydophila psittaci* (Condon y Oakey, 2007; Raso *et al*, 2004).

Everett *et al* (1999) refieren que las cepas de *Chlamydia trachomatis* son susceptibles a la sulfadiacinas y tetraciclinas, mientras que las especies de *Chlamydophila* tienen distinta resistencia a las sulfadiazinas. Las aves del zoológico son tratadas con sulfadiazinas cada 6 meses, aproximadamente, para el control de coccidias, en dosis de 25 mg/kg cada 24 horas

durante 7 días. Esto tal vez podría haber contribuido a que no se haya encontrado una mayor presencia de la bacteria entre las aves de este centro.

Lublin (1999) encontró que había una tendencia estacional de la diseminación de la bacteria, correspondiendo con los meses más calientes del año, julio y agosto. Esto puede ser debido a que el calor promueve la aerosolización de las heces, favoreciendo la transmisión de los cuerpos elementales. El Centro de Rescate Hacienda Santa Martha presenta un clima frío húmedo, mientras que en el Zoológico de Quito en Guayllabamba, a pesar de tener un clima más cálido, los galpones donde se encuentran las jaulas de las aves son lavados todos los días con manguera a presión. Esto podría contribuir a que no se sequen y dispersen las heces en el ambiente, disminuyendo la transmisión de la bacteria.

Los resultados de PCRs del gen bacteriano 16S ribosomal indicaron que tanto la forma de obtener las muestras como el procedimiento de extracción de ADN fueron adecuados y no contuvieron sustancias inhibitorias. En cuanto a la toma de muestras, ésta se realizó de diversas formas. Se utilizó el hisopo cloacal, de acuerdo a lo recomendado por Schwarzova *et al* (2006), quienes utilizaron hisopos cloacales y faríngeos en aves migratorias, y encontraron una positividad del 10,17% con el hisopo cloacal, mientras que no encontraron aves positivas con el hisopo faríngeo. Raso *et al* (2006) también encontraron mayor diseminación del organismo con el hisopo cloacal que con el hisopo faríngeo en guacamayos (26,7% versus 8,9%).

Se tomaron muestras con hisopos fecales, como lo recomiendan Sareyyupoglu *et al*, 2007. En su estudio encontraron 43 de 47 aves positivas a *Chlamydophila psittaci* mediante PCR y análisis de restricción enzimática, utilizando muestras fecales. También se utilizaron citobrushs de uso vaginal con los guacamayos, ya que estas aves son grandes. Sin embargo, si bien se pudo obtener ADN con este método, y de hecho una de las aves

positivas se muestreó así, no se recomienda su uso ya que el procedimiento resultó muy invasivo.

Algunos autores han obtenido mejores resultados con hisopos faríngeos. Por ejemplo, en un estudio que comparó la efectividad de los hisopos faríngeos, cloacales y fecales en cacatúas y pavos, los hisopos faríngeos fueron más eficaces para aislar *Chlamydophila psittaci* que los otros hisopos. En las cacatúas, los hisopos faríngeos fueron positivos en 80,4% de los casos, mientras que los hisopos fecales y cloacales lo fueron en un 45,1% y 37,3% respectivamente. El autor recomienda el uso de hisopos faríngeos para detectar la bacteria en cacatúas y pavos, pero enfatiza la importancia de tomar múltiples muestras a la vez (Andersen, 1996).

El presente trabajo puede reflejar resultados falsos negativos ya que solo se obtuvo una muestra por ave, en lugar de las dos o tres que recomiendan los autores, de manera que la bacteria puede estar presente en mayor medida entre las aves psittaciformes de los dos centros de manejo de fauna silvestre. No se llevó a cabo la toma de un pool de muestras ya que este estudio tenía como objetivo determinar la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae entre las aves psittaciformes de los dos centros, mas no la prevalencia del organismo.

A pesar de que el tamaño de la bandas obtenidas fue verificada mediante regresión lineal, la confirmación de que estas bandas provinieron de bacterias de la familia Chlamydiaceae debería ser realizado mediante hibridación o secuenciamiento de los amplicones. Los primers utilizados fueron diseñados por dos autoras australianas que trabajan en el Laboratorio Tropical y de Salud Animal Acuática del Departamento de Industrias Primarias y Pesca del Gobierno de Queensland (Australia) (Condon y Oakey, 2007). La PCR desarrollada por las autoras busca amplificar el gen 16S rRNA, el cual ha sido recomendado para la identificación de las bacterias de la familia Chlamydiaceae

(Everett y Andersen, 1997). La información sobre su investigación fue ingresada en el Genbank, y está a disposición del público. Si bien las autoras recomiendan el uso de los primers a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , nosotros tuvimos que utilizarlos en una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Esto se debe a que utilizando la concentración recomendada por las autoras, no pudimos amplificar el control positivo, lo cual si se logró al utilizar los primers diez veces más concentrados. La razón de esto puede ser que los primers sufrieron degradación, ya que han transcurrido alrededor de 2 años desde que fueron diluidos (un set de primers es de noviembre de 2007 y el otro es de marzo de 2008). La posible degradación de los primers podría explicar que no se haya encontrado un mayor número de aves positivas a bacterias de la familia Chlamydiaceae en este estudio.

## 7. CONCLUSIONES

Esta investigación sugiere la presencia de bacterias de la familia Chlamydiaceae en las aves psittaciformes de los dos centros de manejo de fauna silvestre. La positividad encontrada fue 5,12%, lo cual es menor que lo encontrado en otros estudios (Chahota *et al*, 2006: 8,87%).

Fue acertado utilizar primers que amplificaran el gen 16S rRNA de las bacterias de la familia Chlamydiaceae, en lugar de primers específicos para *Chlamydomphila psittaci*, ya que no hubiésemos logrado obtener un control positivo, y sin este no hubiésemos podido saber si los primers, otros reactivos o el protocolo funcionaron. Esta medida fue tomada debido a la enorme dificultad de obtener controles positivos de laboratorios localizados en otras partes del mundo debido a las restricciones de envío existentes en la actualidad.

Afortunadamente, el Laboratorio de Microbiología de la USFQ empezó a realizar PCR en tiempo real para detectar *Chlamydia trachomatis* en muestras vaginales, y hasta la fecha ha detectado dos casos positivos. Los amplicones de esas pruebas fueron utilizados como control positivo en el presente estudio.

El estudio de Chahota *et al*, 2006, reveló que el 94,12% de las aves positivas a la PCR tenían *Chlamydomphila psittaci*, el 4,41% *Chlamydomphila abortus*, y el 1,47% *Chlamydomphila* sp.; por lo tanto podríamos inferir que las dos aves positivas en el presente trabajo son positivas a *Chlamydomphila psittaci*.

Al haber logrado amplificar algunas muestras con la PCR para bacterias, y las dos muestras con la PCR para Chlamydiaceae, podemos decir con certeza que las muestras fueron bien tomadas, y que se realizó exitosamente la extracción de ADN de las mismas.

El alto número de investigaciones en las cuales las aves no presentaban sintomatología, y a pesar de ello resultaron positivas en los estudios para detectar la presencia de la bacteria o de los anticuerpos contra ella, nos debe hacer reflexionar sobre

los casos de clamidiosis aviar que no se detectan, y mediante los cuales las personas en riesgo se encuentran más vulnerables de adquirir la infección (Travis *et al*, 2006a; Travis *et al*, 2006b; Raso *et al*, 2002; Herrera *et al*, 2001; Phalen, 2001; McElnea y Gross, 1999).

Debido al número reducido de muestras utilizado en este estudio se ha preferido no hacer inferencias acerca de la prevalencia de la enfermedad en las aves psittaciformes de los dos centros de manejo de fauna silvestre.

## 8. RECOMENDACIONES

En cuanto al método de PCR como herramienta diagnóstica, es un método eficaz, sencillo y que nos da resultados en pocos días (tomando en cuenta desde la extracción de ADN hasta la electroforesis en gel de agarosa para observar los productos de la PCR), por lo tanto se recomienda su uso para futuros estudios. McElnea y Cross (1999) encontraron en su investigación que la técnica de PCR es más sensible que el cultivo celular en la detección de *Chlamydophila psittaci*, y considerando que es una técnica segura para el personal que maneja las muestras, se debe preferir el uso de este tipo de técnicas moleculares en reemplazo de las técnicas previamente consideradas de referencia.

Siendo la eliminación de los cuerpos elementales de las Chlamydiales un proceso intermitente, se recomienda realizar un pool de muestras de al menos dos días diferentes, ya que una sola muestra puede brindar un resultado falso negativo (Heddema *et al*, 2006b). No se recomienda el uso del citobrush para tomar muestras cloacales en aves, ya que el procedimiento resulta muy invasivo y puede lesionar al animal. Se recomienda, en cambio, el uso del hisopo fecal, el cual implica un menor estrés para las aves (Sareyyupoglu *et al*, 2007). Además, este tipo de muestras es de utilidad para realizar investigaciones epidemiológicas que implican un gran número de aves (Heddema *et al*, 2006b).

Se debe evitar el uso de antibióticos de manera profiláctica, ya que los animales crean resistencia a los mismos y en el caso de necesitar administrarlos, estos no harán efecto sobre los patógenos. Todas las personas que trabajan o viven con aves deben estar informadas sobre la naturaleza de la infección con *Chlamydophila psittaci*.

Quienes trabajan con las aves deben usar implementos que eviten la transmisión de la bacteria, como son guantes, mascarilla y gafas protectoras. Se recomienda mojar las carcacas de las aves sospechosas al momento de realizar necropsias, para evitar la aerosolización de las heces. Se deben lavar bien las jaulas y recintos. Es indispensable



cumplir con la cuarentena de las aves nuevas que van a ingresar a un galpón. En cuanto a los propietarios de aves, deben evitar algunas prácticas como darse besos con las aves, o compartir comida con ellas. Así mismo deben limpiar las jaulas y eliminar los desechos de las aves frecuentemente (Smith *et al*, 2008).

Se debe seguir investigando la presencia de *Chlamydophila psittaci* no solo en psitácidos, ya que como lo demuestra el estudio de Pannekoek (2006), es posible encontrar otros genotipos distintos al A en personas, de manera que otras especies de aves también están relacionadas con la transmisión de la bacteria a humanos (Harkinezhad *et al*, 2007; Vanrompay *et al*, 2007). *Chlamydophila psittaci* es un patógeno importante tanto en aves como en seres humanos, y la dificultad de su diagnóstico nos lleva a la conclusión de que debemos seguir investigando su presencia en las aves en cautiverio y en vida libre de nuestro país.

## **Bibliografia**

1. Andersen A. Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels y

ERROR: syntaxerror  
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK:

57  
4930  
2