

Primera evidencia de *Chlamydia psittaci* en huron sable (*Mustella putorius furo*) en Venezuela

C. Rodríguez-Leo^{1,2*}, D. Camacho¹, V. Hernández-Aguilera², M. Viettri¹, C. Flores²,
H. Henríquez², M. González²

Artículo recibido: 31 de diciembre de 2017 · Aprobado: 1 de agosto de 2018

RESUMEN

Chlamydia psittaci (*Cp*) es una bacteria intracelular obligada transmitida a través de aerosoles derivados de secreciones nasales y ópticas, tejidos, heces y plumas. Comúnmente es identificada en aves, sin embargo, han emergido genotipos capaces de infectar nuevos reservorios mamíferos. Por ello, se buscó ADN de *Cp* en muestras de cinco individuos de *Mustella putorius furo* y un hisopado cloacal de un individuo de *Colinus cristatus* en cautiverio en Venezuela a través de la PCR-anidada, amplificando un segmento del gen 16S ADNr. Se demostró la presencia de *Cp* en un *Colinus cristatus* con signos de clamidiosis y en cuatro *Mustella putorius furo* sin signos clínicos de clamidiosis. Se indica un posible nuevo reservorio para *Cp*, donde el contacto con productos de excreción de *Colinus cristatus* con manifestaciones clínicas de clamidiosis, hacinamiento, inadecuada ventilación, contacto con productos de excreción de Psittaciformes y condiciones sanitarias deficientes favoreció la infección por *Cp*. Se desconoce el total de reservorios de *Cp*, por ello la notificación de los aislados permite el entendimiento, distribución y diversidad de agentes clamidiales en fauna silvestre y en cautiverio.

Palabras clave: reservorio, mamíferos, aves, cautiverio, *Chlamydia psittaci*.

First evidence of *Chlamydia psittaci* in the sable ferret (*Mustella putorius furo*) in Venezuela

ABSTRACT

Chlamydia psittaci (*Cp*) is an obligate intracellular bacterium, transmitted through aerosols from nasal and optic secretions, tissues, feces, and feathers. Although commonly identified in birds, genotypes have emerged that can infect new mammalian reservoirs. Therefore, of rectal swabs samples of five *Mustella putorius furo* individuals and a cloacal swab sample of *Colinus cristatus* in captivity, in Venezuela, were tested for *Cp*, using the nested PCR amplifying a segment of the 16S rDNA gene. The presence of *Cp* was found in four asymptomatic *Mustella putorius furo* and one symptomatic *Colinus cristatus* for avian chlamydiosis, indicating a new potential reservoir for *Cp*. The contact with excretions of infected *Colinus cristatus* and Psittaciformes, as well as overcrowding, inadequate ventilation, and inadequate

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco J. Triana Alonso (BIOMED), Universidad de Carabobo (Venezuela).

² Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas Dr. Carlos Palacios, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua (Venezuela).

* Autor para correspondencia: leogod1985@hotmail.com

sanitary conditions can favor *Cp* infection. The total number of *Cp* reservoirs is unknown; therefore, the noting and molecular characterization of isolates enable the understanding, distribution, and diversity of chlamydial agents in wildlife and animals in captivity.

Keywords: reservoir, mammals, birds, captivity, *Chlamydia psittaci*

INTRODUCCIÓN

Chlamydia psittaci (*Cp*) es una bacteria intracelular obligada que posee la capacidad de infectar más de 460 especies de aves (Kaleta y Taday 2003). Desde el punto de vista del hospedador posee diferencias filogenéticas, donde existe especificidad a especies aviares y mamíferas (Sachse 2015). Sin embargo, *Cp* ha diversificado su capacidad de infectar a múltiples especies, y es considerada un factor de riesgo mortal para especies en cautiverio (Frutos *et al.* 2015). La transmisión de *Cp* ocurre mediante la inhalación de aerosoles provenientes de secreciones nasales, orina, heces secas, tejidos y plumas de animales portadores de la bacteria (Sachse *et al.* 2015). Como consecuencia, en los centros de cautiverio existe un riesgo de transmisión permanente para diversas especies animales que de esta manera pueden llegar a desarrollar clamidiosis (Rodríguez-Leo *et al.* 2017a).

La clamidiosis es una infección del tracto respiratorio superior relacionada con conjuntivitis serosa y sinusitis, puede ser limitada o progresar rápidamente a neumonía, septicemia, hepatitis, esplenitis y en ocasiones muerte súbita del ave. En mamíferos generalmente es sub-clínica, sin embargo, puede generar letargo, anorexia, crecimiento retardado de crías, infertilidad, diarrea, cuadros graves de neumonía, queratoconjuntivitis y poliartritis (Sachse *et al.* 2015). Recientemente *Cp* ha adquirido mayor relevancia a nivel mundial en esta clase

de animales; Bhardwaj *et al.* (2015) asociaron a *Cp* como causante de neumonía (72,7%) y abortos (78,9%) en ovejas y cabras de vida libre en el Himalaya. En Alemania, Sprague *et al.* (2009) reportaron la presencia de *Cp* en cuatro caninos de una casa de crianza, las cuales presentaban cuadros recurrentes de queratoconjuntivitis, dificultad respiratoria y mortalidad del 50% en crías, asumiendo que la persistencia del cuadro se debe a la circunstancial introducción de tres psitácidos positivos para *Cp*.

El contacto previo con aves infectadas principalmente del orden Psittaciforme es un factor predisponente para la adquisición de *Cp*, por ello son necesarios métodos diagnósticos para la identificación de este agente. La implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de *Cp* de fauna en cautiverio, permite generar información para la creación de mecanismos epidemiológicos que eviten la diseminación de este microorganismo, sobre todo en Venezuela donde no existe un diagnóstico habitual de este agente en centros de cautiverio. Rodríguez-Leo *et al.* (2017b) demostraron elevada endemicidad en aves de diversos órdenes y señalan el riesgo de transmisión de *Cp* a mamíferos adyacentes a las jaulas de las aves positivas para este patógeno. Por ello, el presente trabajo tuvo como objeto la búsqueda de *Cp* en individuos de hurón sable (*Mustella putorius furo*) en cautiverio que habitaban junto a una perdiz crestada (*Colinus cristatus*) con características clínicas de clamidiosis aviar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

A partir de cinco individuos de hurón sable (*Mustelas putorius furo*) y una perdiz crestada (*Colinus cristatus*) en cautiverio, se recolectaron muestras de hisopados rectal y cloacal respectivamente. Para ello, los hurones fueron capturados con guantes de lona para la recolección de muestras de hisopados rectales, se lavó la región anal con una gasa y SSF 0,9% estéril, a continuación se introdujo un hisopo estéril en el recto de cada ejemplar; durante este proceso se realizaron movimientos rotatorios para la recolección de mayor cantidad de células, el mismo procedimiento se realizó para la perdiz. La manipulación de los animales se ejecutó de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del NCR (2011). Para ambas especies el procedimiento se realizó por cuadruplicado en el mismo espacio de tiempo, seguidamente, cada hisopo estéril se almacenó en un tubo con 1 mL de SSF 0,9% estéril y se guardó en una cava a temperatura promedio de -4°C para posteriormente ser transportadas al laboratorio N° 8 del Área de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco Triana Alonso, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Procedimiento experimental

La extracción del ADN bacteriano a partir de las células presentes en las muestras de hisopado rectal y cloacal se realizó a través del protocolo de fenol-cloroformo precipitación con etanol (Rodríguez-Leo *et al.* 2017a). Se empleó la técnica de PCR anidada optimizada por Rodríguez-Leo *et al.* (2017a) utilizando 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 amplicon 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 amplicon de 126 pb. Se utilizaron dos controles positivos a ADN de *Cp* (CP018 y CP046) donados por el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Zulia, Venezuela.

Las mezclas se realizaron con: Tampón de reacción (Promega®), Tris HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM; 2,5 mM MgCl₂ (Promega®), desoxinucleótidostrifosfato (dNTPs, del inglés *2'-desoxynucleoside 5'-triphosphate*) (10 mM), oligonucleótidos (10 pmol/μL), *Taq* polimerasa (1,25 U/μL). A las mezclas de reacción se agregaron 01 μL (50 ng) de las muestras de ADN extraídas, la mezcla de reacción se sometió a incubación con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 2 minutos, elongación a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 8 minutos en un termociclador PTC-100™ (MJ Research, INC®). La segunda reacción de PCR se realizó de igual manera usando como ADN molde 02 μL (50 ng) de los productos de

amplificación de la primera reacción, para un volumen final de reacción de 50 µL. Las condiciones de tiempo y temperatura fueron idénticas a las usadas en la primera reacción de amplificación.

Los productos finales se visualizaron en geles de agarosa al 2%, (Figura 1) y se compararon con el marcador de tamaño molecular 100 pb ADN Promega®. El resultado de la migración se observó en un equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 BIO-RAD® mediante el programa MultiAnalyst versión 1.1 (1996-97).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Chlamydia psittaci ha sido descrita primordialmente en aves, sin embargo, posee la capacidad de infectar a diversas especies de mamíferos, siendo descrita con mayor frecuencia en porcinos, equinos, caninos, caprinos y ovinos (Reinhold *et al.* 2012; Rodolakis *et al.* 2015). En un principio los genotipos de *Cp* eran considerados especie-específicos; no obstante, en la última década se ha evidenciado que los genotipos han ampliado el rango de hospedadores. Frutos (2015) aisló el genotipo WC en Passeriformes demostrando la variabilidad que *Cp* presenta y su capacidad de infectar a diferentes especies indistintamente del genotipo. En la presente investigación se identificó ADN compatible para *Cp* en un ejemplar de *Colinus cristatus*, dicha ave presentaba signos clínicos característicos de clamidiosis aviar entre ellos: plumas erizadas, depresión, respiración dificultosa, secreción nasal, ocular y diarrea, la cual se presume fue el reservorio y fuente aparente de infección para el resto de las animales en la habitación donde residía, principalmente para los hurones debido a que su jaula se encontraba junto a la de ellos.

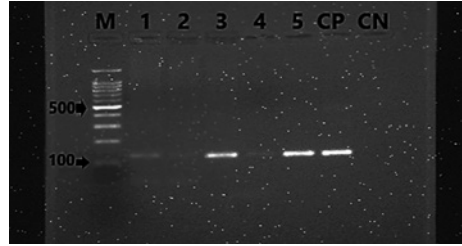


FIGURA 1. Electroforesis Gel de agarosa al 2% en TAE (Tris-acetato 40 Mm, EDTA 1 Mm pH 8) teñido con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) de los Productos de amplificación de la subunidad 16s ADNr de *Chlamydia psittaci* de los reservorios animales positivos en cautiverio. M: Maracador de tamaño molecular 100 pares de bases Promega®), carril 1 *Colinus cristaceo*, carril 2–5 *Mustella putorios furo*, CP Control Positivo, CN Control negativo.

Chlamydia psittaci se detectó en 4 de 5 individuos de *Mustella putorios furo*. Este hallazgo demostró la posibilidad de un nuevo reservorio para esta bacteria, lo que representa el primer reporte de *Cp* en *Mustella putorios furo* en Venezuela.

En relación a las condiciones de cautiverio de los hurones, estos eran mantenidos en dos jaulas de 80 x 50 x 70 cm, dentro de una habitación compartida con múltiples especies de aves y mamíferos. En la parte superior se encontraban dos jaulas con *Psittacula krameri* cuyas excretas se diseminaban por toda la habitación. Estos Psittaciformes no se muestrearon debido a que se encontraban en fase de ovipostura. Este orden de aves ha sido identificado como uno de los que mayor incidencia de *Cp* presenta (Raso *et al.* 2015). Por ello, representan un riesgo de transmisión para el resto de las especies de aves y mamíferos albergadas en la misma habitación.

A su vez, en la parte inferior de la habitación se encontraban múltiples jaulas con especies de conejos (*Oryctolagus cuniculus*), acures (*Cavia porcellus* y *Cavia*

Sheltie) y erizos morunos (*Atelerix algirus vagans*). En relación a la ventilación, esta era deficiente ya que la habitación solo poseía la puerta principal y una cúpula en la parte superior, lo que concentraba la cantidad de productos de excreción de los animales y la circulación de *Cp*.

Adicionalmente, uno de los elementos que posibilitó la transmisión de *Cp* en los hurones es que la perdiz presentaba signos clínicos de clamidiosis aviar, así que a través de aerosoles provenientes de sus secreciones nasales, orina, heces secas y plumas pudieron transmitir *Cp* a los primeros. Sin embargo, debido al desconocimiento sobre el tiempo de permanencia de los animales en el centro de cautiverio, la ausencia de un periodo de cuarentena, control del ingreso de especies animales y la ausencia del diagnóstico molecular de *Cp*, el mecanismo de transmisión es desconocido. En este sentido, es posible que la perdiz pudiera haber sido infectada por el contacto de los productos de excreción de los hurones representando una cepa de *Cp* de mayor virulencia en aves.

En este sentido, pudieron ser múltiples factores quienes favorecieron la transmisión de *Cp* a los hurones como la infraestructura sin ventilación, el espacio reducido, las deficiencias sanitarias, la diversidad de especies, así como la presencia de un ave positiva para *Cp* con signos de clamidiosis aviar. No obstante, la evidencia de ADN complementario para *Cp* no descarta la posibilidad de coinfección por otros miembros de la familia Chlamydiaceae. Así pues, es relevante destacar que especies como *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, y *C. abortus* poseen la capacidad de infectar aves y mamíferos (Frutos *et al.* 2015). En Argentina se identificó ADN compatible para *Chlamydia* sp. en hurones, donde no hubo amplificación para secuencias de

C. pneumoniae, *C. psittaci* y *C. abortus* (Frutos 2015).

C. psittaci y *C. abortus* guardan una estrecha relación filogenética, han sido descritos genotipos de *Cp* más cercanos a *C. abortus* siendo clasificados como cepas intermedias *C. psittaci* / *C. abortus* las cuales poseen elevada capacidad de infección a especies en cautiverio y vida libre (Szymańska-Czerwińska *et al.* 2017). Madani *et al.* (2013) identificó en *Psittacula krameri* una única secuencia de ADN con 98% y 92% de identidad con *C. abortus* y el genotipo F de *Cp*, respectivamente. En el presente estudio los cinco ejemplares de *Mustella putorius furo* se encontraban en contacto permanente con las excretas de *Psittacula krameri*, siendo este un mecanismo de transmisión para cualquier especie de la familia Chlamydiaceae que posea como reservorio Psittaciformes. Por ello, es ineludible la aplicación de técnicas moleculares para la detección de especies Chlamydiales. Opota *et al.* (2015) diseñaron una PCR altamente específica y sensible para la identificación de las especies de *Cp* y *C. abortus* debido al alto impacto que posee no solo para las aves y mamíferos, sino además para la salud pública.

La diversidad genética de *Cp* y su capacidad de infectar nuevos reservorios apunta hacia una aparente perspectiva evolutiva de esta especie, generando un nuevo abanico de huéspedes susceptibles a estas bacterias con genotipos altamente heterogéneos y con elevada capacidad de dispersión.

En este sentido se debe realizar el análisis filogenético de los aislados de especies clamidiales no solo para identificación de una posible coinfección, sino además, para la identificación del genotipo de *Cp* que se encuentre circulando. Madani *et al.*

(2013) afirman el advenimiento de nuevos genotipos de *Cp* donde la caracterización molecular representará una herramienta invaluable para el entendimiento y distribución de esta especie.

En el presente estudio no se logró realizar a la caracterización molecular debido a limitaciones de recursos financieros. No obstante, esta debe ser un instrumento que debe aplicarse debido a la diversidad de agentes clamidiales en fauna en cautiverio y vida libre, donde Venezuela, por ser uno de los países con una enaltecida biodiversidad debe velar por su conservación y preservación, primordialmente para la fauna en riesgo de extinción.

CONCLUSIONES

Se demostró por primera vez en Venezuela la presencia de ADN de *Cp* en *Mustella putorius furo*, donde el contacto con *Colinus cristatus* infectada, el hacinamiento, la inadecuada ventilación y las condiciones sanitarias deficientes favorecieron la infección por *Cp*. La identificación de *Cp* en fauna en cautiverio es un procedimiento que debe ser ejecutado de forma habitual, aun cuando el animal no posea signos de clamidiosis, incluyendo especies aviares y mamíferos debido a la diversidad de reservorios que posee *Cp*.

Recomendaciones

Es necesaria la caracterización molecular de los aislados de *Cp* para relacionar el genotipo presente en *Mustella putorius furo* con el de *Colinus cristatus* y ampliar la identificación de *Cp* en mamíferos en cautiverio, principalmente los que se encuentren en contacto con aves o con la cercanía de estas a sus jaulas. Por último, es preciso evaluar la presencia de *Cp* en fauna silvestre de Venezuela para

el reconocimiento de los reservorios y su relación con las condiciones geográficas de este país.

REFERENCIAS

- Bhardwaj B, Chahota R, Gupta S, Malik P, Sharm M. 2017. Identification of chlamydial strains causing abortions and pneumonia in sheep and goat flocks during trans Himalayan seasonal migration in the northern region of India. *Vet Arhiv.* 8(2): 157-170.
- Frutos MC, Monetti M, Mosmann J, Venezuela R, Kiguen X, Cadario ME, Re V, Cuffini C. 2015. Eco-epidemiología de las *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*: impacto en la salud pública. *ASEL.* 23(89): 45-51.
- Frutos MC. 2015. Eco epidemiología de *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*: Impacto en la salud pública [tesis doctoral]. [Córdoba (AR)]: Universidad Nacional de Córdoba.
- Kaleta EF, Taday EM. 2003. Avian host range of *Chlamydochlamydia* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32(5): 435-61. Doi: 10.1080/03079450310001593613.
- Madani SA, Peighambari SM. 2013. PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. *Avian Pathol.* 42(1): 38-44. Doi: 10.1080/03079457.2012.757288.
- [NRC] National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. 8^o ed. Washington (DC): National Academies Press; [citado 2017 oct. 30]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>.
- Opota O, Jatón K, Branley J, Vanrompay D, Erard V, Nicole Borel, Longbottom D, Greub G. 2015. Improving the molecular diagnosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* infection with a species-specific duplex real-time PCR. *J Med Microbiol.* 64(10): 1174-1185. Doi: 10.1099/jmm.0.000139.
- Raso TF, Ferreira VL, Pinto AA. 2015. Diversity of avian hosts for Chlamydiae in Brazil. En: 3rd

- European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-3); 2015 sept. 24-25; Maisons-Alfort (FR).
- Reinhold P, Ostermann C, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Vogel A, Lambertz J, Rothe M, Schubert E, Sachse K. 2012. A bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection: challenge dose titration. PLoS ONE. 7(1): e30125. Doi: 10.1371/journal.pone.0030125.
- Rodolakis A, Laroucau K. 2015. Chlamydiaceae and chlamydial infections in sheep or goats. Vet Microbiol. 181(1): 107-118. Doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.010.
- Rodríguez-Leo C, Hernández V, Abou Orm S, Díaz Y, Camacho D, Arraíz N, Useche E. 2017a. *Chlamydia psittaci* en aves Psitácidas en dos parques zoológicos de Venezuela. Acta Biol Colomb. 22(3): 394-397. Doi: 10.15446/abc.v22n3.64742.
- Rodríguez-Leo C, Camacho D, Hernández V, Briceño A, Mora M, Pérez-Ybarra L, Prieto C. 2017b. *Chlamydia psittaci* en aves en cautiverio del *Aquarium* de Valencia, Venezuela. Saber. 29: 801-808.
- Sachse K, Laroucau K, Vanrompay D. 2015. Avian chlamydiosis. Curr Clin Micro Rpt. 2(1): 10-21.
- Sprague L, Schubert E, Hotzel H, Scharf S, Sachse K. 2009. The detection of *Chlamydophila psittaci* genotype C infection in dogs. Vet J. 181(3): 274-279. Doi: 10.1016/j.tvjl.2008.04.002 .
- Szymańska-Czerwińska M, Mitura A, Niemczuk K, Zaręba K, Jodełko A, Pluta A, Scharf S, Bailey Vitek B, Aaziz R, Vorimore F, et al. 2017. Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: Isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains. PLoS ONE. 12(3): e0174599. Doi: 10.1371/journal.pone.0174599.

Article citation

Rodríguez-Leo C, Camacho D, Hernández V, Vietri M, Flores C, Henríquez H, González M. 2018. Primera evidencia de *Chlamydia psittaci* en huron sable (*Mustella putorius furo*) en Venezuela. [First evidence of *Chlamydia psittaci* in the sable ferret (*Mustella putorius furo*) in Venezuela]. Rev Med Vet Zoot. 65(2): 172-178. Doi:10.15446/rfmvz.v65n2.75639.