



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA
SEDE CONCEPCIÓN**

**PREVALENCIA DE *Chlamydia psittaci* DIAGNOSTICADA POR
TÉCNICA MOLECULAR PCR EN MUESTRAS DE AVES SILVESTRES
ALMACENADAS EN EL CENTRO DE REHABILITACIÓN DE FAUNA
SILVESTRE DE LA UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN EN LA REGIÓN
DEL BIOBÍO.**

Memoria para optar al título de Médico Veterinario

Profesor Tutor: Dr. Sc Constanza Javiera Aguilera González MV.

Estudiante: Tamara Andrea Reyes Alarcón.

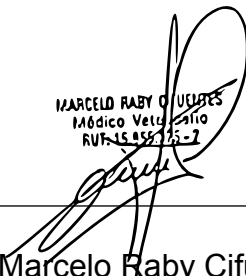
®Tamara Andrea Reyes Alarcón, Constanza Javiera Aguilera González.

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Concepción, Chile
2024

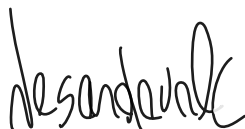
CALIFICACIÓN DE LA MEMORIA

En Concepción, el día 28 de octubre de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que la estudiante TAMARA ANDREA REYES ALARCÓN de la carrera de MEDICINA VETERINARIA ha aprobado la memoria para optar al título de MÉDICO VETERINARIO con una nota de 6,1.



MARCELO RABY CIFUENTES
Médico Veterinario
RUF-15.956.75-2

Mg Marcelo Raby Cifuentes.
Profesor Evaluador



Mg Nelson Sandoval Cancino
Profesor Evaluador



Dcs. Constanza Aguilera González
Profesor Tutor

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Marcela y Cristián, por darme ánimos, siempre confiar en mí, recalcar me lo orgullosos que están por lo que he logrado y otorgarme las herramientas necesarias para mi formación.

A la Dra. Constanza Aguilera, por su paciencia, sus conocimientos, su tiempo y su confianza que tuvo conmigo.

A mi pareja Max, por apoyarme en los momentos que sentía que no podía más, en dejarme en claro que soy capaz de conseguir lo que me proponga y mucho más, por su paciencia y consuelo.

A mi gran amiga Josefina, que ha sido un pilar fundamental en estos años de formación, por no perder el contacto y que podamos reencontrarnos como futuras colegas.

A la Dra. Solange Urrutia, por darse el tiempo de orientarme, guiarme con sus conocimientos, por su apoyo y cercanía.

Al Dr. Ignacio Carrasco por la entrega de vacunas Felocell® 4, las cuales fueron de vital importancia para el desarrollo de la PCR, sin ellas no se tendrían los resultados.

Y a mí misma, por seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	Vli
RESUMEN	Vlli
ABSTRACT	Vllli
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODO	8
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	16
7. CONCLUSIONES	20
8. REFERENCIAS	21
9. ANEXOS	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen y tipo de muestras analizadas para la detección del agente <i>Chlamydia psittaci</i>	9
---	---

Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de <i>Chlamydia psittaci</i>	13
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Control técnico Segmento VD y CP.....	15
Figura 2. Electroforesis Gel de agarosa al 1,2% segmento CP.....	16
Figura 3. Electroforesis segmento VD.....	17

RESUMEN

La *Chlamydia psittaci* es el agente causal de Clamidiosis aviar y Psitacosis en humanos, es una enfermedad potencialmente zoonótica, siendo una de las vías de contagio más frecuente la inhalación de partículas aerolizadas procedentes de excretas contaminadas. El grado de exposición de los humanos hacia este patógeno se ve incrementado por la creciente interacción con aves silvestres, lo cual implica un riesgo para la salud tanto pública como animal, siendo de suma importancia la detección oportuna. El objetivo de este proyecto fue identificar la presencia de *Chlamydia psittaci* en aves silvestres que ingresaron al Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre de la Universidad San Sebastián mediante la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para ello se realizó un estudio experimental de tipo retrospectivo, en el que se evaluaron 43 muestras provenientes de hisopados cloacales y heces extraídas de aves que ingresaron desde el año 2022 al 2023 al Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre (CEREFAS). Se evaluó la prevalencia de este agente en las aves silvestres para determinar que género taxonómico se ve más afectado por la transmisión de la bacteria. Los resultados evidenciaron la presencia de la bacteria en el género *Leucocarbo bougainvillii*.

La presencia fue corroborada por el análisis de dos segmentos genéticos de la bacteria, utilizando dos PCRs, cada uno dirigido hacia el segmento correspondiente. Estos resultados demuestran la importancia de la transmisión entre aves silvestres del género *Leucocarbo* y aves domésticas, pudiendo ser esta especie centinela para detectar la presencia del patógeno en poblaciones silvestres. Se calculó porcentaje de prevalencia de la bacteria *Chlamydia psittaci* según el resultado obtenido de la única muestra positiva dando un valor de 2% de prevalencia. Debido a la baja prevalencia no se realizó la comparación de porcentajes por género taxonómico, dato necesario para realizar la prueba estadística Chi cuadrado que tampoco se logró utilizar.

Palabras claves: *Chlamydia psittaci*, Clamidiosis aviar, Psitacosis, Enfermedad zoonótica.

ABSTRACT

Chlamydia psittaci is the causative agent of avian chlamydiosis and psittacosis in humans, it is a potentially zoonotic disease, being one of the most frequent routes of infection is the inhalation of aerosolized particles from contaminated excreta. The degree of exposure of humans to this pathogen is increased by the growing interaction with wild birds, which implies a risk for both public and animal health, being of utmost importance the timely detection. The objective of this project was to identify the presence of *Chlamydia psittaci* in wild birds that entered the Wildlife Rehabilitation Center of the Universidad San Sebastián using the polymerase chain reaction (PCR) molecular technique.

For this purpose, a retrospective experimental study was carried out, in which 43 samples from cloacal swabs and feces extracted from birds that entered the Wildlife Rehabilitation Center (CEREFAS) from 2022 to 2023 were evaluated. The prevalence of this agent in wild birds was evaluated to determine which taxonomic genus is most affected by the transmission of the bacterium. The results showed the presence of the bacterium in the genus *Leucocarbo bougainvillii*.

The presence was corroborated by the analysis of two genetic segments of the bacterium, using two PCRs, each one directed towards the corresponding segment. These results demonstrate the importance of transmission between wild birds of the genus *Leucocarbo* and domestic birds. This species could be a sentinel for detecting the presence of the pathogen in wild populations. The percentage prevalence of the bacterium *Chlamydia psittaci* was calculated according to the result obtained from the only positive sample, giving a value of 2% prevalence. Due to the low prevalence, a comparison of percentages by taxonomic genus was not performed, which was necessary to perform the Chi-cuadrado statistical test, which was also not possible to use.

Keywords: *Chlamydia psittaci*, Avian chlamydiosis, Psittacosis, Zoonotic disease

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han ocasionado una relación y contacto más estrecho con la vida silvestre, los animales domésticos y los humanos (Kock y Cáceres-Escobar, 2022). Factores como el crecimiento demográfico, producción de alimentos de origen animal, cambio climático y ecológico, y la tendencia creciente de adoptar animales silvestres como mascotas genera una exposición cruzada, ocasionando reemergencia de enfermedades ya erradicadas o controladas (Báez, 2019). Por lo cual, el contacto estrecho entre humanos y especies silvestres ayuda a crear un ambiente óptimo para la transmisión de patógenos zoonóticos (Craft, 2015).

En la actualidad, la urbanización tiene una importancia crítica para la aparición y el mantenimiento de epidemias, así como la aparición de enfermedades zoonóticas (Ellwanger et al., 2020). Actualmente, la importancia de las zoonosis radica en la necesidad de un trabajo a nivel multidisciplinario, tomando en cuenta la facilidad de transmisión que presentan estas patologías ya que son una amenaza para la salud y el bienestar de la población (Báez, 2019).

Las aves silvestres interaccionan con humanos en las ciudades, algunas de estas se han adaptado alimentándose de basureros, lo cual añade un reto para la salud pública, debido a que luego de alimentarse pasan su estancia en humedales utilizados para actividades de ocio o consumo humano (Contreras et al., 2016).

Un factor a considerar es el contacto de humanos con aves que nidifican en las viviendas, como lo son las palomas, las cuales sus excretas suponen un riesgo de transmisión de hongos como *Cryptococcus neoformans*, el cual se transmite por inhalación (Rosario et al., 2008). Los nidos de la avifauna pueden albergar especies de ectoparásitos, quienes son potenciales vectores de infecciones zoonóticas, como *Ixodes spp.*, *B. burgdorferi* y *Dermanyssus gallinae*, entre otros (Boseret et al., 2013).

De la misma manera, es de interés zoonótico el grupo de aves como mascotas de origen exótico, debido a la cercanía con las personas en el ámbito doméstico, en especial su

aproximación hacia niños o enfermos, por lo que es necesario mantener normas higiénicas en los bebederos y baños de las mascotas (Boseret et al., 2013).

Las probabilidades de zoonosis entre humanos y animales silvestres aumentan considerablemente por factores de riesgo relacionados con el tráfico de fauna silvestre (Doody et al., 2021). En Chile la fauna silvestre está compuesta por mamíferos, aves, reptiles y anfibios (De la Maza y Bonacic, 2013). Cuando se efectúa el tráfico de aves, estas, al ser capturadas, están en constante alerta como mecanismo de defensa, incrementando los niveles de estrés y como consecuencia, generando inmunosupresión en el individuo, factor que eleva el riesgo de excreción de agentes patógenos por reactivación de infecciones subclínicas o latentes (Contreras et al., 2016).

Una de las zoonosis aviares más frecuentes en humanos es causada por *Chlamydia psittaci*, característica pero no exclusiva de las aves del orden de los *Psittaciformes*: cacatúas, loros, cotorras, periquitos, entre otras, las cuales además son utilizadas como mascotas (Contreras et al., 2016). La circulación de esta bacteria entre la población de *Psittacidae* en cautiverio representa un peligro tanto para las aves como para la salud pública, ya que el tráfico de vida silvestre es un problema de gran magnitud (Ruiz-Laiton et al., 2022).

Se ha demostrado que esta bacteria puede infectar a más de 465 especies de aves, incluyendo psitácidas, palomas, pavos, patos y pollos (Kaleta y Taday, 2003). Siendo las aves infectadas con mayor frecuencia las aves acuáticas, las palomas, las garzas y los loros (Khan et al., 2019). *C. psittaci* se describe como un patógeno especialmente potente, flexible y resistente (Knittler y Sachse, 2015) el cual es reactivado en situaciones de estrés (Contreras et al., 2016).

Chlamydia psittaci es el agente causal de la Clamidiosis aviar y la Psitacosis en humanos, que también es conocida como Ornitosis (Gedye et al., 2018).

La Psitacosis es una enfermedad de declaración obligatoria, debe declararse a la Autoridad Sanitaria Regional dentro de las 24 horas contadas desde la confirmación o desde la clasificación final del diagnóstico, luego deberá ser comunicada al Ministerio de Salud (Presidente de la República, 2019, Decreto 7, Artículo 1).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (2012), describe en aves signos clínicos tales como: Conjuntivitis, anorexia, pérdida de peso, diarrea, heces amarillas, sinusitis, biliverdina urinaria, rinorrea, estornudos, lagrimeo y dificultad respiratoria, signos que dependen de la especie de ave, edad y virulencia de la cepa. En la necropsia, a menudo se observa necrosis hepática multifocal, esplenomegalia y aerosaculitis fibrosa, pericarditis y peritonitis (Borel et al., 2018).

En humanos suelen tener una aparición abrupta de fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, malestar general y mialgia, cursando generalmente con tos no productiva que puede acompañarse con disnea (Stewardson y Lindsay, 2010).

Este patógeno se transmite por vía respiratoria a partir de excretas, secreciones nasales, tejidos y plumas contaminadas, siendo la vía más frecuente la inhalación de partículas aerolizadas procedentes de excretas contaminadas (Belchior et al., 2011).

Un estudio realizado por Ossa-Giraldo et al. (2023) encontró seropositividad en un 31,5% de anticuerpos contra *C. psittaci* en 54 individuos expuestos laboralmente a aves en Medellín, demostrando el riesgo que conlleva la manipulación de estas aves, indicando que el ejercer labores en función a su manipulación sin ser médico veterinario es un factor de riesgo para el desarrollo de los anticuerpos mencionados.

Esta bacteria de la familia *Chlamydiaceae* es intracelular obligada Gram negativa, la cual una vez que el patógeno ingresa a la célula huésped queda encerrado en una vacuola unida a una membrana, el cuerpo reticulado crece por fisión binaria y luego se diferencia en cuerpo elemental, los cuales se liberan e infectan una nueva célula huésped (Boret et al., 2018).

Esta familia contiene un solo género, *Chlamydia*, que incluye 11 especies: *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. suis* y *C. trachomatis* (Sachse et al., 2015).

Existen diversos métodos para diagnosticar la infección por *Chlamydia* (Hogerwerf et al., 2017). Una de estas técnicas se basa en anticuerpos entre los cuales están: el método de fijación del complemento o la reacción de inmunofluorescencia indirecta, visualización

directa mediante técnicas histológicas o citológicas específicas y aislamiento bacteriológico o ELISA (Andersen y Vanrompay, 2003).

El aislamiento mediante cultivo celular se considera el gold standard, permite producir controles positivos de antígenos, que pueden ser empleados en el diagnóstico rutinario (Andersen y Franson, 2007; Andersen y Vanrompay, 2008). Sin embargo no es recomendado debido al tiempo que se necesita, la dificultad y el riesgo biológico que implica (Frutos, 2015). Por estas razones la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está reemplazando la detección de clamidias en cultivo de tejidos (Solórzano, 2021).

Otras ventajas que presenta el PCR son su facilidad de transporte, almacenamiento y conservación de las muestras, así como su alta sensibilidad y especificidad, que es independiente de la viabilidad del agente (OIE, 2012). Los tipos de PCR varían desde PCR cuantitativas en tiempo real y PCR en tiempo final o convencional, la cual tiene una alta sensibilidad al dirigirse a un segmento de ADN relativamente corto o al utilizar un procedimiento anidado (OIE, 2018).

Inicialmente *C. psittaci* ha sido clasificada en 9 genotipos: A-F, E/B, M56 y WC, basados en la secuencia de la proteína A de la membrana externa (ompA) (Linzitto et al., 2016). Cada genotipo tiene una marcada preferencia por hospedador: A en aves psitácidas, B en Columbiformes; genotipo C se ha observado en aves anseriformes y galliformes, D en galliformes, E en aves columbiformes, anseriformes, entre otras, F en aves psitácidas y galliformes, WC en bovinos y M56 en roedores (Sachse et al., 2015). Posteriormente se propusieron 8 nuevos genotipos los cuales fueron encontrados en aves psitácidas y silvestres, cada uno de los cuales tienen la misma características de ser potencialmente zoonóticos (Szymańska-Czerwińska et al., 2017).

Para la detección de *C. psittaci* mediante PCR, la secuencia a elección es el ARNr 16S-23S o el gen ompA (Sachse et al., 2009).

Considerando lo anteriormente mencionado, es importante determinar la magnitud de la presencia de *C. psittaci* en la población de aves silvestres debido a que esta bacteria es potencialmente zoonótica y el grado de exposición de los humanos hacia este patógeno

se ve incrementado por la creciente interacción con aves silvestres, lo cual implica un riesgo para la salud tanto pública como animal (Craft, 2015; Boseret et al., 2013). Todos estos antecedentes generan la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la prevalencia de *C. psittaci* en aves silvestres que ingresan al centro de rehabilitación de la fauna silvestre de la Universidad San Sebastián sede Concepción?

2. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H0)

No existe presencia de *Chlamydia psittaci* en muestras congeladas de hisopados y heces de aves silvestres ingresadas al CEREFAS de la Universidad San Sebastián sede Concepción utilizando la técnica molecular PCR.

Hipótesis Alterna (H1)

Si existe presencia de *Chlamydia psittaci* en muestras congeladas de hisopados y heces de aves silvestres ingresadas al CEREFAS de la Universidad San Sebastián sede Concepción utilizando la técnica molecular PCR.

3. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Determinar la prevalencia de *Chlamydia psittaci* en muestras de aves silvestres que ingresen al centro de rehabilitación de fauna silvestre de la Universidad San Sebastián mediante la técnica molecular PCR

3.2.- Objetivos Específicos

- Identificar la presencia o ausencia de *Chlamydia psittaci* en muestras de aves silvestres que ingresen al centro de rehabilitación de fauna silvestre de la Universidad San Sebastián mediante la técnica PCR.
- Comparar el porcentaje de prevalencia en las muestras de diferentes géneros taxonómicos de aves silvestres que ingresen al centro de rehabilitación de fauna silvestre de la Universidad San Sebastián

4. MATERIALES Y MÉTODO

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto código USS-FIN-23-FAIN-21 de la Universidad San Sebastián.

4.1 Materiales:

- Kit E.Z.N.A
- Termociclador
- Refrigerador
- Cabina de flujo
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes
- Tubos Eppendorf 0,2 ml
- Centrifuga
- Reactivos: enzima 2xGoTaq® Green Master Mix, agua libre de nucleasas y partidor.
- Gel de agarosa 2%

4.2 Tipo de Estudio

Se realizó un estudio experimental de tipo retrospectivo.

4.3 Tamaño de muestra

El número de muestras fue determinado a conveniencia según el número de aves silvestres que ingresaron al CEREFAS durante los años 2022-2023, por lo que se contó con un total de 43 muestras a la fecha.

4.4 Enfoque metodológico de la investigación

Este estudio contempló la extracción de ADN en muestras almacenadas de diferentes especies de aves silvestres que ingresaron al Centro de Rehabilitación de fauna silvestre (CEREFAS) durante el primer semestre del 2024 en la Universidad San Sebastián de la región del BioBío sede Concepción.

4.5 Lugar de estudio:

La toma de muestra se realizó en el centro de rehabilitación de fauna silvestre (CEREFAS), mientras que el procesamiento de la misma se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la Universidad San Sebastián región del BioBío sede Concepción.

4.6 Obtención de muestras

Para este estudio, se utilizaron muestras almacenadas de hisopados cloacales y heces de aves que ingresaron al CEREFAS de la Universidad San Sebastián de la región del BioBío sede Concepción desde el año 2022 hasta noviembre del año 2023. Aquellas fueron almacenadas en alcohol al 70% y congeladas -20°C para su posterior extracción de ADN que se realizó a partir del 2024. Para este estudio se cuenta con un total de 43 muestras tomadas a la fecha. Las muestras almacenadas se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Origen y tipo de muestra analizadas para la detección del agente *Chlamydia psittaci*.

N° Registro	Especie	Tipo de muestra
2160	<i>Pelecanus thagus</i>	Hisopado cloacal
2311	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2065	<i>Gallinula melanops</i>	Hisopado cloacal
2126	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2064	<i>Cygnus melancoryphus</i>	Hisopado cloacal
2096	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2119	<i>Leucocarbo bougainvillii</i>	Hisopado cloacal
2139	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2063	<i>Geranoaetus polyosoma</i>	Hisopado cloacal
2277	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2104	<i>Phalacrocorax guimardi</i>	Hisopado cloacal
2347	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal

2212	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2354	<i>Anas flavirostris</i>	Hisopado cloacal
2387	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
1964	<i>Spheniscidae</i>	Heces
1591	<i>Spheniscidae</i>	Heces
2026	<i>Coragyps atratus</i>	Hisopado cloacal
1811	<i>Leucocarbo bougainvillii</i>	Hisopado cloacal
1969	<i>Pelecanus thagus</i>	Hisopado cloacal
1822	<i>Glaucidium nana</i>	Hisopado cloacal
2015	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
1868	<i>Pelecanus thagus</i>	Hisopado cloacal
1996	<i>Enicognathus leptorhynchus</i>	Hisopado cloacal
1626	<i>Bubo magellanicus</i>	Hisopado cloacal
1994	<i>Egretta thula</i>	Hisopado cloacal
1920	<i>Pelecanus thagus</i>	Hisopado cloacal
2025	<i>Rollandia rolland</i>	Hisopado cloacal
58	<i>Milvago chimango</i>	Hisopado cloacal
59	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Hisopado cloacal
1992	<i>Leucocarbo bougainvillii</i>	Hisopado cloacal
1905	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
64	<i>Anas geórgica</i>	Hisopado cloacal
2019	<i>Cathartes aura</i>	Hisopado cloacal
1853	<i>Strix rufipes</i>	Hisopado cloacal
1941	<i>Leucocarbo bougainvillii</i>	Hisopado cloacal
68	<i>Larus dominicanus</i>	Hisopado cloacal
2037	<i>Phytotoma rara</i>	Hisopado cloacal
2499	<i>Ardea cocoi</i>	Hisopado cloacal
2553	<i>Leucocarbo bougainvillii</i>	Hisopado cloacal

4189	<i>Enicognathus leptorhynchus</i>	Hisopado cloacal
4283	<i>Turdus falcklandii</i>	Hisopado cloacal
4295	<i>Tyto alba</i>	Hisopado cloacal
4107	<i>Tyto alba</i>	Hisopado cloacal
3962	<i>Turdus falcklandii</i>	Hisopado cloacal
4298	<i>Tyto alba</i>	Hisopado cloacal
1876	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Hisopado cloacal
3932	<i>Bubo magellanicus</i>	Hisopado cloacal
2977	<i>Elaenia albiceps</i>	Hisopado cloacal

Elaboración propia

4.7 Extracción de ADN

Se utilizó el kit E.Z.N.A de extracción de ADN especializado en aislamiento de patógenos desde materia fecal (pathogen kit Omega, Biotek cod. OB.D4035-01). Para ello, el procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En términos generales, las muestras fueron centrifugadas a 10.000g por 5 minutos para eliminar remanentes de alcohol, descartando el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 300 µL de PBS en cada muestra para obtener el volumen óptimo por muestra. Siguiendo con las instrucciones del fabricante, las muestras fueron transferidas a tubos disruptores, los cuales contenían perlas captadoras de remanentes de gran tamaño. Luego, se añadieron 20 µL de proteinasa K a cada tubo disruptor con la muestra correspondiente. Posteriormente, la muestra se incubó por 15 minutos a 70°C. A continuación, la muestra fue centrifugada a 12.000g por 5 minutos. Los remanentes de gran tamaño, que pudiesen interferir con la extracción de ADN, se adhirieron a las perlas del tubo disruptor y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Se añadió luego 300 µL de buffer RBB y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra luego fue transferida a la columna de aislamiento de ADN para ser centrifugada a 12.000g por 1 minuto. El buffer HBC y el buffer de lavado, fueron añadidos, según las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron diluidas en 30 µL de buffer de elusión y almacenadas a -20°C para su posterior uso.

4.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo final

Para determinar la presencia del ADN de *C. psittaci* en las diferentes muestras, se utilizaron partidores reportados en la literatura que están dirigidos al gen de la proteína ompA. El producto corresponde a un fragmento de 418 pb y un fragmento 1378 pb, el cual fue visualizado en un gel de agarosa al 1,2%. La secuencia de los partidores se encuentra en la **Tabla 2**.

El control positivo consistió en ADN extraído de la vacuna comercial Felocell® 4 Zoetis, el cual contiene la cepa *Chlamydomphila felis* – Cepa BAKER.

Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de *Chlamydia psittaci*.

Cebador	Secuencia	Referencia
VD1-F	5'-ACT ACG GAG ATT ATG TTT TCG ATC GTG T-3'	Andersen y Varompay (2000)
VD2-R	5'-CGT GCACCYACG CTC CAA GA-3'	Andersen y Varompay (2000)
Cp-F	5'-TGC AAG ACA CTC CTC AAA G-3'	Vilela et al., (2019)
Cp-R	5'-AGG TTC TGA TAG CGG GAC-3'	Vilela et al., (2019)

Elaboración propia

La elaboración se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL los cuales incluyen la enzima, los partidores y el agua de uso molecular. La enzima utilizada será 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA). Los partidores estuvieron a una concentración de 0,6 µM y el agua utilizada para la reacción fue libre de nucleasas.

4.9 Visualización de resultados

Los resultados fueron visualizados mediante una electroforesis de gel de agarosa al 1,2%. Para ello se realizó un gel de agarosa con 1,2 gramos de agarosa, diluidos en 100 ml de TAE 1x. Para la elaboración del TAE 1x, se usó como reactivo TAE comercial-Tris Acetate-EDTA buffer 50x, 1L (TAE) cod. –SC281694SANTA-. Para la posterior visualización, se utilizó la tinción Safe View 20.000x (Thermo scientific) a una concentración inicial de 6.000x (2 µL por cada 10 µL de muestra) como colorante de carga. El uso de escalera de ADN (Ladder Biolabs) fue de 1000 pb para el fragmento CP y de 50 pb para el fragmento VD. Para su visualización en el gel, se utilizó 4 µL de Ladder y 2 µL de TriTrack. La electroforesis se realizó a 75 voltios por dos horas. La visualización

del gel realizó utilizando el transluminador del laboratorio de investigación de la Universidad San Sebastián.

4.10 Estimación del porcentaje de prevalencia

El porcentaje de prevalencia se calculó con la siguiente fórmula:

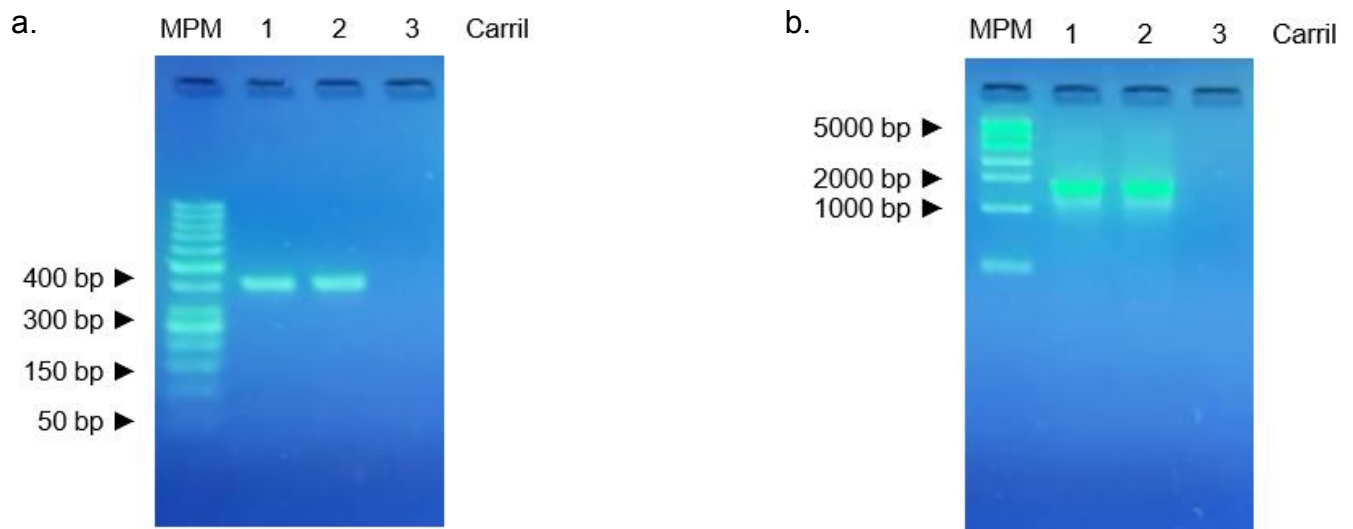
$$\frac{\text{Total de muestras positivas}}{\text{Total de muestras analizadas}} \times 100 = 2\%$$

Se calculó el porcentaje de ocurrencia para todas las especies de aves silvestres, dando como resultado 2%.

5. RESULTADOS

Se obtiene extracción de ADN desde muestras de hisopados cloacales y heces desde pacientes ingresados a CEREFAS dando un total de 43 muestras, por medio de la técnica PCR se obtuvo la amplificación de los segmentos de ADN CP y VD provenientes del gen *ompA* tanto para el control positivo (vacuna comercial Felocell®) (**Figura 1**) como para la muestra N°13 proveniente de *Leucocarbo bougainvillii*. Durante la visualización de la amplificación, se evidencio el resultado positivo tanto para el segmento CP de 1378 pb como para el segmento VD de 418 pb cargados en un total de 20 pozos, para lo cual se realizó electroforesis en el producto final de la PCR en un gel de agarosa al 2% para observar la presencia de la bacteria *Chlamydia psittaci*.

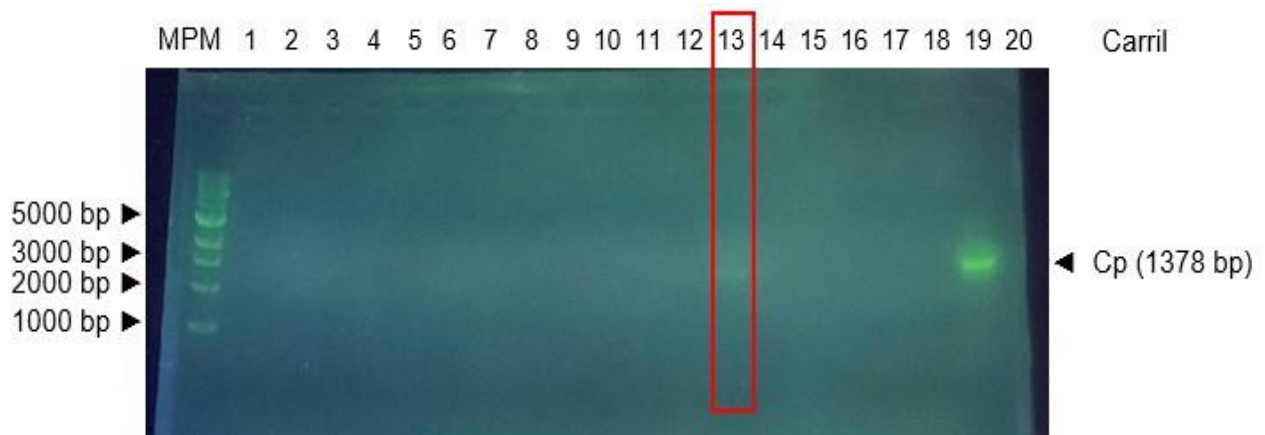
Figura 1. Control técnico Segmento VD y CP



(a) Corresponde al segmento VD, con un MPM de 50 pb. Carril 1 y 2 ambos controles positivos y carril 3 control negativo; (b) Corresponde al segmento CP, con un MPM de 1000 pb. Carril 1 y 2 ambos controles positivos y carril 3 control negativo.

Se comenzó con la amplificación del gen en el fragmento CP (Cp-F 5'-TGC AAG ACA CTC CTC AAA G-3'; Cp-R 5'-AGG TTC TGA TAG CGG GAC-3'), ya que otorga mayor visualización en presencia de casos positivos. Los geles se visualizaron y se observó una banda a la altura de 1378 pb (**Figura 2**) indicando la presencia del microorganismo en una de 43 muestras en total, encontrándose las demás muestras negativas ya que no hay presencia de bandas. En conformidad con el objetivo específico uno, fue posible identificar la presencia de *Chlamydia psittaci*.

Figura 2. Electroforesis Gel de agarosa al 1,2%, segmento CP



MPM: Marcador de peso molecular 1000 pares de base, carril 1-19 muestras ADN, carril 13 presencia de banda, carril 20 control positivo CP.

Según el registro que se llevó a cabo, al realizar la amplificación del ADN, el resultado que da positivo corresponde a una ave silvestre del orden Suliformes, conocido comúnmente como Guanay (*Leucocarbo bougainvillii*).

La muestra positiva se amplificó nuevamente esta vez utilizando el fragmento VD (VD1-F 5'-ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGT-3'; VD2-R 5'-CGTGCACCYACGCTCCAAGA-3') (**Figura 3**), dando nuevamente positiva,

confirmando de esta manera el hallazgo de una manera más específica al dar positivo a ambos fragmentos del gen *ompA* que corresponden al mismo patógeno

Figura 3. Electroforesis segmento VD.



Se visualiza banda en carril 3, confirmando nuevamente el resultado positivo de segmento CP.

De acuerdo con el segundo objetivo, se calculó porcentaje de prevalencia de la bacteria *Chlamydia psittaci* según el resultado obtenido de la única muestra positiva dando un valor de 2% de prevalencia. Debido a la baja prevalencia no se realizó la comparación de porcentajes por género taxonómico, dato necesario para realizar la prueba estadística Chi cuadrado que tampoco se logró utilizar.

6. DISCUSIÓN

Se ha determinado la prevalencia de *Chlamydia psittaci* en muestras de aves silvestres ingresadas a la Universidad San Sebastián sede Concepción, esto fue diagnosticado con la debida realización de la PCR en muestras de hisopados cloacales, dando un porcentaje de prevalencia de un 2%.

Como menciona Nieuwenhuizen et al., (2018) la PCR es el método de diagnóstico seleccionado para evaluar prevalencia de la bacteria, esta es sin duda una prueba suficientemente específica logrando evitar falsos positivos y resultados inespecíficos, con la limitación de que tendrá una mayor sensibilidad en el momento en que el individuo esté pasando por la fase aguda de la patología.

Además al realizar la debida estandarización de muestra para control positivo realizado con la vacuna Felocell® 4, ayudó de manera que se confirman los verdaderos negativos, como lo expresan Van Looock et., al (2005) en su estudio de diagnóstico de la bacteria *C. psittaci* en pavos, en donde se plantea el control interno como una necesidad para confirmar lo verdaderos resultados negativos de la PCR.

Panzetta et al., (2018) menciona que en situaciones estresantes para el patógeno (Ej, presencia de antimicrobianos o privación de nutrientes esenciales) puede entrar en un estado persistente interrumpiendo su replicación. Este hecho puede incidir en la colonización del patógeno en el organismo, pudiendo estar presente de forma selectiva en ciertos tejidos y no en otros. Lo que dificulta el diagnóstico, contribuyendo a la aparición de falsos negativos. Esta afirmación también es respaldada por el estudio de Blomqvist et al., (2012) el cual demostró la baja prevalencia del patógeno en 497 aves acuáticas de Suecia resultando 6 aves positivas, planteando la forma intermitente en que se disemina la bacteria y cómo afectaría en el diagnóstico.

Un estudio realizado por Ruiz (2020) describe una comparativa entre tasas de aislamiento de *Chlamydia psittaci* a partir de hisopados cloacales y muestras fecales de 343 muestras de aves psitácidas que fueron sometidas a una PCR convencional arroja como resultado una probabilidad de detección 8,15 veces mayor para los hisopos cloacales en comparación con hisopos fecales, mencionando que la detección por hisopos cloacales

está más indicada, pero que independiente de la muestra es preciso recolectar varias muestras por ave en diferentes días para aumentar la posibilidad de detección debido a la excreción fecal intermitente de *C. psittaci*, técnicas de seguimiento que puede ser indicado para futuros estudios experimentales para el diagnóstico de *Chlamydia psittaci*.

Los primers utilizados (VD1-F 5'-ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGT-3'; VD2-R 5'-CGTGCACCYACGCTCCAAGA-3') y (Cp-F 5'-TGC AAG ACA CTC CTC AAA G-3'; Cp-R 5'-AGG TTC TGA TAG CGG GAC-3') se obtuvieron a partir de estudios previos realizados por Andersen y Vanrompay (2000) y Vilela et al., (2019) respectivamente, arrojando una confiabilidad e indicando que ambas son adecuadas para la detección de *Chlamydia psittaci*.

Teniendo en consideración que para este trabajo, tanto el control positivo, como la muestra N° 13 dio positiva para ambos fragmentos del gen ompA, se sugiere que el protocolo utilizado de PCR a partir de los partidores de los estudios mencionados anteriormente, fue adecuado para la detección del patógeno.

La prevalencia de la bacteria puede estar relacionada con la cohabitación con huéspedes que pueden ser fuentes de infección, así como lo plantea De Lima et al., (2011) con respecto a las palomas, son individuos con un potencial para portar y transmitir el agente a animales susceptibles y a humanos.

Aquel resultado sugiere que posiblemente estemos presenciando traspaso de la bacteria desde animales domésticos a silvestres, sirviendo estos como reservorios. En Chile, sin embargo, González y Llanos (2020) desarrollaron una revisión sistemática de patógenos bacterianos y virales en aves silvestres de Chile, mencionando que no existen estudios dirigidos a aves silvestres en nuestro país. Solo se reporta un estudio en Chillán de González et al., (2007) documentando la exposición a este patógeno en 11% de palomas capturadas en entornos urbanos, diagnosticadas por la técnica ELISA.

7. CONCLUSIONES

Según el resultado positivo obtenido de PCR y la relación con la pregunta planteada en el trabajo nos indicaría baja prevalencia de *Chlamydia psittaci* en animales silvestres, no obstante, se logra de manera satisfactoria realizar el procedimiento correspondiente para el diagnóstico de la bacteria *Chlamydia psittaci*, detectando así una muestra positiva para la especie *L. bougainvillii* lo cual resalta los riesgos potenciales de susceptibilidad al patógeno con relación a la especie, ya que es una especie con una alta cantidad de individuos entre Chile y Perú, con una población estimada de 3,7 millones de individuos, las cuales migran en épocas reproductivas recorriendo gran parte de las costas de nuestro país.

Por lo que se plantea realizar más estudios epidemiológicos sobre el patógeno mencionado para determinar la relevancia debido a su potencial reservorio en aves silvestres, los cuales pueden pasar desapercibidas ya que pueden o no presentar signos clínicos y a la vez pueden excretar de forma intermitente la bacteria *Chlamydia psittaci* presentando una amenaza para la salud humana debido a su potencial zoonótico y producción animal en Chile debido a su forma de contagio lo cual puede potenciar la forma en la que es diseminado el patógeno.

Con respecto a la salud pública, no está demás mencionar el riesgo zoonótico en las que están expuestas las personas susceptibles, desde trabajadores en mataderos, criaderos, médicos veterinarios, en zoológicos, incluso público en general que interactúen con aves ya sea como mascotas o en hábitats donde estén presentes los individuos. Enfatizando de manera que se adopten medidas de preventivas frente a aves sospechosas, hacinadas, sometidas a estrés y así no subestimar los riesgos posibles.

8. REFERENCIAS

- Andersen, A. y Franson, J. (2007). Avian *chlamydiosis*: Infectious disease of wild birds. En Thomas, N., Hunter, B. y Atkinson, C. (Eds). (pp 303-316). *Blackwell Publishing Professionals*, Wiley. Ames, Iowa <https://doi.org/10.1002/9780470344668.ch15>
- Andersen, A. y Varompay, D. (2000). Avian chlamydiosis. OIE *Revue scientifique et technique*. 19. 396-404.
- Andersen, A. y Varompay, D. (2003). Avian *chlamydiosis* (psittacosis, ornitosis). En Saif, Y. (Ed.), Diseases of poultry. (11 ed, pp 719-721). *Iowa State Press*.
- Andersen, A. y Varompay, D. (2008). *Chlamydiosis*, A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens. En Dufour-Zavala, L., Swayne, D., Glisson, J., Pearson, J., Reed, W. y Jackwood, M. (Eds). (5 ed, pp 65-74). *American Association of Avian Pathologist*, Athens, Ga, USA.
- Báez, F. (2019). Zoonosis: Un problema de salud pública. *Medicina clínica y social*, 3(3), 104-105. <https://doi.org/10.52379/mcs.v3i3.112>
- Belchior, E., Barataud, D., Ollivier, R., Capek, I., Laroucau, K., De Barbeyrac, B. y Hubert, B. (2011). Psittacosis outbreak after participation in a bird fair. *Western France. Epidemiology and Infection*. 139 (10), 1637-1641. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000409>
- Blomqvist, M., Christerson, L., Waldenström, J., Herrmann, B. y Olsen, B. (2012). *Chlamydia psittaci* in Swedish Wetland Birds: A Risk to Zoonotic Infection? *Avian Diseases, BioOne digital library*, 56(4). 737–740. <http://doi.org/10.1637/10105-022812-resnote.1>
- Borel, N., Polkinghorne, A., y Pospischil, A. (2018). A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge of Pathologists?. *Veterinary pathology*, 55(3), 374-390. <https://doi.org/10.1177/0300985817751218>

- Boseret, G., Losson, B., Mainil, J., Thiry, E., y Saegerman, C. (2013). *Zoonoses in pet birds: review and perspectives. Veterinary Research*, 44(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-36>
- Contreras, A., Gomez-Martin, A., Paterna, A., Tatay-Dualde, J., Prats-Van Der Ham, M., Corrales, J., De la Fe, C. y Sánchez, A. (2016). Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 35, 845-862. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2574>
- Craft, M. (2015). Infectious disease transmission and contact networks in wildlife and livestock. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1669), 20140107. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0107>
- De Lima, V., Langoni, H., da Silva, A., Pezerico, S., de Castro, A., da Silva, R. y Araújo, J. (2011). *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil *Veterinary Parasitology*.175 (1–2), 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.006>
- De la Maza, M. y Bonacic, C. (2013). Manual para el monitoreo de fauna silvestre en Chile. En M. de la Maza y C. Bonacic (Eds.), Serie Fauna Australis, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. pp 202. <https://agronomia.uc.cl/159-manual-para-el-monitoreo-de-fauna-silvestre-en-chile/file>
- Doody, J., Reid, J., Bilali, K., Diaz, J. y Mattheus, N. (2021). “In the post-covid-19 era, is the illegal wildlife trade the most serious form of trafficking?”. *Crime Science* 10: 19. <https://doi.org/10.1186/s40163-021-00154-9>
- Ellwanger, J., Kulmann-Leal, B., Kaminski, V., Valverde-Villegas, J., Veiga, A., Spilki, F. y Chies, J. (2020). Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020191375>
- Frutos, M. (2015). Eco-epidemiología de *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*: Impacto en la Salud Pública. [Tesis-Doctorado en Ciencias

- de la Salud, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio Institucional.
http://lildbi.fcm.unc.edu.ar/lildbi/tesis/frutos_maria_celia.pdf
- Gedye, K., Fremaux, M., Garcia-Ramirez, J. y Gartrell, B. (2018). A preliminary survey of *Chlamydia psittaci* genotypes from native and introduced birds in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 66 (3), 162-165.
<https://doi.org/10.1080/00480169.2018.1439779>
- González, D., Y Llanos, S. (2020). Una revisión sistemática de los patógenos virales y bacterianos de aves silvestres en Chile. *Revista chilena de infectología*, 37(4), 422-442. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000400422>
- González, D., Silva, F., Moreno, L., Cerda, F., Donoso, S., Cabello, J. y López, J. (2007). Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Revista chilena de infectología*, 24(3), 199-203. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182007000300004>
- Hogerwerf, L., Gier, B., Baan, B. y Hoek, W. (2017). *Chlamydia psittaci* (psitacosis) as a cause of community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and infection*, 145(15), 3096-3105.
<https://doi.org/10.1017/S0950268817002060>
- Kaleta, E. y Taday, E. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, 32(5), 435-462.
<https://doi.org/10.1080/03079450310001593613>
- Khan, J., Provenche, J., Forbe, M., Mallory M., Lebarbenchon C. y McCoy, K. (2019). Parasites of seabirds: A survey of effects and ecological implications. *Advances in marine biology*, 82, 1-50. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2019.02.001>
- Knittler, M. y Sachse, K. (2015). *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent. *Pathogens and Disease*, 73 (1), 1-15.
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftu007>

- Kock, R. y Caceres-Escobar, H. (2022). Situation analysis on the roles and risks of wildlife in the emergence of human infectious diseases. Gland, Switzerland: IUCN. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2022.01.en>
- Larraechea, M., Hidalgo, H., Ramírez-Tolosa, G., Sandoval-Rodríguez, A., Ibáñez, D. y Briceño, C. (2023). Seropositividad a *Chlamydia psittaci* en cotorras argentinas (*Myiopsitta monachus*) invasoras de la ciudad de Santiago de Chile. *Revista chilena de infectología*, 40(1), 35-41. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182023000100035>
- Linzitto, O., Stanchi, N., Tunes, M., Bautista, E., Berstein, J., Basualdo, J., Fermepín, M. y Gomez, M. (2016). *Chlamydia* y *Chlamydophila*: Métodos diagnósticos en el laboratorio. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/141179>
- Nieuwenhuizen, A., Dijkstra, F., Notermans, D., y van der Hoek, W. (2018). Laboratory methods for case finding in human psittacosis outbreaks: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 18, 442. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3317-0>
- OIE. (2012). Capítulo 2.3.1. Acceso en 26/11/2023.
- OIE. (2018). Sección 3.3 Aves. Capítulo 3.3.1 Clamidiosis Aviar. Manual Terrestre. Consultado el 23 Noviembre de 2023. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.03.01_Clami_diosis_aviar.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], (2012). <https://www.woah.org/>
- Ossa-Giraldo, A., Úsuga-Perilla, X., Correa, J. y Segura, J. (2023). Seropositividad de *Chlamydia psittaci* en trabajadores expuestos a aves y revisión de la literatura: evidencia de circulación en Antioquia. *Biomédica*, 43 (3), 330-343. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6832>
- Panzetta, M., Valdivia, R. y Saka, H., (2018). *Chlamydia* persistence: a survival strategy to evade antimicrobial effects in-vitro and in-vivo. *Frontiers in Microbiology*. 9, 3101. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03101>

- Presidente de la República. (2019). Decreto afecto N°7 del 12 de marzo de 2019. Por el cual *Aprueba el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia*. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1141549>
- Ruiz, M. (2020). Prevalencia de *Chlamydia psittaci* en aves psitácidas en el centro de recepción de fauna temporal de convenio de asociación N° 131 IDPYBA-U.D.C.A. [Trabajo de grado, Universidad de ciencias aplicadas y ambientales U.D.C.A]. Repositorio institucional. <https://repository.udca.edu.co/server/api/core/bitstreams/08a5079f-c1e7-4c37-aaa9-e602a7ba2ee1/content>
- Ruiz-Laiton, A., Molano-Ayala, N., García-Castiblanco, S., Puentes-Orozco, A., Falla, A., Camargo, M., Roa, L., Rodríguez-López, A., Patarroyo, M. y Avendaño, C. (2022). The prevalence of *Chlamydia psittaci* in confiscated Psittacidae in Colombia. Preventive Veterinary Medicine, 200. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105591>
- Rosario, I., Acosta, B. y Colom, F. (2008). La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), S13–S18. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70020-2](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70020-2)
- Sachse, K., Bavoil, P., Kaltenboeck, B., Stephens, R., Kuo, C., Rosselló-Mora, R. y Horn, M. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 (2), 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.004>
- Sachse, K., Laroucau, K. y Vanrompay, D. (2015). Avian Chlamydiosis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 10-21. <https://doi.org/10.1007/s40588-014-0010-y>
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A. y Longbottom, D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, 135, 2-21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>.
- Solórzano, A. (2021). *Diagnóstico, caracterización molecular y aislamiento de especies de Chlamydia en animales domésticos y silvestres de Costa Rica*. [Tesis sometida

a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al grado de Magister Scientiae, Universidad Nacional]. Repositorio Institucional. <http://hdl.handle.net/11056/22001>

Stewardson, A y Lindsay, M. (2010). Psitacosis. Infectious disease clinics of North America. 24 (1), 7-25. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.003>

Szymańska-Czerwińska, M., Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Jodełko, A., Pluta, A., Scharf, S., Vitek, B., Aaziz, R., Vorimore, F., Laroucau, K. y Schnee, C. (2017). Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: Isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains. *Plos One*, 12 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174599>

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

Vilela, D., Marin, S., Resende, M., Coelho, H., Resende, J., Ferreria-Junior, F., Ortiz, M., Araujo, A., Raso, T. y Martins, N. (2019). Phylogenetic analyses of *Chlamydia psittaci* ompA gene sequences from captive blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) with hepatic disease in Brazil. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38(3), 711-719. <https://doi.org/10.20506/rst.38.3.3020>

9. ANEXOS