



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Amebas de Vida Libre, con énfasis en *Acanthamoeba* y *Naegleria*, y bacterias del orden *Chlamydiales* como agentes infecciosos en rumiantes mayores

Lic. en Cs. Biológicas María del Carmen Rojas

Directores: Dr. Sixto Raúl Costamagna

Dr. Marcelo Rodríguez Fermepin

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, en la EEA INTA Anguil, durante el período comprendido entre junio de 2013 y agosto de 2018, bajo la dirección de los Doctores Sixto Raúl Costamagna de la Universidad Nacional del Sur y Marcelo Rodríguez Fermepín, de la Universidad de Buenos Aires.

Bahía Blanca, mayo de 2019.

Lic. en Cs. Biológicas Maria del Carmen Rojas



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el día / día / día, mereciendo la calificación de ()

RESUMEN

Se estudió la presencia de Amebas de Vida Libre (AVL) (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.), y bacterias del orden *Chlamydiales* como agentes infecciosos en bovinos de la provincia de La Pampa, Argentina.

Se obtuvo desarrollo de AVL en el 83,07 % de las muestras de agua destinada a consumo bovino (N=65). Se identificó por cultivo y técnicas moleculares la presencia de *Acanthamoeba* spp. en el 24,07 %. Se identificaron los genotipos T4, T5 y T15 del género *Acanthamoeba*. No se encontró asociación entre queratitis con la presencia de AVL. No se detectaron AVL del género *Naegleria*.

Se estudiaron 709 muestras bovinas, para detectar la presencia de bacterias del orden *Chlamydiales*, y 656 sueros bovinos para estimar la prevalencia de infección por estas bacterias.

Se detectó ADN de familia *Chlamydiaceae* en el 4,78 % de las muestras de órganos parafinados provenientes de pérdidas reproductivas y de *Chlamydia abortus* en el 1,99 % (N=251).

Se determinó una prevalencia de anticuerpos séricos contra *Chlamydia abortus* del 25,00 % sobre 128 lotes bovinos, con una seroprevalencia individual (N=656) del 8,07 %. No se encontraron diferencias significativas entre categoría.

Se detectó un 6 % de ADN del orden *Chlamydiales* y 2 % de la familia *Chlamydiaceae* sobre 50 muestras oculares de terneros estudiadas. Se identificó por secuenciación la presencia de *Uncultured Chlamydiales*.

Se detectó ADN del orden *Chlamydiales* en el 30,76 % de las 104 muestras de cérvix estudiadas y el 3,84 % correspondió a la familia *Chlamydiaceae*. No se encontraron diferencias significativas entre las prevalencias de hembras con y sin problemas reproductivos a nivel de orden, pero sí a nivel de familia.

Se detectó en un 8% (1 muestra) de lavado de útero de vacas donadoras de embriones, ADN a nivel de orden *Chlamydiales* y de familia *Chlamydiaceae* sobre 12 muestras estudiadas.

Se detectó ADN del orden *Chlamydiales* en el 30,00 % de las muestras de semen de toros de cabañas estudiadas y de familia *Chlamydiaceae* en el 6,00 % (N=50).

Se detectó ADN del orden *Chlamydiales* en el 23,33% de las muestras de esmegma prepucial de toros provenientes de cabañas y servicio natural estudiadas (N=150). La familia *Chlamydiaceae* fue identificada en el 4,66% de ellas. Se encontraron diferencias significativas entre toros en servicio natural y de cabaña solo a nivel de orden.

Se detectó ADN del orden *Chlamydiales* en el 4,76% de muestras de órganos formolados de fetos abortados y ADN de la familia *Chlamydiaceae* en el 2,38% de ellas (N=42). Se detectó en 50 muestras de órganos de fetos no abortados ADN del orden *Chlamydiales* en el 20,00 % y 10,00 % de la familia *Chlamydiaceae*.

Se identificó por secuenciación la presencia de una clamidia ambiental (*Neochlamydia* spp.) en un cultivo de *Acanthamoeba* spp. (genotipo T5), probablemente como endosimbionte.

Los resultados obtenidos indican la necesidad de profundizar el estudio de las AVL y las clamidias en ambientes ganaderos como agentes infecciosos con potenciales características zoonóticas.

Palabras claves: Amebas de Vida Libre, *Chlamydiales*, bovinos, La Pampa.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the presence of free-living amoebae (FLA) (*Acanthamoeba* spp. and *Naegleria* spp.) and bacteria of the order *Chlamydiales* as infectious agents in cattle in the province of La Pampa, Argentina.

FLA was isolated from 83.07% of the watering trough samples. The identification by Polymerase chain reaction was performed with genus-specific primers and followed by direct sequencing. The sequencing revealed the presence of genotypes T4, T5, and T15 of the genus *Acanthamoeba* in the samples studied. No association was found between keratitis and the presence of FLA. No FLA of the genus *Naegleria* was detected.

A total of 709 bovine samples collected from paraffined organs of reproductive loss, eye, cervix, washing of uterus from cow donating embryos, semen, preputial smegma, formalin-fixed organs from aborted fetuses and organs from unborn were studied to detect the presence of bacteria of the order *Chlamydiales*. To assess the prevalence of infection by these bacteria serum samples from 656 cattle were analyzed for the presence of specific IgG antibodies.

DNA of the family *Chlamydiaceae* was detected in 4.78 % of sample paraffin organs proceeding of reproductive loss and *Chlamydia abortus* in 1.99 % (N=251).

Antibodies to *Chlamydia abortus* were found in 8.07% sera based on ELISA result (N= 656). The overall herd prevalence of anti-*Chlamydia abortus* antibodies in 128 bovine lots was 25.00%. No significant differences were found between categories.

Six percent of DNA bacteria of the order *Chlamydiales* and 2 % of the family *Chlamydiaceae* were detected on 50 eye samples of calves studied. The presence of *Uncultured Chlamydiales* was identified by sequencing.

DNA of the order *Chlamydiales* and the family *Chlamydiaceae* was detected in 30.76% and 3.84 % of the cervix samples studied (N=104). No significant differences were detected between the prevalence of females with and without reproductive problems at the order level, but yes at the family level.

One of 12 samples (8.00%) of washing of uterus of cow donating embryos, DNA was detected at order and family level.

DNA of the order *Chlamydiales* and the family *Chlamydiaceae* was detected in 30.00% and in 6.00% of the semen samples studied (N=50).

The order *Chlamydiales* DNA was detected in 23.33% of the preputial smegma sample of bulls from breeders and natural service studied (N=150). DNA of the family *Chlamydiaceae* was identified in 4.66% of them. Significant differences were found between bulls in natural service and breeders only at the order level.

DNA of the order *Chlamydiales* and the family *Chlamydiaceae* was detected in 4.76 % and 2.38 % of formalin-fixed organ samples of aborted fetuses (N=42). In unborn organ samples, DNA of the order *Chlamydiales* was detected in 20.00 %. The family *Chlamydiaceae* DNA was detected in 10% (N=50).

The presence of *Chlamydia*-like organism in an *Acanthamoeba* spp. (genotype T5) was identified by sequencing, probably as an endosymbiont.

The results obtained indicate the need to carry out more studies of FLA and chlamydia in cattle ranch environments as infectious agents with potential zoonotic characteristics.

Keywords: Free-Living Amoebae, order *Chlamydiales*, cattle, La Pampa.

Dedicatoria

A Pablo por acompañarme en este viaje

A mis hijas, por cargarme de energía

Ha todape che avakuéra

(õ..Y a toda mi genteõ)

Agradecimientos

- A los Doctores Sixto Raúl Costamagna y Marcelo Rodríguez Fermepin por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis brindándome cada uno: su experiencia, su tiempo y paciencia.
- A la Dra. Viviana Randazzo y a la Bioq. Norma Basabe por su ayuda con las AVL.
- A las Dras. Carolina Entrocassi y Lucia Gallo Vaulet por introducirme en el mundo de las clamidias.
- Al INTA por brindarme el apoyo institucional y el espacio para llevar a cabo mi trabajo.
- A todos los integrantes del grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Anguil por la colaboración en los muestreos a campo y de laboratorio.
- Al Dr. Konrad Sachse del Instituto Friedrich-Loeffler.
- Al Med. Vet. Manuel Maradona y al personal del frigorífico Carnes Pampeanas (CRESUD) por facilitarme el muestreo.
- Al Med. Vet. Orlando Hepsommer y al SENASA (centro regional La Pampa- San Luis) por el trabajo mancomunado en el tema de clamidias.
- Lic. Florencia Gracia Martínez y a la Dra. Andrea Puebla del CICVyA (Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas) y todo su grupo.
- A Hugo Giménez y a los Med. Vet. Marcelo Fort, Hernán Romero Harry, Luis Rhades, Arturo y Javier de La Mata, Oscar Castagnino, Lucas Gelid y Luis Pérez.
- A mis compañeras de oficina, colegas y amigas, Lumy y Vale, por las horas de trabajo, complicidad, risas, para hacer más llevaderos los momentos complicados.
- A mis viejos Elsa y José, a Javier por haber sido mi primer maestro y a Daniel por cuidarme.
- A Daria por su *ñoNO, peroí ñ*
- A Pablo por ser mi mayor Crítico, Amelia y a Rosario por acompañarme
- A Dios
- Y a todos aquellos que de alguna u otra manera han estado presentes en todo este tiempo.....¡Gracias!

ABREVIATURAS

2-SP	Buffer Sacarosa/fosfato (Sucrose-Phosphate).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico.
AEO	Aborto Enzoótico Ovino.
ANN	Agar No Nutritivo.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
AVL	Amebas de Vida Libre.
°C	Grado Celsius o Grado Centígrado.
CA	Cuerpo Aberrante.
CE	Cuerpo Elemental.
CICVyA	Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
cm	Centímetro.
cm³	Centímetro cúbico.
CR	Cuerpo Reticulado.
Ct	Ciclo umbral (Cycle threshold).
DC	Dominios Conservado.
IFD	Inmunofluorescencia Directa (Direct Fluorescent Antibody).
DNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
DO	Densidad Óptica.
DV	Dominios Variable.
EAG	Encefalitis Amebiana Granulomatosa.
EDTA	Etilen Diamin Tetra Acético.
EEA-INTA	Estación Experimental Agropecuaria- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
FC	Fijación de Complemento.
g	Fuerza centrífuga relativa
ha	Hectárea.

IC	Intervalo de Confianza.
IDvet	Innovative diagnostic kits.
IETS	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. (International Embryo Technology Society).
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
kDa	Kilodalton.
km²	Kilómetro cuadrado.
Lat.	Latitud.
LGV	Linfogranuloma Venéreo.
Long.	Longitud.
LPS	Lipopolisacárido.
M	Molar.
MAP	Meningoencefalitis Amebiana Primaria.
mg	Miligramo.
ml	Mililitros.
mm	Milímetros.
mMol	Miliosmol.
MOMP	Proteína principal de la membrana externa (Major Outer Membrane Protein).
ng	Nanogramos.
nm	Nanómetros.
pb	Pares de Bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
pH	Potencial de hidrógeno.
pmol	Picomol.
PRC	Proteínas Ricas en Cisteína.
QA	Queratoconjuntivitis Acanthamoebiana.
QIB	Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina.
qPCR	PCR cuantitativa en Tiempo Real (quantitative Polymerase Chain Reaction).

SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
TAF	Transformacion Amebo Flagelar.
UNSET	Urea-NaCl-SDS-EDTA-Tris hydrochloride.
Utaq	Unidades de enzima Taq.
UV	Radiación Ultravioleta (Ultraviolet radiation).
l	Microlitros.
m	Micras.
M	Micromolar.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION	1
Generalidades de las Amebas de Vida Libre.	1
Taxonomía de las Amebas de Vida Libre patógenas.	2
Género <i>Balamuthia</i>	3
Género <i>Sappinia</i>	4
Género <i>Naegleria</i>	5
Género <i>Acanthamoeba</i>	6
Identificación de las Amebas Vida Libres.	9
Antecedentes en República Argentina.	9
Generalidades del orden <i>Chlamydiales</i>	10
Taxonomía de orden <i>Chlamydiales</i>	13
Identificación de clamidias.	15
Antecedentes en la República Argentina.	20
HIPOTESIS.....	22
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
MATERIALES Y METODOS.....	24
Descripción del área de estudio.....	24
Detección de Amebas de Vida Libre, con especial en énfasis <i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>Naegleria</i> spp.	26
Muestra de agua de bebida.	26
Muestras oculares.	27
Cultivo de Amebas de Vida Libre (<i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>Naegleria</i> spp.).....	28
Extracción de ADN de cultivos de Amebas de Vida Libre (<i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>Naegleria</i> spp.).....	29
Muestras de órganos de fetos abortados formolados.	29
Extracción de ADN por <i>Salting - Out</i> de órganos de fetos abortados formolados..	30
Detección de géneros de Amebas de Vida Libre (<i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>Naegleria</i> spp.).....	31
Detección de especies del orden <i>Chlamydiales</i>	34
Muestras de órganos parafinados provenientes de pérdidas reproductivas.	34
Muestras oculares.	39
Muestras de ADN de Amebas de Vida Libre para el estudio de endosimbiontes...	39

Muestras de cérvix.....	40
Muestras de hembras donadoras de embriones.	42
Muestras de esmegma prepucial de toros.....	42
Muestras de semen de toros.....	43
Muestra de órganos de fetos no abortados de frigoríficos.	44
Muestra de órganos de fetos abortados formolados.....	44
Extracción de ADN de las muestras de cérvix, lavado, esmegma, semen y órganos de fetos no abortados.	44
Extracción de ADN por <i>Salting - Out</i> de órganos de fetos abortados formolados..	45
Detección del orden <i>Chlamydiales</i>	45
Detección de familia <i>Chlamydiaceae</i> por PCR.....	47
Secuenciación de muestras.....	48
Cuantificación del ADN.....	51
Análisis estadísticos generales.	51
Bienestar animal.	52
Soluciones y reactivos utilizados.....	52
Solución de Pageí ..	52
Solución fisiológica estérilí	53
Medio de transporte y almacenamiento para <i>Chlamydiaí í í í í í í í í</i> .	53
<i>Buffer</i> de lisis UNSET (Para 100 ml de solución)í í í í í í í í í í ..	54
<i>Buffer</i> de lisis para la muestra ocularí í í í í í í í í í í í í í í í í ..	54
Solución (pH 8) proteínasa <i>K Salting óOutí í í í í í í í í í í í í</i> ..	54
Solución de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1)í í í í í í í í í ..	55
3M NACLí ..	55
EDTA 0,5Mí ..	55
<i>Buffer</i> Tris (10X) solución madreí í í í í í í í í í í í í í í í í ..	55
<i>Buffer</i> TBE de trabajo (corrida) 1X. í í í í í í í í í í í í í í í í ..	55
RESULTADOS Y DISCUSION	56
Presencia de Amebas de Vida Libre en agua destinada a consumo ganadero.....	56
Discusión.....	62
Presencia del orden <i>Chlamydiales</i> en pérdidas reproductivas en el ganado bovino: estudio retrospectivo.....	64

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Publicaciones registradas en PubMed desde 1947 hasta 2019 relativas a AVL patógenas. Datos obtenidos de www.pubmed.org (22/04/2019)í í í í í í ..í í í 1
- Figura 2:** Estadios de *Balamuthia mandrillaris*. A) Trofozoito, B) Quiste. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>)í í í í í í í í í í í í í í í í ...4
- Figura 3:** Estadios de *Sappinia* spp. A) Trofozoíto binucleado, B) Quiste binucleado. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC. (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>)í í í í í í í í í í í í í í í í ...5
- Figura 4:** Estadios de *Naegleria fowleri*. A) Trofozoíto flagelado, B) Quiste. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>)í í í í í í í í í í í í í í í í ...6
- Figura 5:** Estadios de *Acanthamoeba* spp. A) Trofozoíto, B) Quistes. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>)í í í .7
- Figura 6:** Publicaciones registradas en PubMed desde 1945 hasta 2019 referidas a *Chlamydiaceae* y otras familias. Datos obtenidos de www.pubmed.org (22/04/2019)í .10
- Figura 7:** Estadios de *Chlamydia* spp., A) Cuerpo Reticular, B) Cuerpo Elemental (Reed y col., 2000)í .11
- Figura 8:** Esquema del ciclo de vida de clamidiasí í í í í í í í í í í í í í í í ..12
- Figura 9:** Estructura básica de la familia *Chlamydiaceae*í í í í í í í í í í í ...12
- Figura 10:** Países afectados por el aborto enzoótico ovino (AEO)í í í í í í í í í 18
- Figura 11:** Ecorregiones y precipitación media anual de la provincia de La Pampa, período 1980-2010, basada en el modelo propuesto por Rudolf y Schneider (Vázquez y col., 2013)í 24
- Figura 12:** Aguadas artificiales y naturales destinadas para consumo ganaderoí í í ..26
- Figura 13:** Muestras de agua para cultivo en Agar No Nutritivo (ANN)í í í í í í .27
- Figura 14:** Bovino con queratoconjuntivitisí í í í í í í í í í í í í í í í 27
- Figura 15:** Órganos de fetos abortados formoladosí í í í í í í í í í í í í í í í 30
- Figura 16:** Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % de los productos de amplificación específico para *Acanthamoeba* spp. Calles: M) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo 2) Control negativo, 3) Control positivo 1/1000, 4) Control positivo 1/100, 5) Control positivo 1/10í í í í í í í í í í í í í í í í ..32

- Figura 17:** Diagrama de flujo de las muestras para el estudio de las AVL (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.) .33
- Figura 18:** Muestra de hígado parafinado .34
- Figura 19:** Placas de ELISA. A) reacción sin solución de stop. B) reacción con solución de stop. Control positivo (C+) y control negativo (C-) .39
- Figura 20:** Esquema del lugar de muestreo a nivel de cérvix .40
- Figura 21:** Muestreo de cérvix .41
- Figura 22:** Procesamiento de las muestras de cérvix por sonicado; A) muestra de cérvix con moco, B) sonicado, C) muestra acondicionada para extracción de ADN .41
- Figura 23:** Obtención de muestras prepuciales con raspador metálico .42
- Figura 24:** Obtención muestras de semen. A) Introducción rectal del electroeyaculador, B) Fluido seminal descartado .43
- Figura 25:** Determinación de edad gestacional. A) Distancia corona ó base de la cola, B) Feto de frigorífico .44
- Figura 26:** Electroforesis en gel de agarosa 2 % de los productos de amplificación específico para orden *Chlamydiales*. Calles: M) Marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo. 2) Control negativo. 3) Control positivo 1/1000. 4) Control positivo 1/10000 .46
- Figura 27:** Electroforesis en gel de agarosa 2 % de los productos de amplificación específico para familia *Chlamydiaceae*. Calles: M) Marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo *Chlamydia trachomatis* (Linfogranuloma venéreo, LGV). 2) Control positivo 1/1000, 3) Control positivo 1/10000. .48
- Figura 28:** Diagrama de flujo de las muestras para el estudio del orden *Chlamydiales* .50
- Figura 29:** Localización de aguadas muestreadas para identificar presencia de AVL (N=65) .57
- Figura 30:** Identificación de *Acanthamoeba* spp. por PCR, cebadores JDP1/JDP2. M) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461). 2, 3, 4 y 5) Muestras positivas de agua para consumo ganadero. 6) Control negativo .58
- Figura 31:** Forma flagelada hallada en un cultivo de ANN después de realizar la Transformación Ameboflagelar. Las flechas indican el flagelo y las vacuolas .58
- Figura 32:** Cantidad de muestras estudiada según los meses de gestación .61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación filogenética de los géneros patógenos de AVL (Adl y col., 2013)...	3
Tabla 2: Clasificación del orden <i>Chlamydiales</i> basado en secuencias del gene 16S ARNr y sus hospedadores conocidos (H: humanos, G: ganado, M: otros mamíferos, A: aves, R: reptiles-anfibios-peces, P: protozoos) (adaptado de Taylor-Brown y col., 2015)í í í	.14
Tabla 3: Determinación de seroprevalencia a <i>Chlamydia</i> spp. en ganado bovino de diferentes países a partir de ELISA, Hemaglutinación Indirecta (HI) y Fijación de Complemento (FC)í í	..16
Tabla 4: Manifestaciones clínicas del orden <i>Chlamydiales</i> en diferentes hospedadores domésticosí í	...17
Tabla 5: Prevalencia de hembras con problemas reproductivos (PR) y sin problemas reproductivos (SPR) a clamidias, estimada a partir de técnicas molecularesí í í í	19
Tabla 6: Detección de clamidias por PCR en abortos bovinos a nivel mundialí í í	..19
Tabla 7: Referencias de clamidias en rumiantes para Argentinaí í í í í í í í	.20
Tabla 8: Cebadores utilizados en PCR para la identificación de génerosí í í í	...32
Tabla 9: Cebadores utilizados para familia <i>Chlamydiaceae</i> dirigidos al gen 23S ARNr.	37
Tabla 10: Cebadores biotinilados para la técnica de microarrayí í í í í í í í	.37
Tabla 11: Cebadores utilizados para la detección específica del orden <i>Chlamydiales</i> í	.46
Tabla 12: Cebadores utilizados en PCR para la identificación de familia <i>Chlamydiaceae</i> í47
Tabla 13: Proporción de morfologías de trofozoitos halladas en AVL aisladas de agua para consumo ganaderoí í	56
Tabla 14: Proporción de morfologías de quistes halladas en AVL aisladas de agua para consumo ganaderoí í	...57
Tabla 15: Ubicación espacial de sitios muestreados e determinación de presencia (+) o ausencia (-) de AVL por medio de cultivo en placa con agar no nutritivo (ANN), transformación amebo flagelar (TAF) y PCR del género <i>Acanthamoeba</i> spp. y <i>Naegleria</i> sppí í	59
Tabla 16: Detección de <i>Chlamydiaceae</i> (qPCR) y <i>C. abortus</i> (microarray) en muestras parafinadas correspondientes a pérdidas bovinas, período 2004 ó 2011í í í í í	..64
Tabla 17: Asociación de muestras positivas a <i>Chlamydiaceae</i> (qPCR) y <i>C. abortus</i> (microarray) de muestras parafinadas con diagnóstico previoí í í í í í í í í	.65

- Tabla 18:** Lotes positivos a *C. abortus* en terneros, vaquillonas/vacas y toros de la provincia de La Pampa, período 2013-2015. 67
- Tabla 19:** Seroprevalencia a *C. abortus* en terneros, vaquillonas/vacas con y sin problemas reproductivos y toros de la provincia de La Pampa, período 2013-2015. 67
- Tabla 20:** Proporción de animales con anticuerpos séricos contra *C. abortus* en lotes positivos de vaquillonas/vacas y terneros. 68
- Tabla 21:** Comparación del valor de seroprevalencia a *C. abortus* hallado en la provincia de La Pampa con los citados por otros países a partir de la técnica ELISA mediante la prueba de diferencias simultáneas. 69
- Tabla 22:** Análisis comparativo entre valores hallados de tasa de lotes infectados (Li), tasa de animales positivos por lote infectado (Ap/Li) y animales infectados esperados ajustado por método indirecto (AiE) en diferentes países y La Pampa. 70
- Tabla 23:** Prevalencia a orden *Chlamydiales* y a familia *Chlamydiaceae* en muestras de cervix de hembras con y sin problemas reproductivos. 72
- Tabla 24:** Prevalencia al orden *Chlamydiales* y a familia *Chlamydiaceae* en muestras de esmegma prepucial de toros en servicio natural y de cabañas. 73
- Tabla 25:** Órganos positivos a orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* por PCR provenientes de fetos abortados formolados. 74
- Tabla 26:** Trimestre de gestación y órganos positivos a orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* por PCR de fetos no abortados provenientes de frigoríficos. 75
- Tabla 27:** Prevalencia a orden *Chlamydiales* y a familia *Chlamydiaceae* en diferente tipo de muestras estudiadas. 77

INTRODUCCION

Generalidades de las Amebas de Vida Libre.

Durante la primera mitad del siglo XX, las Amebas de Vida Libre (AVL) fueron consideradas como protozoos no patógenos habitantes del suelo y del agua. Las AVL son protistas de reproducción por fisión binaria y poseen la capacidad de movilizarse y alimentarse por medio de una corriente citoplasmática o pseudópodos (del griego: *ōfalsos piesö*). Los pseudópodos se extienden desde la superficie celular y son morfológicamente variables (lobopodios y acanthapodios), utilizados antiguamente para su clasificación taxonómica. Este grupo comprende más de 15.000 especies, la mayoría son de vida libre y son consideradas ubicuas en la naturaleza, ya que pueden encontrarse en casi cualquier hábitat (Kingston y Warhurst, 1969; Rodriguez-Zaragoza, 1994; Anderson y col., 2000; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Costamagna y col., 2010; Gertiser y col., 2010).

En los últimos 20 años creció el interés en las AVL por su patogenicidad y su capacidad para transportar otros patógenos (Figura 1).

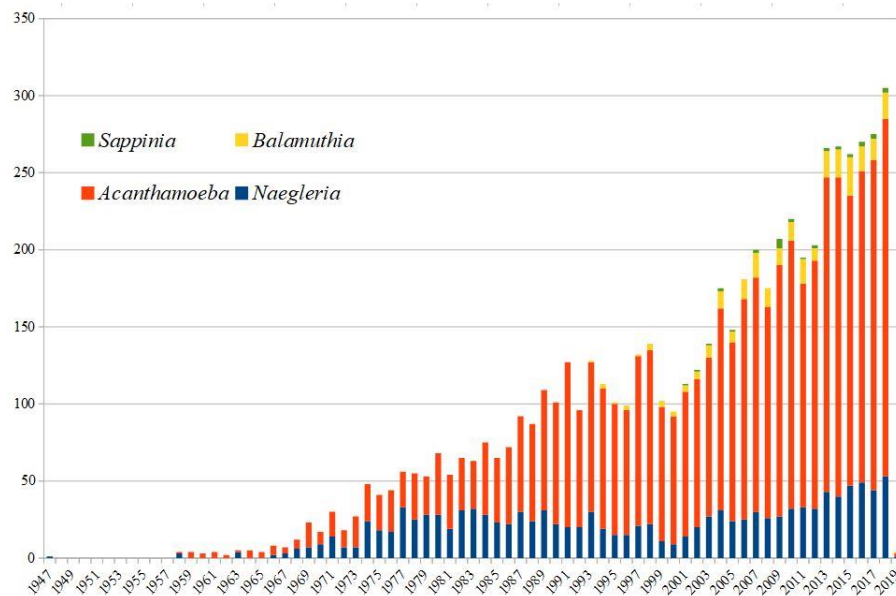


Figura 1: Publicaciones registradas en PubMed desde 1947 hasta 2019 relativas a AVL patógenas. Datos obtenidos de www.pubmed.org (22/04/2019).

Las AVL presentan estadios diferenciados. El trofozoíto es la forma vegetativa y de reproducción. El estadio flagelado (transitorio) se describió para el género *Naegleria*. El prequiste y el quiste son formas de resistencia (Khan, 2015). Estas estructuras presentan dos capas, el exoquiste y el endoquiste. En algunas especies se observa una tercera capa o mesoquiste. Los quistes son resistentes a productos químicos y a procesos de esterilización de agua (De Jonckheere y Voorde, 1976; Sanden y col., 1992; Rohr y col., 1998; Turner y col., 2000; Lloyd y col., 2001; Greub y Raoult, 2003). El enquistamiento responde a situaciones adversas del ambiente (presión osmótica, temperatura y escasez de alimento) y se revierte frente a condiciones favorables (Greub y Raoult, 2004).

La alimentación de las AVL es por fagocitosis, principalmente de bacterias, pero pueden ingerir hongos, algas, protozoos y virus presentes en el entorno (Drozanski y Drozanska, 1961; Avery y col., 1995). No todos los organismos son digeridos, algunos se mantienen y se reproducen en las vacuolas fagocíticas; esto otorga a las AVL una importante capacidad endosimbiótica.

Hacia fines de la década de los 50 se reconoció su patogenicidad (Culbertson y col., 1958; Culbertson y col., 1959). Existen cuatro géneros patógenos de AVL identificados para el hombre y los animales: *Balamuthia* spp., *Sappinia* spp., *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp. (Martínez, 1985; De Jonckheere, 1987; Kilvington y col., 1991; John, 1993; Visvesvara y col., 1993; Centeno y col., 1996; Martínez y Visvesvara, 1997; Khan, 2001; Schuster y Visvesvara, 2004; Lorenzo-Morales, 2010; Trabelsi y col.; 2012; Visvesvara y col.; 2012). La patogenicidad del género *Hartmanella* presenta discrepancias a la fecha (Weekers y col., 1994; De Jonckheere, 1998; Lorenzo-Morales y col., 2007; Abedkhozasteh y col., 2013).

Taxonomía de las Amebas de Vida Libre patógenas.

Las AVL fueron clasificadas en un principio como un grupo heterogéneo de protozoos de acuerdo a su comportamiento, morfología y bioquímica (Winiacka-Krusnell y Linder, 2001, Khan 2015). En el caso particular de *Acanthamoeba* spp., los medios y condiciones de cultivo afectan su morfología, debiéndose reemplazar la clasificación morfológica por una de genotipificación basada en la secuenciación del gen 18S ARNr (Gast y col., 1996).

La clasificación actual, sobre la base de las características filogenéticas (Adl y col., 2013), separó a las AVL patógenas en dos super grupos, Amoebozoa y Excavata (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación filogenética de los géneros patógenos de AVL (Adl y col., 2013).

SUPER GRUPO		Amoebozoa		Excavata
ORDEN	Centramoebida		Thecamoebida	Heterolobosea
GENERO	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Balamuthia</i> spp.	<i>Sappinia</i> spp.	<i>Naegleria</i> spp.

Género *Balamuthia*.

Balamuthia mandrillaris es la única especie dentro del género identificada como patógena. Se aisló por primera vez en 1986 de un mandril de un zoológico de San Diego (Estados Unidos) (Visvesvara y col, 1990). Los trofozoítos son de forma irregular con lamelipodios, (proyecciones citoplasmáticas aplanadas) y ocasionalmente pueden observarse trofozoítos binucleados (Visvesvara y col., 1993; Schuster y col., 2004; Jayasekera y col., 2004; Visvesvara y col., 2007). La microscopía electrónica revela un exoquiste irregular, un endoquiste delgado y un mesoquiste amorfo, sin poros (Visvesvara y col., 1993; Martínez y Visvesvara, 2001) (Figura 2). No está clara la fuente de infección (Cuevas y col., 2006; Siddiqui y col., 2015). *Balamuthia* ha sido aislada de la tierra por lo cual se podrían inhalar quistes adheridos a partículas del suelo o arrastrados por el viento (Schuster y col., 2003; Dunnebacke y col., 2004). Recientemente se aisló de muestras de agua, pero no existen reportes de casos asociados a actividades acuáticas (Baquero y col., 2014; Lares-Jiménez y col., 2014). El primer caso de Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG) en humanos se registró en 1991 (Schuster, 2002; Schuster y col., 2003).

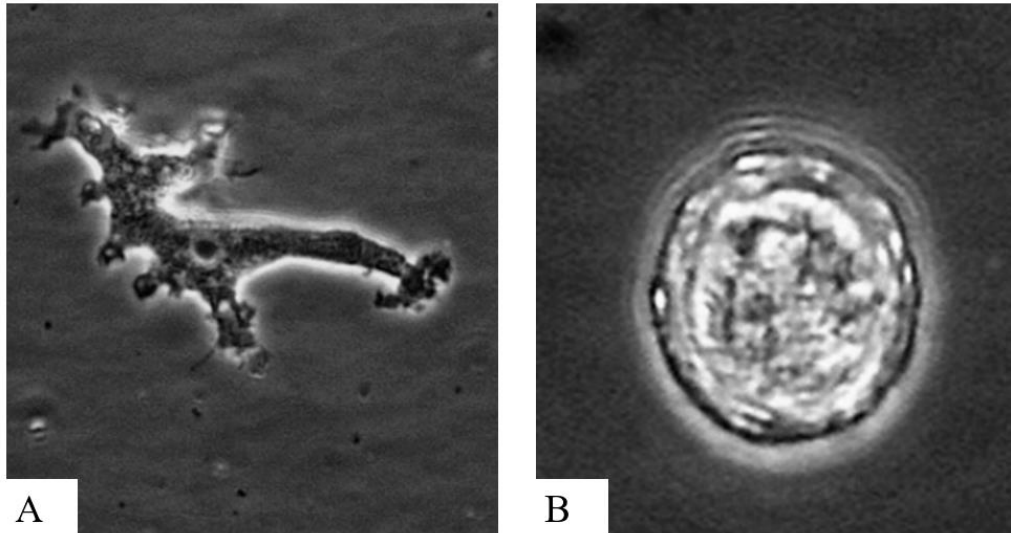


Figura 2: Estadios de *Balamuthia mandrillaris*. A) Trofozoíto, B) Quiste. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>).

Género *Sappinia*.

Los primeros registros del género *Sappinia* datan de principios del siglo XX. Recientemente se descubrió que presenta una alta diversidad genética lo que sugiere más especies de las descritas hasta el momento (Wylezich y col., 2015). El trofozoíto de *Sappinia* spp. presenta un par de núcleos unidos, característica distintiva del género. Se desplaza por medio de un monopodio (proyección de hialoplasma). Los trofozoítos se enquistan agrupados de a pares, formando un quiste binucleado de una sola pared (Figura 3). Las especies pertenecientes a este género se aislaron en muestras ambientales, tierra y heces (Hartmann, 1908; Nägler, 1909; Levine, 1961; Goodfellow y col., 1974; Michel y col., 2006; Brown y col., 2007; Wylezich y col 2009). Su poder patógeno se confirmó en el 2001 (*Sappinia diploidea*: EAG humana) (Gelman y col., 2001; Gelman y col., 2003; Walochnik y col., 2010).

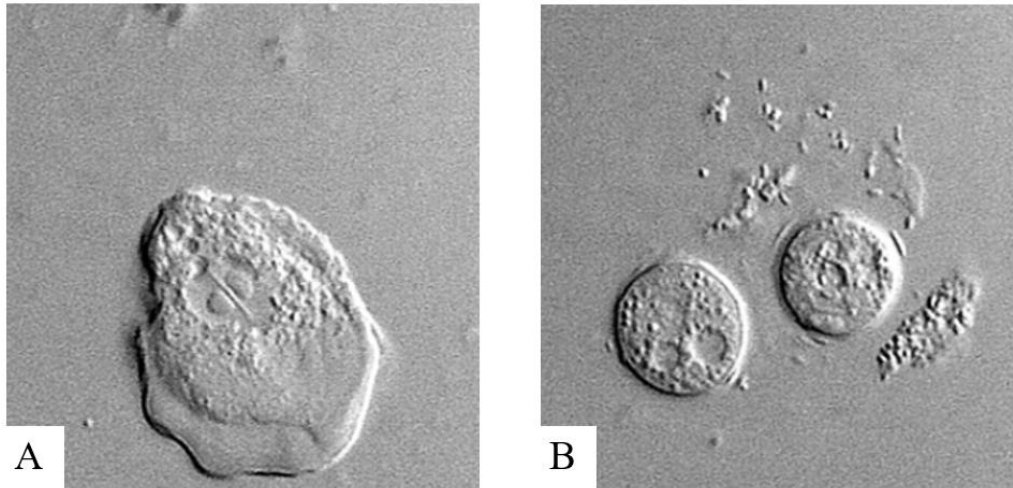


Figura 3: Estadios de *Sappinia* spp. A) Trofozoíto binucleado, B) Quiste binucleado. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC. (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>).

Género *Naegleria*.

De *Naegleria* spp. se han descrito aproximadamente 50 especies (De Jonckheere, 2002; De Jonckheere 2004). *Naegleria fowleri* prolifera en aguas cálidas cuando la temperatura ambiente supera los 30 °C (Kemble y col., 2012). Las cepas patógenas de este género son termofílicas y pueden desarrollarse a temperaturas que oscilan entre los 40 y 46 °C. Presenta una fase flagelada reversible en condiciones de estrés ambiental. Durante la misma es incapaz de dividirse o alimentarse. La forma ameboide presenta lobópodos que permiten el movimiento y los quistes son esféricos con doble pared (Visvesvara y col., 2007) (Figura 4).

Naegleria fowleri produce Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP), mortal en humanos y animales (Cermeño y col., 2006) en la casi totalidad de los casos. La MAP es una afección del sistema nervioso adquirida luego de una exposición a aguas contaminadas. Existen registros en tapires (*Tapirus terrestris*) (Lozano-Alarcón y col., 1997) y en ganado bovino (Daft y col., 2005; Visvesvara y col., 2005; Morales y col., 2006). El primer caso fatal humano en la República Argentina por *N. fowleri* corresponde al año 2017 (Campana y col., 2017, Randazzo y col., 2017).

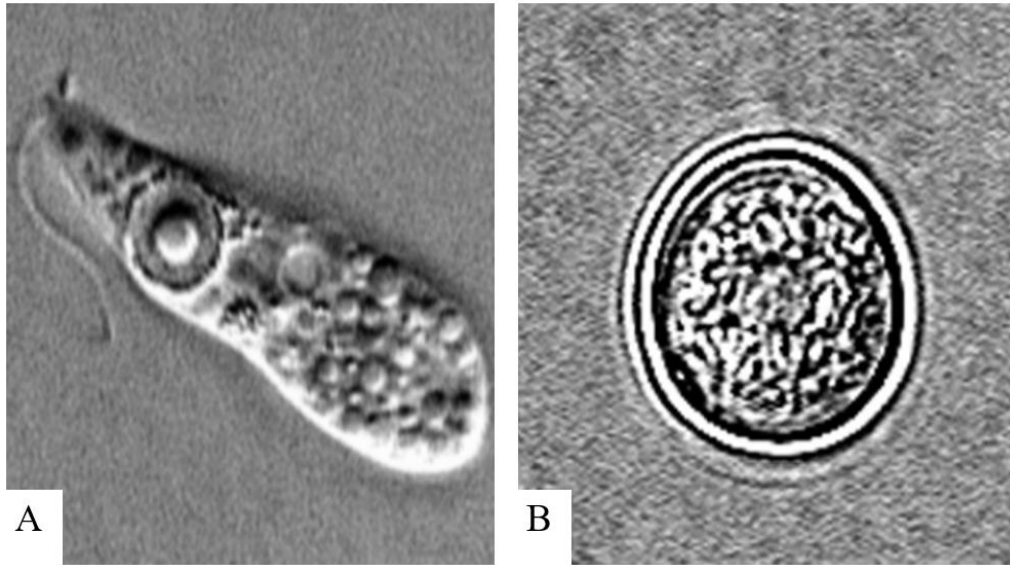


Figura 4: Estadios de *Naegleria fowleri*. A) Trofozoíto flagelado, B) Quiste. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>).

Género *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba fue aislada por primera vez del polvo (Pushkarew, 1913). El género se creó en 1931 (Volkonsky, 1931) pero los criterios de clasificación se discutieron por décadas (Singh, 1950; Pussard, 1966). En 1967 se consideraron a los acantopodios (proyecciones en forma de espinas) y la morfología de los quistes como criterios suficientes para su clasificación (Page, 1967; Khan, 2001). Actualmente *Acanthamoeba* se divide en 20 genotipos diferentes, denominados T1 a T20, en función de la variación en las secuencias de nucleótidos del gen 18S ARNr (Fuerst y col., 2015).

Las especies pertenecientes a este género se encuentran ampliamente distribuidas y son las más prevalente a nivel ambiental. *Acanthamoeba* presenta un ciclo típico de alternancia de trofozoíto y quiste. Las capas de los quistes están separadas por un espacio en toda la superficie excepto donde se forman los ostiolos (poros) que sirven para monitorear las condiciones ambientales (Page, 1967; Bowers y Korn, 1969). Los quistes presentan un exoquiste ondulado y un endoquiste poliédrico, estrellado u oval (Visvesvara y col., 2007; Khan 2006) (Figura 5). Esta doble pared es responsable de la resistencia que presentan a la desecación y a los

agentes químicos (De Jonckhere y col., 1976; Turner y col., 2000; Lloyd y col., 2001; Aksozek y col., 2002).

La doble pared quística es la responsable de la resistencia que presentan los quistes a la desecación, a la falta de alimento, a la mayoría de los agentes químicos (cloración, antibióticos, desinfectantes) y a los agentes físicos (calor, congelación, radiación UV) (De Jonckhere y col., 1976; Brown y Cursons, 1977; Turner y col., 2000; Lloyd y col., 2001; Aksozek y col., 2002).

Puede causar Queratitis Acanthamoebiana (QA), especialmente en usuarios de lentes de contacto o aquéllos con micro-lesiones en córnea que permitan la adhesión del parásito (Lorenzo- Morales y col., 2007). Se estudió el rol patógeno de *Acanthamoeba* spp. en perros, pero no existen datos con respecto al ganado (Valladares y col., 2015, Karaku y col., 2016). Con menor frecuencia produce lesiones en la piel (Acanthamebosis Cutánea o AC), sinusitis y amebosis diseminada. La EAG en humanos se presenta en pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes (Scaglia, 1997; Costamagna, 2018, comunicación personal). En ovinos y equinos se registraron infecciones en el sistema nervioso (Fuentealba y col., 1992, Kinde y col., 1998).

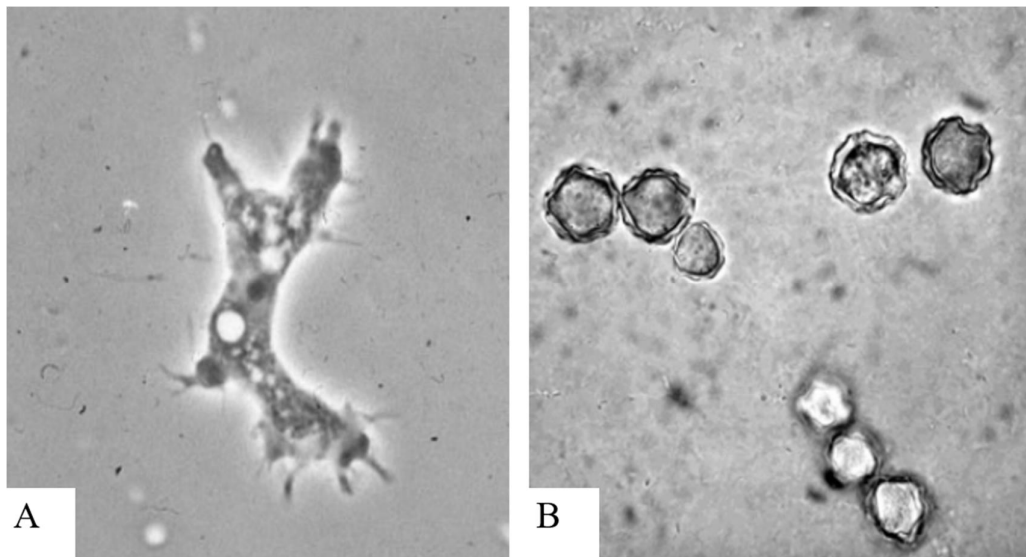


Figura 5: Estadios de *Acanthamoeba* spp. A) Trofozoíto, B) Quistes. Centers for Disease of Control and Prevention, CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/>).

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB), comúnmente conocida como "ojo rosado", afecta a rumiantes en general, es altamente infecciosa y multifactorial, de distribución mundial y responsable de ceguera temporal o permanente (Rosenbusch 1983; Angelos 2010). La enfermedad afecta con mayor frecuencia a los animales jóvenes de razas británicas. La mortalidad es baja y la morbilidad aumenta en verano y otoño (Blood y Henderson, 1976). La QIB es una enfermedad prevalente en los bovinos de la República Argentina. Se presenta en rodeos de cría, invernada, tambos y engorde a corral (*feed-lot*). Los sistemas intensivos con altas cargas son los de mayor riesgo al contagio, debido al contacto directo entre los animales y al manejo en la manga (Zielinski y col., 1997). La aparición y gravedad varía con los años y la característica de cada establecimiento. Asociada fuertemente a bacterias (*Moraxella* spp.) se la estudia como un complejo de organismos actuante (*Herpes Virus Bovino 1*, *Neisseria catarrhalis*, *Mycoplasma* y/o *Chlamydia*) (Rosenbusch y Knudtson, 1983; Hosie, 2000; Fiorentino y col., 2001; Otter y col., 2003; Angelos y col., 2007; Funk y col., 2009; Alexander, 2010; Gould y col., 2013, Osman y col., 2014; Gupta y col., 2015). Las AVL, en especial *Acanthamoeba* spp. no han sido consideradas como parte del complejo patológico.

Los estudios de AVL en la República Argentina corresponden a aguas recreacionales y de consumo (Gertiser y col, 2010 a) y a casos de queratitis humana (D'Alessandro y col., 2007, Gertiser y col, 2010 b; Menghi y col., 2012; Casero y col., 2017).

Las AVL presentan capacidad endosimbiótica con una gran variedad de microorganismos, actuando como ñcaballos de Troyañ (Rowbotham, 1980; Rowbotham, 1986; Barker y Brown, 1994). Esta propiedad las convierte en vehículo o reservorio de diferentes agentes infecciosos (Anand y col., 1983; Berk y col., 1998; Visvesvara y Schuster, 2008). El estudio de los parásitos y simbioses de las AVL es relativamente reciente (Axelsson y col., 2005). En 1956, se describió la presencia de un microorganismo intracelular en amebas (Drozanski, 1956) y más tarde se demostró la presencia de endosimbiontes dentro de *Acanthamoeba* (Proca-Ciobanu, 1975).

Legionella sp. fue el primer patógeno identificado como endosimbionte de *Acanthamoeba* spp., con capacidad de persistir y multiplicarse dentro de la misma (Rowbotham, 1980). Desde entonces, diferentes patógenos intracelulares bacterianos

han sido encontrados con estas características en este género: *Mycobacterium avium* (Steinert y col., 1998), *Listeria monocytogenes* (Ly y Müller, 1990) y organismos del orden *Chlamydiales* (Amann y col., 1997; Birtles y col., 1997). Hasta el momento, la mayoría de los endosimbiontes encontrado en *Acanthamoeba* spp. pertenecen al orden *Chlamydiales* (Corsaro y Venditti, 2004; Horn y col., 2004; Collingro y col., 2005; Thomas y col., 2006; Horn, 2008).

Identificación de las Amebas Vida Libres.

Para identificar las AVL en el laboratorio, en especial *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp., se cultivan muestras en placas con Ágar No Nutritivo (ANN) cubierto con una suspensión de *Escherichia coli* (Page, 1988). La Transformación Amebo Flagelar (TAF) es la técnica que se utiliza para detectar *Naegleria* spp. La tinción de las muestras del ambiente dificulta la diferenciación de trofozoítos/quistes del resto de los organismos presentes. Las técnicas moleculares pueden aplicarse tanto a muestras clínicas como ambientales. Existen cebadores específicos según los géneros a estudiar (Dykova y col., 1999; Schroeder y col.; 2001, Khan y col., 2001; De Jonckheere, 2004; Regoudis y Pelandakis, 2016). Los productos específicos obtenido por PCR se pueden secuenciar para permitir, como el caso de *Acanthamoeba*, clasificar los genotipos del aislamiento.

Antecedentes en República Argentina.

Los estudios de AVL en nuestro país corresponden a casos humanos (D'Alessandro y col., 2007; Gertiser y col, 2010 b; Menghi y col., 2012; Casero y col., 2017; Campana y col., 2017) y presencia en aguas recreacionales o de consumo humano (Gertiser y col., 2010 a; Randazzo y col., 2017).

Generalidades del orden *Chlamydiales*.

Las clamidias se describieron por primera vez como agentes causantes del tracoma hace más de 100 años (Halberstädter y Prowazek, 1907). El orden *Chlamydiales* estuvo restringido mucho tiempo a un grupo de bacterias intracelulares de la familia *Chlamydiaceae*. En las últimas décadas se identificaron nuevas familias por la secuenciación de los genes 16S y 23S del ARNr (Figura 6).

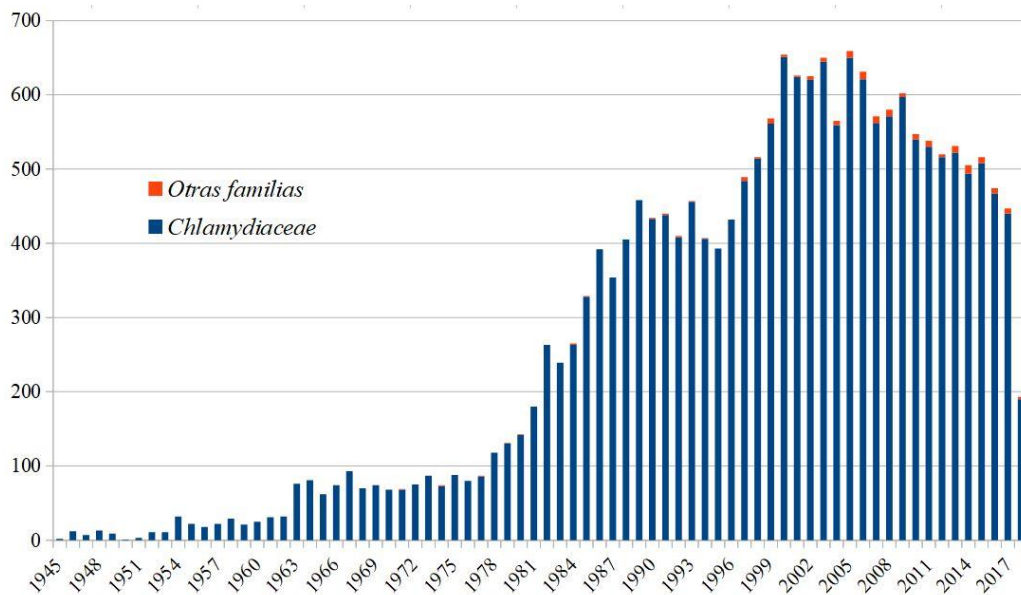


Figura 6: Publicaciones registradas en PubMed desde 1945 hasta 2019 referidas a *Chlamydiaceae* y otras familias. Datos obtenidos de www.pubmed.org (22/04/2019).

Las clamidias son bacterias de 0,2-1,5 μm de diámetro, cocoides, no móviles similares a gram negativas. El ciclo biológico presenta dos formas: un Cuerpo Reticulado (CR) intracelular y Cuerpo Elemental (CE) extracelular (Schachter, 1989) (Figura 7).

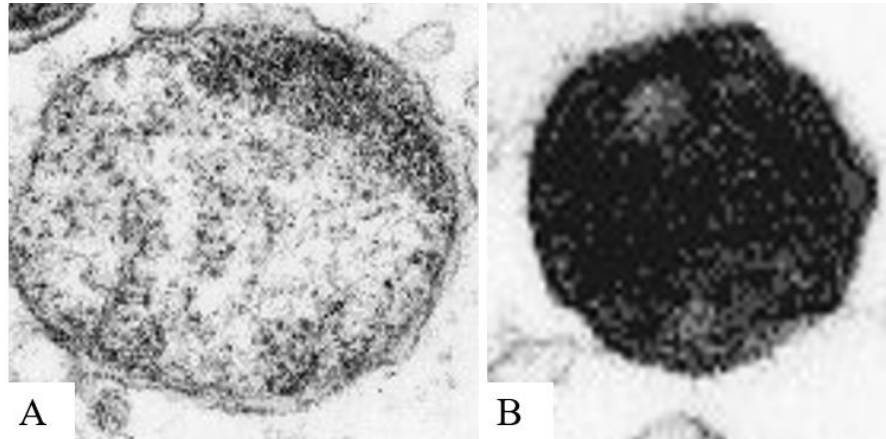


Figura 7: Estadios de *Chlamydia* spp., A) Cuerpo Reticular, B) Cuerpo Elemental (Reed y col., 2000).

El CE es la estructura rígida que proporciona resistencia a las barreras físicas y químicas presentes en el entorno extracelular (Hatch, 1999; Kuo y col., 2011). Contiene ARN y ADN en relación 1:1, y presenta un factor activo que permite su internalización en forma de vacuola fagocítica (Moulder, 1991). En el interior de la célula hospedadora, se moviliza hacia la zona perinuclear para evitar su fusión con lisosomas. En el interior de la vacuola evoluciona a CR, una estructura frágil, de aspecto granular, con una relación ARN: ADN 3:1. Aquí comienza su multiplicación hasta ocupar la mayor parte del citoplasma. El desplazamiento del núcleo hacia la periferia celular es una característica frecuentemente observada. Cuando la inclusión alcanza un número máximo de CR comienza su diferenciación en CE. Estos son liberados por lisis celular o extrusión de la inclusión (Rodríguez Fermepin y col., 2006; Pospischil y col., 2010 Borel y col., 2018) (Figura 8). En respuesta al estrés las clamidias pueden generar un estado denominado Cuerpo Aberrante (CA). Estos cuerpos son viables, pero no se transforman en CE y no son infecciosos. El estado de persistencia como CA en un hospedador contribuiría a la inflamación prolongada y crónica (Borel y col., 2018).

Las clamidias tienen un genoma bacteriano pequeño comparado con otras bacterias (Stephens y col., 1998). El tamaño de la información genómica está directamente relacionado con la diversidad de hospedadores posibles (Rodríguez-Domínguez y col., 2014).

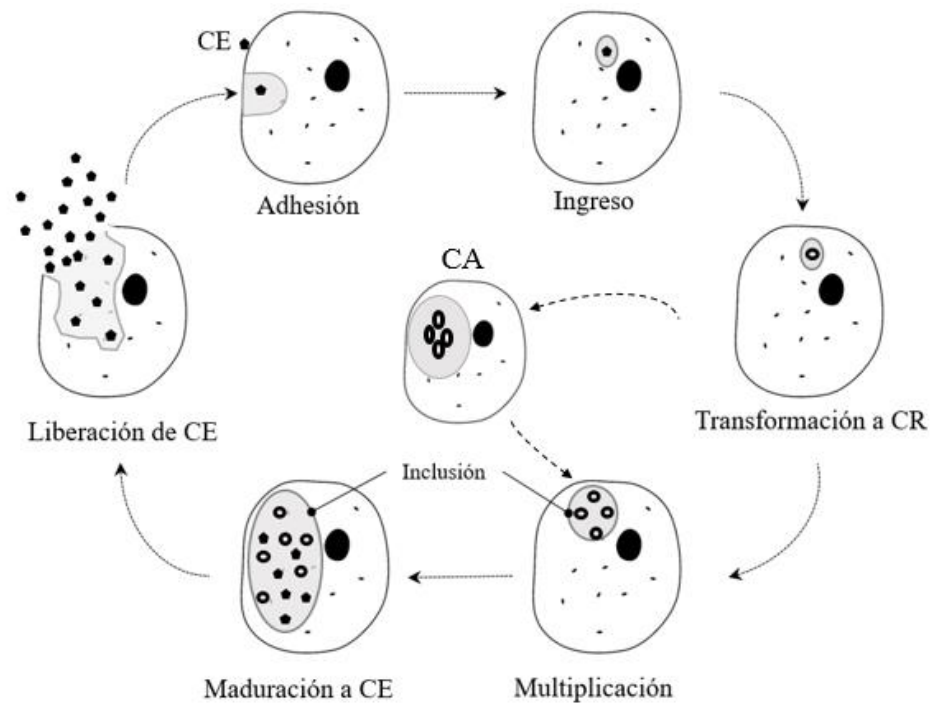


Figura 8: Esquema del ciclo de vida de clamidias.

Los integrantes de la familia *Chlamydiaceae* están cubiertas por una doble membrana con ausencia de peptidoglucano en el espacio periplasmático. En la membrana externa se encuentran los lipopolisacáridos (LPS), la proteína principal (en inglés *Major Outer Membrane Protein*, MOMP) y las proteínas ricas en cisteína (PRC). Estos son los componentes antigénicos más importantes (Figura 9).

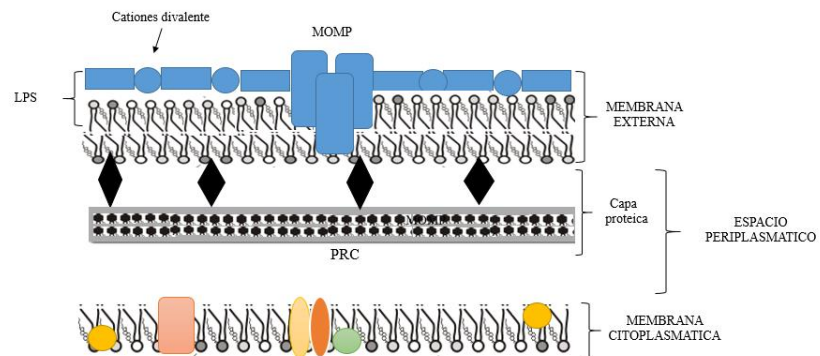


Figura 9: Estructura básica de la familia *Chlamydiaceae*.

El LPS es común dentro del orden *Chlamydiales*. La MOMP es la proteína más abundante de la membrana y cumple función de porina en el CR y aporta rigidez en el CE junto a las PRC. Consta de 5 dominios conservados (DCI V) y 4 dominios variables (DVI IV) que están expuestos en la superficie externa donde se encuentran epítomos específicos de género, especie y tipo. Las PRC corresponden a una proteína de envoltura de 62kDa y una lipoproteína de 12kDa.

El LPS del orden *Chlamydiales* puede presentar reacción cruzada con algunos LPS de enterobacterias en reacciones serológicas (Haralambieva y col., 2001; Longbottom y col., 2002). La característica inmunogénica de la MOMP permitió el diseño de equipos comerciales específicos a nivel de especie sin reacciones cruzadas (Salti6Montesanto y col., 1997; Buendia y col., 2001; Longbottom y col., 2001; Longbottom y col., 2002). Estas características y su condición de vida intracelular, dificultan el diagnóstico del orden por métodos clásicos. Este orden requiere de técnicas de amplificación génica para su correcta identificación.

Taxonomía de orden *Chlamydiales*.

Las clamidias fueron consideradas en sus inicios como protozoos (6Chlamydozoa6) (Halberstädter y Prowazek, 1907). En 1929, Europa fue afectada por brotes de una neumonía atípica adquirida por contacto con aves psitácidas (loros), denominada psitacosis. Se llevaron a cabo estudios para definir su ciclo y aislar el agente pat6geno (Bedson y Bland, 1932). El primer aislamiento se obtuvo de un saco vitelino de embri6n de pollo inoculado con material de ojos de humanos infectados (Tang y col., 1957), y fue reconocida como bacteria en la d6cada 606 (Page, 1966). Por sus características bioquímicas y morfol6gicas (sensibilidad a la sulfamida y presencia de gluc6geno en las inclusiones) se propusieron las especies *C. trachomatis* y *C. psittaci* (Page, 1968). Tres a6os despu6s se clasific6 el orden *Chlamydiales*, familia *Chlamydiaceae*, g6nero *Chlamydia* (Storz y col., 1971). *C. trachomatis* y *C. psittaci* fueron las 6nicas representantes del orden hasta 1980.

Estudios moleculares confirmaron su inclusi6n entre las bacterias (Moulder, 1984) y detectaron la diversidad gen6tica de *C. psittaci* (Grayston y col., 1989; Fukushi y col., 1992). En 1999 se realiz6 una revisi6n taxon6mica del orden *Chlamydiales* que propuso nuevas familias, g6neros y una nueva denominaci6n de algunas especies (Everett y col., 1999 a y b; Everett y col., 2000). El descubrimiento

de organismos similares a *Chlamydia* (en inglés *Chlamydia-like organism*) incrementó la diversidad del orden. Se identificaron hasta el momento nueve familias que comparten más del 80 % de similitud en las secuencias de los genes 16S y 23S del ARNr (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación del orden *Chlamydiales* basado en secuencias del gen 16S ARNr y sus hospedadores conocidos (H: humanos, G: ganado, M: otros mamíferos, A: aves, R: reptiles-anfibios-peces, P: protozoos) (adaptado de Taylor-Brown y col., 2015).

<i>Familia</i>		Hospedadores
<i>Piscichlamydiaceae</i>	<i>Candidatus Piscichlamydia salmonis</i>	R
	<i>Chlamydiales sp. (4)</i>	
	<i>Candidatus Parilichlamydia carangidicola</i>	
<i>Parilichlamydiaceae</i>	<i>Candidatus Actinochlamydia clariae</i>	R
	<i>Similichlamydia sp. (2)</i>	
	<i>Uncultured Chlamydiales</i>	
<i>Clavichlamydiaceae</i>	<i>Candidatus Clavichlamydia salmonicola</i>	R
	<i>Candidatus Amphibichlamydia sp. (2)</i>	
<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia sp. (11)</i>	H-G-M-A-R
	<i>Uncultured Chamydiales</i>	
	<i>Simkania nevegensis</i>	
	<i>Candidatus Syngnamydia venezia</i>	
<i>Simkaniaceae</i>	<i>Candidatus Fritschea sp. (2)</i>	H-R-P
	<i>Uncultured Simkaniaceae</i>	
	<i>Chlamydiales symbiont (2)</i>	
	<i>Uncultured Chlamydiales (5)</i>	
<i>Rhabdochlamydiaceae</i>	<i>Candidatus Rhabdochlamydia sp. (3)</i>	R
	<i>Candidatus Renichlamydia lutjani</i>	
<i>Cribchlamydiaceae</i>	<i>Criblamydia sequanensis</i>	P
	<i>Estrella lausannensis</i>	
	<i>Candidatus Protochlamydia sp. (4)</i>	
	<i>Candidatus Mesochlamydia elodea</i>	
	<i>Candidatus Metachlamydia lacustris</i>	
<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Protochlamydia naegleriophila</i>	H-G-M-R-P
	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	
	<i>Neochlamydia sp. (2)</i>	
<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Uncultured Chlamydiales</i>	
<i>Waddiaceae</i>	<i>Waddiaceae sp.(2)</i>	H-G-M-P
	<i>Waddlia sp. (2)</i>	

La familia *Chlamydiaceae* se reunificó en un solo género, *Chlamydia*, y se reconocen 11 especies (Vorimore y col., 2013; Sachse y col., 2014; Sachse y col., 2015; Borel y col., 2018). Tres especies se encuentran en condición de Candidatus (Ca.) Ca. *C. ibidis*, Ca. *C. sanzinia* y Ca. *C. corallus* (Borel y col., 2018). Las especies de esta familia se caracterizan por su patogenicidad y su potencial zoonóticos. La familia *Parachlamydiaceae* comprende parásitos endosimbiontes de las AVL (Fritsche y col., 1993; Horn y col., 2000; Corsaro y col., 2006). Estudios recientes demostraron la participación de *Parachlamydia* spp. en abortos bovinos (Borel y col., 2007). La familia *Waddliaceae* se aisló de un feto bovino abortado en los Estados Unidos y se considera un agente abortigénico con una distribución mundial en el ganado (Dilbeck y col., 1990; Rurangirwa y col., 1999; Henning y col., 2002, Blummer y col.; 2011; Wheelhouse y col., 2016). La familia *Simkaniaceae* incluye una sola especie, *Simkania negevensis*, descrita como contaminante de cultivo celular y recientemente como causante de neumonías humanas (Yamaguchi y col., 2005; Friedman y col., 2006). Las nuevas familias son estudiadas por su rol como patógenos emergentes para los humanos (Friedman y col., 2003; Greub y Raoult, 2002) y como causales de pérdidas reproductivas en rumiantes (Dilbeck y col., 1990; Henning y col., 2002).

Identificación de clamidias.

La detección de clamidias presenta dificultades asociadas a las técnicas empleadas. El aislamiento en cultivo es el método de referencia, pero no está disponible en los laboratorios de diagnóstico y requiere condiciones de bioseguridad adecuadas (Longbottom y Coulter, 2003; World Health Organization, 2006). Las técnicas serológicas son herramientas que permiten detectar la circulación anticuerpos y estimar prevalencias (Vlahovic y col., 2001) (Tabla 3). Las más utilizadas a nivel mundial son la fijación de complemento (FC), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA). La FC no está estandarizada en los laboratorios y no se aconseja su utilización en bovinos por la alta proporción de falsos negativos (Kaltenboeck y col., 1997 a). La IFI es una técnica inespecífica que requiere de un operador con experiencia para su interpretación (Haralambieva y col., 2001; Longbottom y col., 2002; Travnicek y col., 2002; Niemczuk, 2005). El ELISA permite identificar muestras positivas a partir de una línea corte provista por el fabricante. El uso de antígenos recombinantes

incrementó la sensibilidad y especificidad de esta técnica (Horigan, 2009). El análisis serológico podría presentar a futuro progresos tan notables como el obtenido con el estudio del ADN (Sachse y col., 2018).

Tabla 3: Determinación de seroprevalencia a *Chlamydia* spp. en ganado bovino de diferentes países a partir de ELISA, Hemaglutinación Indirecta (HI) y Fijación de Complemento (FC).

Continente	Países	Prueba	Total sueros (N)	Prevalencia (%)	Referencia	
EUROPA	Irlanda	ELISA	2000	4,8	Wilson y col., 2012	
	Bélgica	ELISA	1849	2,0	Yin y col., 2014	
	Turquía	ELISA	192	8,3	Gokce y col., 2007	
	Suecia	ELISA	525	0,4	Godin y col. 2008	
	Albania	ELISA	185	40,5	Juma y col., 2013	
ASIA	China	HI	875	17,8	Liu y col., 2013	
	Taiwán	ELISA	735	53,0	Wang y col., 2001	
	Jordania	ELISA	671	18,9	Talafha y col., 2012	
	China	HI	400	7,3	Zhou y col., 2013	
AFRICA	Argelia	ELISA	357	0,8	Derdour y col., 2017	
AMERICA	NORTE	México	ELISA	271	0,7	Praga-Ayala y col.; 2014
		Brasil	FC	3012	1,4	Igayara-Souza y col., 2004
	SUR	Argentina	FC	113	23,0	Rodríguez Fermepín y col., 1995

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polimerasae Chain Reaction*; PCR) permitió la reclasificación del orden *Chlamydiales* (Everett y col., 1999) y su detección en diferentes tipos de muestras (Jacobson y Teleford, 1990; Kaltenboeck y col., 1991, Hewinson y col., 1997; Kaltenboeck y col., 1997b; Messmer y col., 1997; Kahane y col., 1998; Berger y col., 1999; Fritsche y col., 2000; Horn y Wagner, 2001; Laroucau y col., 2001; Bodetti y col., 2002; Sachse y Hotzel, 2003; Condon y Oakey, 2007; Sachse y col., 2009). En un estudio realizado en bovinos se determinó la ausencia de correlación entre serología y PCR (Kauffold y col., 2007).

Las infecciones por clamidias en el ganado se pueden manifestar como aborto (Borel y col., 2006), poliartritis (Storz y col., 1966; Twomey y col., 2003; Walker y col., 2015; Walker y col., 2016), encefalomielitis (McNutt y Waller, 1940;

Jelocnik y col., 2014; Hunt y col., 2016), queratoconjuntivitis (Otter y col., 2003; Polkinghorne y col., 2009; Gould y col., 2013, Osman y col., 2014; Gupta y col., 2015), neumonía (Wilson y Thomson, 1968; Wheelhouse y col., 2013), enteritis (Doughri y col., 1974; Ohtani y col., 2015), hepatitis (Reggiardo y col., 1989), vaginitis y endometritis (Wittenbrink y col., 1993 a, b), infertilidad (DeGraves y col., 2002; DeGraves y col., 2004; Wehrend y col., 2005) y mastitis crónica (Biesenkamp-UHE y col., 2007) (Tabla 4).

Tabla 4: Manifestaciones clínicas del orden *Chlamydiales* en diferentes hospedadores domésticos.

Especies	Hospedador principal	Otros hospedadores	Clínica
<i>Chlamydia psittaci</i>	Aves	Bovino Porcino Equino	Trastornos reproductivos e inflamación de vías respiratorias
<i>Chlamydia pecorum</i>	Bovino Ovino Caprino	Porcino	Poliartritis, enteritis, neumonía, queratoconjuntivitis, infecciones urogenitales, encefalomielitis
<i>Chlamydia abortus</i>	Ovino Caprino	Bovino Porcino Equino	Trastornos reproductivos, mastitis e inflamación pulmonar
<i>Waddlia condrophila</i>	Bovino		Trastornos reproductivos
<i>Parachlamydia</i> spp.	Bovino		Trastornos reproductivos

Los primeros estudios se realizaron en pequeños rumiantes debido a su impacto económico. La clamidiosis ovina, también conocida como aborto enzoótico ovino (AEO) se diagnosticó por primera vez en Escocia (Stamp y col., 1950). A nivel mundial, existen informes de pérdidas económicas en ovinos por clamidiosis que oscilan entre el 19 % al 50 % (Longbottom y col., 2002; Borel y col., 2004; Aitken y Longbottom, 2007; Stuen y Longbottom, 2011; Chile 2014) (Figura 10).

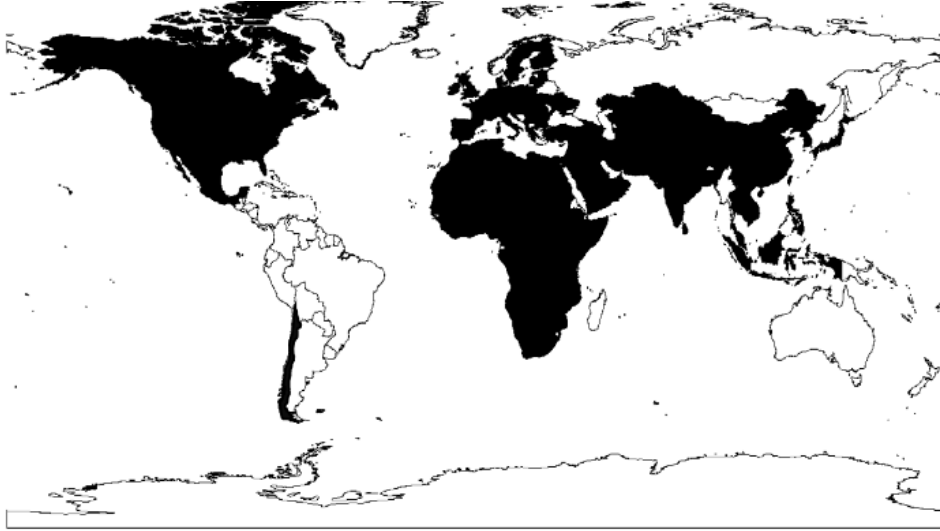


Figura 10: Países afectados por el aborto enzoótico ovino (AEO).

La infección en los bovinos cursa de manera subclínica, lo que enmascaró su importancia. Los primeros registros corresponden a casos de encefalomiелitis y el primer aislamiento se realizó a partir de un aborto (Shewen, 1980; Perez-Martinez y col., 1986). Se notificaron trastornos reproductivos asociados a clamidias en Japón (Nabeya y col., 1991), Alemania (Wittenbrink y col., 1993; Wehrend y col., 2005), Gran Bretaña (Holliman y col., 1994), Italia (Cavirani y col., 2001), Taiwan (Wang y col., 2001), Suiza (Pospischil y col., 2002), Estados Unidos (Kaltenboeck y col., 2005) y Polonia (Szymanska y col., 2013).

La presencia de clamidias es generalizada en toros (Ball y col., 1964; Storz y col., 1968, Storz y col., 1976; Travniczek y col., 1980; Domeika y col., 1994; Kauffold y col., 2007; Teankum y col., 2007), no hallándose diferencias significativas en los parámetros de eyaculación entre animales con semen negativo y positivo (Kauffold y col., 2007) aunque existen discrepancias al respecto (Vzník y col., 1996). La crioconservación del semen no logra eliminar al patógeno (Storz y col., 1976; Perez-Martinez, 1985).

La mucosa uterina bovina es susceptible a la infección por clamidias (Wittenbrink y col, 1993 b). Su presencia en vagina en ausencia de contacto sexual indica que la enfermedad puede contraerse a edades tempranas (DeGraves y col., 2003; Jee y col., 2004; DeGraves y col., 2004). La prevalencia de la enfermedad es similar

entre animales asintomáticos (repetición de celo) y sintomáticos (vaginitis, endometritis, aborto) (Tabla 5).

Tabla 5: Prevalencia de hembras con problemas reproductivos (PR) y sin problemas reproductivos (SPR) a clamidias, estimada a partir de técnicas moleculares.

País	N	PR	SPR	PR+ (%)	SPR+ (%)	Referencia
Taiwán	94	63	31	22 (35)	14 (45)	Wang y col., 2001
Austria	544	261	283	22 (8)	25 (9)	Petit y col., 2008
Suecia	43	31	12	0 (0)	2 (17)	Godin y col., 2008
Polonia	282	157	125	18 (11)	6 (5)	Szymanska y col., 2013
TOTAL	963	512	451	62 (12)	47 (10)	

El primer aislamiento de clamidias en bovinos se realizó a partir de un aborto (Shewen, 1980). Los abortos pueden presentarse de manera esporádica durante el último trimestre de gestación (Idtse, 1984; Perez-Martínez y Storz, 1985). La detección de clamidias en abortos fue reportada en diferentes países (Tabla 6). Los mortinatos o nacimientos de crías débiles son otra forma de expresión de la infección, favorecida por la implementación del servicio natural (Longbottom y Coulter, 2003; Kemmerling y col., 2009; Poudel y col., 2012; Borel y col., 2018).

Tabla 6: Detección de clamidias por PCR en abortos bovinos a nivel mundial.

País	Agentes <i>Chlamydiales</i>	PCR		Referencia
		N	+ (%)	
Suiza	<i>Chlamydiaceae</i>	235	9 (2)	Borel y col., 2006
Suiza	<i>Chlamydiales</i>	249	2 (1)	Reitt y col., 2007
Suiza	<i>Parachlamydiaceae - Chlamydiaceae</i>	235	46 (20)	Ruhl y col., 2009
Irán	<i>Chlamydiaceae</i>	145	26 (18)	Arashi y col., 2011
Irán	<i>Chlamydiaceae</i>	9	1 (11)	Barati y col., 2017
Escocia	<i>Parachlamydiaceae</i>	113	21 (14)	Wheelhouse y col., 2012
Polonia	<i>Chlamydiaceae</i>	34	3 (9)	Szymanska y col., 2013
Gran Bretaña	<i>Parachlamydiaceae - Chlamydiaceae</i>	77	10 (13)	Wheelhouse y col., 2015

Existen integrantes del orden *Chlamydiales* que son transmisibles al hombre y resultan de importancia para la salud pública. El grupo de riesgo lo constituyen las personas dedicadas a actividades pecuarias, frigoríficos, manejo y cuidados de animales. El riesgo aumenta en personas inmunocomprometidas y mujeres

embarazadas (Bazala y. Renda, 1992; Hinton y col., 1993; Kampinga y col. 2000; Wittenbrink, 2002; Pospischil y col 2002; Walder y col. 2005; Rodolakis y Yousef Mohamad, 2010; Essig y Longbottom; 2015). Las vías de transmisión pueden ser por la inhalación de aerosoles infectados (orina, heces) y por contacto con fluidos.

La falta de un cuadro clínico específico de la enfermedad no favoreció el análisis a nivel económico. Los primeros trabajos se realizaron en sistemas de producción lechero del Reino Unido, estimándose pérdidas anuales del orden de £ 160 millones (Livingstone y Longbottom, 2006).

Antecedentes en la República Argentina.

La información disponible en el país para rumiantes corresponde a descripciones de dos casos puntuales, cuatro de seroprevalencia y un resumen de casos de diagnóstico de un laboratorio privado (Tabla 7).

Tabla 7: Referencias de clamidias en rumiantes para Argentina.

Hospedador	Estudio	N	Positivos (%)	Método detección	Referencia
Bovino	Síndrome nervioso	1	1	IFD-LPS	Venzano y col., 2008
Caprino	Aborto	1	1	IFD, IHQ, Secuenciación	Giannitti y col., 2016
Bovino	Queratoconjuntivitis	206	7 (3)	ELISA fase sólida	Odeón y col., 2006
Caprino	Serología	15	11 (73)	ELISA indirecto	Bedotti y col., 2008
Caprino	Serología	136	28 (21)	ELISA indirecto	Fiorentino y col., 2015
Bovino	Serología	113	26 (23)	FC- IFI	Rodríguez Fermepín y col., 1995
Bovino	Vaca vacia	9696	213 (2)	IFD	Laboratorio de diagnóstico Veterinario Azul,
Bovino	Aborto	1571	36 (2)	IFD	Resumen de casos 1992-2013
Bovino	Síndrome nervioso	499	213 (49)	IFD	
Bovino	Queratoconjuntivitis	238	88 (37)	IFD	
Bovino	Síndrome respiratorio	238	8 (2)	IFD	

La República Argentina ocupa un lugar importante en el mundo como país ganadero, con un stock nacional de 73 millones de cabezas (caprino, ovino y bovino)

(Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, 2018). La producción de carne bovina representa el 3 % del PBI nacional (Otaño, 2002).

La provincia de La Pampa, ubicada en el centro del país, cuenta con una superficie de 14 millones de ha. La actividad ganadera se extiende a lo largo de todo el territorio provincial, con receptividades que disminuyen en sentido NE ó SO, conforme disminuye la precipitación media anual (850 mm- 250 mm).

Uno de los problemas que tienen los sistemas de cría es la baja eficiencia reproductiva. El porcentaje de terneros logrados a nivel provincial es del 58 %, valor similar a la media nacional (61 %) (SENASA, 2018).

El ternero puede perderse en cualquier momento del desarrollo, desde el aborto (muerte embrionaria y/o fetal) hasta la muerte con pocos días de vida. La pérdida reproductiva puede ser consecuencia de limitaciones nutricionales, partos distócicos o problemas sanitarios. Con respecto a estos últimos, se debe evaluar la presencia de agentes infecciosos como causante de los abortos y controlar el estado sanitario de las hembras y los machos del rodeo.

La identificación de agentes infecciosos en pérdidas reproductivas no supera el 50 % a nivel nacional (Campero 2003) y el 62 % a nivel local (Rojas y col., 2014). Las bacterias (*Leptospira* sp., *Brucella abortus* y *Campylobacter* sp.) y los protozoos (*Neospora caninum*) son identificados como los principales responsables de las pérdidas (30 % y 17 %, respectivamente) en la provincia de La Pampa. Las enfermedades que cursan de manera subclínica, como las producidas por clamidias, son consideradas atípicas y no diagnosticadas.

La falta de estudios de las AVL en el ambiente ganadero, la falta de diagnóstico del orden *Chlamydiales* y su relación simbiótica expande la posibilidad de identificar a estos organismos como agentes infecciosos del sistema ganadero pampeano.

HIPOTESIS

Las Amebas de Vida Libre y las bacterias del orden *Chlamydiales* están presentes en el ambiente ganadero y afectan a los rodeos bovinos de la provincia de La Pampa, Argentina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar la presencia de Amebas de Vida Libre y especies del orden *Chlamydiales* como agentes infecciosos en bovinos de la provincia de La Pampa, Argentina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la presencia de Amebas Vida Libre en aguas destinadas a consumo (natural y artificial) de bovinos de cría.
2. Caracterizar a nivel morfológico y molecular los aislamientos de Amebas de Vida Libre, con especial énfasis en *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.
3. Evaluar la presencia de Amebas de Vida Libre en ojos de bovinos con y sin sintomatología de queratoconjuntivitis.
4. Estudiar a nivel molecular la presencia de Amebas de Vida Libre en fetos abortados.
5. Estudiar de manera retrospectiva la presencia del orden *Chlamydiales* en pérdidas reproductivas del ganado bovino.
6. Determinar la prevalencia de anticuerpos séricos contra *Chlamydia abortus* en terneros, vaquillonas/vacas y toros.
7. Evaluar a nivel molecular la presencia de endosimbiontes del orden *Chlamydiales* en cultivos de Amebas de Vida Libre, con especial énfasis en *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.
8. Analizar a nivel molecular la presencia del orden *Chlamydiales* en muestras bovinas de ojos con y sin queratoconjuntivitis, cérvix, lavado de úteros de vacas/vaquillonas donadoras de embriones, esmegma prepucial, semen, órganos de fetos abortados formolados y fetos no abortados.
9. Adaptar el protocolo de diagnóstico por técnicas moleculares a las condiciones del laboratorio de diagnóstico veterinario de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Anguil (La Pampa, Argentina).

MATERIALES Y METODOS

Descripción del área de estudio.

La provincia de La Pampa (Argentina) tiene una superficie de 14 millones de ha (6 % del territorio nacional). La productividad de sus ambientes y la densidad poblacional se reduce en sentido noreste-sudoeste, en igual sentido que las precipitaciones (800 mm - 200 mm). Estas condiciones definen tres ecorregiones: región Este (estepa), Centro (Caldenal) y Oeste (Monte occidental) (Lorda y col., 2008) (Figura 11).

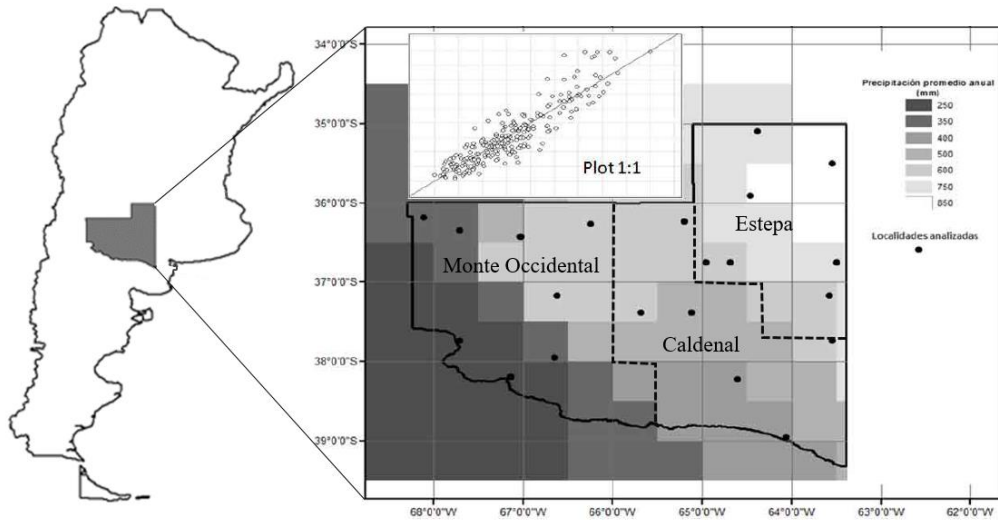


Figura 11: Ecorregiones y precipitación media anual de la provincia de La Pampa, período 1980-2010, basada en el modelo propuesto por Rudolf y Schneider (Vázquez y col., 2013).

La región Este se caracteriza por la presencia de sistemas productivos mixtos agrícola-ganaderos recriadores ó invernadores (Lorda y col 2008).

La región Centro es apta para sistemas de cría-recría de ganado bovino. La base forrajera es un pastizal natural de potencial productivo entre 400 y 1500 kg materia seca ha-1 (Frank y col., 1994).

La región Oeste se caracteriza por la presencia de rodeos caprinos y una ganadería bovina marginal, como consecuencia de las escasas precipitaciones registradas en la región (250 mm anuales).

Selección de las poblaciones de estudio y toma de muestras.

Se realizó un estudio de corte transversal en establecimientos de ganadería bovina. No se muestrearon bovinos en la región Oeste por la falta de disponibilidad de instalaciones para el encierre e inmovilización de los animales.

El muestreo de Amebas de Vida Libre, con énfasis en *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp., consideró:

- Agua de bebidas.
- Muestras oculares en terneros con y sin sintomatología de queratoconjuntivitis.
- Órganos de fetos abortados formolados (hígado, corazón, riñón, pulmón).

El muestreo del orden *Chlamydiales* consideró:

- Muestras de órganos parafinados (hígado, corazón, riñón, pulmón y cerebro) provenientes de pérdidas reproductivas.
- Sangre para la obtención de sueros en la categoría ternero, vaca/vaquillona y toro.
- Muestras oculares en terneros con y sin sintomatología de queratoconjuntivitis.
- Endosimbiontes presentes en AVL (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.).
- Cérvix en vacas y vaquillonas.
- Lavado de úteros de vacas/vaquillonas donadoras de embriones.
- Esmegma prepucial.
- Semen de toros provenientes de cabañas.
- Órganos de fetos abortados formolados (hígado, corazón, riñón, pulmón).
- Órganos de fetos no abortados de frigoríficos (hígado, corazón, riñón, pulmón).

Las características de cada muestreo se describirán detalladamente en el capítulo respectivo.

Detección de Amebas de Vida Libre, con especial en énfasis *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.

Muestra de agua de bebida.

Se colectaron en frascos estériles 65 muestras de agua de bebida (500 ml) en establecimientos ganaderos de toda la provincia (Figura 12). Se registró en cada caso coordenadas geográficas, temperatura y pH de cada muestra. Las muestras se dejaron decantar durante 24 h.



Figura 12: Aguadas artificiales y naturales destinadas para consumo ganadero.

Se desechó el sobrenadante y de cada muestra se retuvieron 40 ml. El volumen retenido se centrifugó (Gelec G-422) a 500 g durante 10 min. Del sedimento se obtuvieron los inóculos para los cultivos (Figura 13).

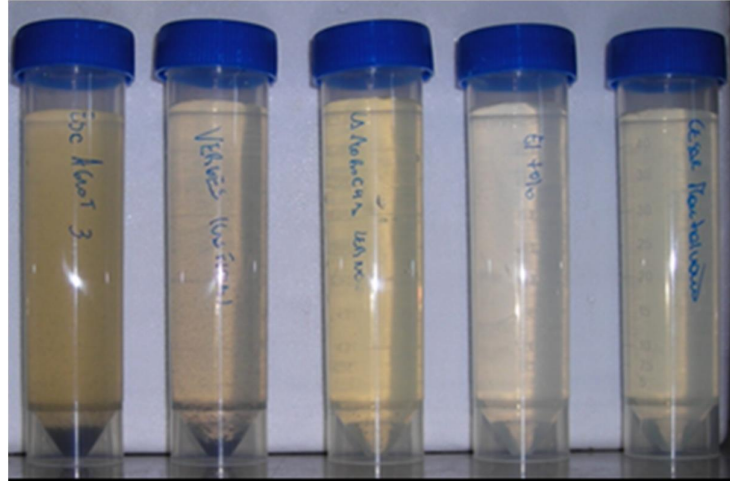


Figura 13: Muestras de agua para cultivo en Agar No Nutritivo (ANN).

Muestras oculares.

Se realizaron 50 hisopados conjuntivales en terneros provenientes de 3 rodeos (razas británicas y sus cruza). Se seleccionaron en cada caso, animales con y sin síntomas clínicos de queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) sin tratamiento farmacológico (Figura 14)



Figura 14: Bovino con queratoconjuntivitis.

El muestreo se realizó de la siguiente manera:

- Se lavó el ojo con solución fisiológica estéril.
- Se secó suavemente con papel blanco absorbente estéril.
- Se tomó muestra de la conjuntiva ocular con hisopos de dacrón (código 300 263, DELTALAB, Barcelona- España) (uno por animal), cubriendo todo el ojo.
- Se cortó el hisopo y se colocó en un tubo con solución fisiológica estéril (5 ml) (fraccionada en cámara biológica tipo II). Las muestras se conservaron refrigeradas.
- Las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 10 min.
- Se extrajo una alícuota de 100 µl del sedimento para el cultivo de AVL.
- Se reservó 1 ml para el estudio de la presencia de especies del orden *Chlamydiales*.

Cultivo de Amebas de Vida Libre (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.).

Se sembraron 100 µl del sedimento en placas de Petri (50 mm de diámetro y 14,2 mm de altura) con Ágar No Nutritivo (ANN) cubierto con una suspensión de *Escherichia coli* (viable) en medio de Page (página 52) como nutriente para el protozoo (Page, 1976). Se incubaron las placas a 37 °C y monitorearon diariamente durante 15 días para la detección de trofozoítos. Superado este periodo sin actividad, se consideró ausencia de AVL.

Sobre los cultivos positivos de AVL, se realizó complementariamente la prueba de Transformación Amebo Flagelar (TAF) para la detección del género *Naegleria*. Se sembraron nuevamente en placas de Petri con ANN. Se incubaron a 42°C durante 48 h y se agregaron 3 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente y se controlaron a las 2, 4 y 6 h de incubación.

Se observaron 60 trofozoítos y 60 quistes en un microscopio Olympus IMT2 a 400x por muestra para su descripción morfológica.

Extracción de ADN de cultivos de Amebas de Vida Libre (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.).

Se realizó la extracción de ADN cuando la placa presentó al menos un 80 % de crecimiento de trofozoítos (el quiste es resistente a los reactivos químicos lo que dificulta la extracción del ADN). Para ello:

- Se recolectaron en un tubo estéril de 1,5 ml los trofozoítos de cada placa mediante lavado con 500 µl de CIK 0,15M frío y raspado con ansa.
- Se centrifugó a 100 g durante 10 min a 4 °C (Thermo- Micro CL 21R) y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más.
- Se lisaron las células con 500 µl de *buffer* de lisis UNSET (Hugo y col, 1992) a temperatura ambiente e igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) (página 55).
- Se centrifugó la suspensión a 8000 g durante 10 min.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril de 2 ml.
- Se añadieron 500 µl fenol-cloroformo-isoamílico, 10 µl de NaCl 3M y 1 ml etanol absoluto (frío) para la precipitación del ADN.
- Se refrigeró a -20 °C durante toda la noche.
- Se centrifugó a 15.000 g durante 30 min.
- Se lavó el precipitado con 500 µl de etanol al 70 % (frío) y se centrifugó a 15.000 g durante 30 min.
- Se secaron los precipitados en bloque térmico a 55 °C.
- Se añadieron 100 µl de agua libre de nucleasas (Biodynamics) y se conservó a -20 °C.

Muestras de órganos de fetos abortados formolados.

Se obtuvieron muestras de órganos (corazón, pulmón, hígado y riñón) de fetos abortados de bovinos remitidos por laboratorios de diagnóstico veterinario locales. Las muestras estaban fijadas en formol bufferado al 10 % (Figura 15).



Figura 15: Órganos de fetos abortados formolados.

De cada órgano se utilizó una porción de 0,5x 0,5 cm. Las porciones fueron depositadas por separado en tubos de 50 cm³ con 30 cm³ de agua destilada (estéril y autoclavada), las muestras fueron agitadas vigorosamente (agitador múltiple, VICKING ROTO LAB). Después de cada agitación se volcó el agua y se agregó la misma cantidad. Este procedimiento se repitió 4 veces con un descanso de 30 min entre agitación y agitación. Posteriormente las muestras se colocaron en tubos de 12,5 cm³, y se realizaron dos lavados más. Cada uno de 15 min de duración y un descanso de 10 min con agua libre de nucleasas (Byodinamics). Por último, se colocaron las muestras en tubos estériles de 2 ml con agua libre de nucleasas (Byodinamics) y se centrifugó 10 min durante 10.000 g, este proceso se repitió dos veces. Finalizado el lavado de muestras, cada órgano se trituró individualmente en mortero y se reservaron 400 µl para la extracción de ADN por el método *Salting out*.

Extracción de ADN por *Salting - Out* de órganos de fetos abortados formolados.

La extracción de ADN se realizó aplicando el protocolo de Baena del Valle y col. (2013) modificado:

-Se incubaron durante 24 h 200 µl de muestra con 400 µl de una solución con proteinasa K 10 mg/l (NaCl 1 M, Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8; dodecilsulfatosódico 10 %) a 60 °C para su digestión.

- Se sometió el producto de digestión a 95 °C durante 10 min para inactivar la proteinasa K.
- Se añadieron 500 μ l de NaCl 5 M.
- Se agitó en vórtex 30 s.
- Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó (PRISM Labnet) a 14.000 g por 5 min.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril con 600 μ l de isopropanol a 620 °C.
- Se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 14.000 g por 5 min.
- Se descartó el sobrenadante.
- Se lavó el sedimento de ADN con etanol al 70 % y se centrifugó a 14.000 g durante 5 min.
- Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar los restos de alcohol.
- Se añadieron 50 μ l de agua libre de nucleasas (Biodynamics) para eluir el ADN y se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.

Detección de géneros de Amebas de Vida Libre (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.).

Las muestras fueron sometidas a una PCR con cebadores específicos (INVITROGEN ó Massachusetts, EE.UU.) para amplificar un fragmento del gen 18S ADNr (Tabla 8). Se utilizó ADN de una cepa de *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461) y *Naegleria fowleri* (Campana y col., 2017) como controles positivos. A todas las muestras se les realizó la Transformación Amebo Flagelar (TAF).

Tabla 8: Cebadores utilizados en PCR para la identificación de géneros.

Cebadores	Secuencia (5´-3´)	AVL	Tamaño amplicón
JDP1F	GGGCCAGATCGTTTACCGTGAA	<i>Acanthamoeba</i> spp.	423-551 pb
JDP2R	CTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA		
ITSTF	AACCTGCGTAGGGATCATT	<i>Naegleria</i> spp.	300-750 pb
ITSTR	TTTCCTCCCCTTATTAATAT		
Fow_A1	TTCCGAACCCACTCAATAAA	<i>Naegleria fowleri</i>	499 pb
Fow_A3	TTCCGAACCCTTAAACCTC		

Se realizó la mezcla de reacción con 2,5 μ l *buffer* (Promega), 0,5 μ l de una mezcla de DNTP (10mM de cada uno, Promega), 1,5 μ l (20 μ M) de cada cebador,

1,25 Utaq (Promega) y 5,0 μ l de ADN. Se llevó a 25 μ l de volumen final con agua libre de nucleasas (Biodynamics).

Se utilizó un termociclador IVEMA T18 para la amplificación. Las condiciones de reacción fueron: 95 °C durante 7 min, 45 ciclos (95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min), y una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Biodynamics) al 1,5 % con 5 μ l de GEL RED (BIOTIUM) en *buffer* de corrida TBE 1X (página 55). Por cada calle se cargaron 10 μ l del producto de la amplificación. Se efectuó la corrida electroforética en una cuba ENDURO LabNet (LabNet International Inc, EE.UU.) a 75 V durante 45 min.

El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con una escalera de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos. Argentina). Se visualizó el resultado de la electroforesis bajo luz UV con un transiluminador DyNA Light Dual LABNET. (Figura 16).

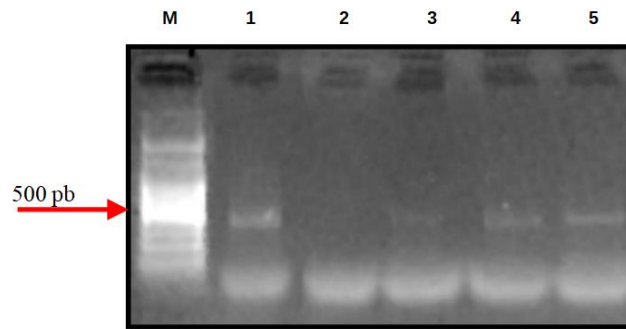


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % de los productos de amplificación específico para *Acanthamoeba* spp. Calles: M) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo 2) Control negativo, 3) Control positivo 1/1000, 4) Control positivo 1/100, 5) Control positivo 1/10.

Un resumen del procesado de las muestras para el estudio de las AVL en el ambiente ganadero se muestra en la Figura 17.

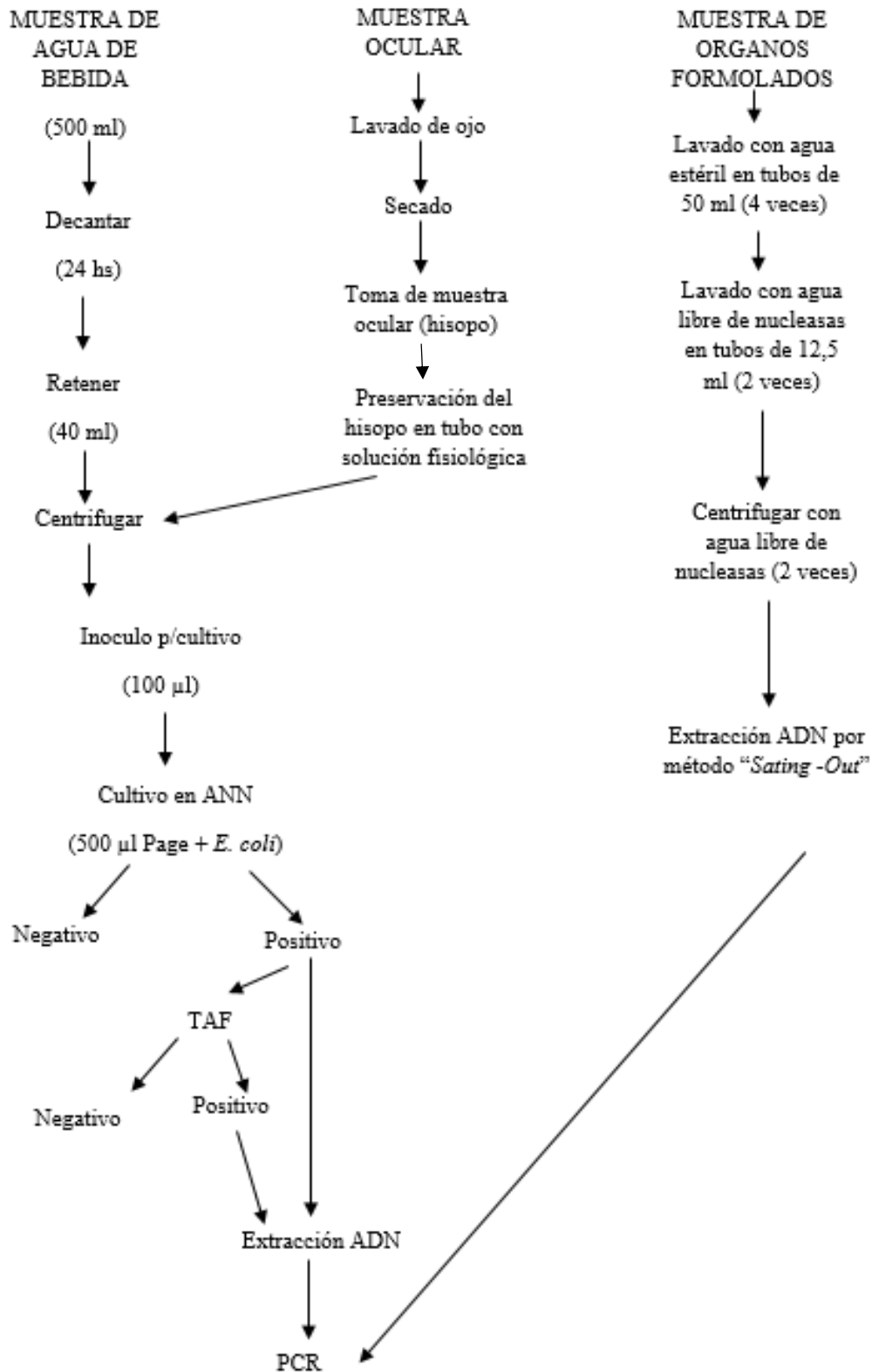


Figura 17: Diagrama de flujo de las muestras para el estudio de las AVL (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.).

Detección de especies del orden *Chlamydiales*.

Muestras de órganos parafinados provenientes de pérdidas reproductivas.

Se seleccionaron muestras de órganos incluidos en parafina provenientes de 203 terneros abortados, 4 terneros prematuros, 38 mortinatos y 6 pérdidas neonatales (N=251) para la realización de un estudio retrospectivo (Figura 18). La clasificación de las pérdidas reproductivas por su edad gestacional se basó en los criterios del Comité de Nomenclatura de Reproducción Bovina (Committee on Bovine Reproductive Nomenclature, 1972). Se consideró aborto a la expulsión de un feto entre los 42 y 260 días de gestación, parto prematuro a la eliminación del feto desde el día 260 de preñez hasta el final de la misma, mortinato a todo ternero nacido muerto (280 días) y pérdida neonatal al ternero muerto durante los primeros 28 días de vida.

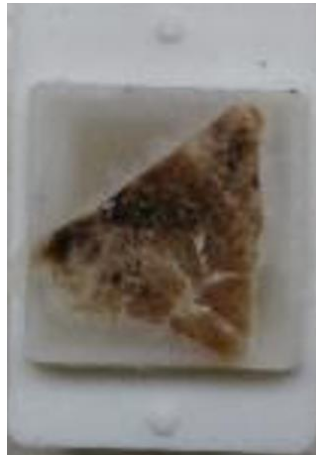


Figura 18: Muestra de hígado parafinado.

Se preparó por cada animal una única muestra (*pool*) con secciones de 50 μ m de tejido provenientes de cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón. La parafina se removió con 1,2 ml de xileno con una centrifugación a 10.000 g durante 5 min. El xileno se eliminó con dos ciclos de centrifugación con 1,2 ml de etanol a 10.000 g durante 5 min.

Las muestras sometidas a qPCR y microarray fueron procesadas según el protocolo propuesto por el Instituto Friedrich-Loeffler (Jena, Alemania).

La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Se añadieron 180 μ l de solución tampón ATL y 20 μ l de proteinasa K.
- Se homogeneizó en vórtex y se incubó a 56 ° C hasta la obtención del lisado.
- Se añadieron 200 μ l de solución tampón AL y se homogeneizó en vórtex 15 s.
- Se añadieron 200 μ l de etanol (96-100 %) y se homogeneizó en vórtex 15 s.
- Se colocó la mezcla en una columna de extracción.
- Se centrifugó a 8000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el líquido.
- Se añadieron 500 μ l de solución tampón AW1.
- Se centrifugó a 8000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el líquido.
- Se añadieron 500 μ l de solución tampón AW2.
- Se centrifugó a 15.000 g durante 3 min. Se descartó el líquido.
- Se transfirió la columna a un tubo estéril de 2 ml.
- Se añadieron 200 μ l de solución tampón AE para eluir.
- Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 8000 g durante 1 min. Se repitió este paso para obtener un rendimiento máximo.

Las muestras se sometieron a una qPCR (ABI 7500 Fast, Applied Biosystems, Singapur) con cebadores específicos para la amplificación de un fragmento de 111 pb del gen 23S del ARNr de la familia *Chlamydiaceae* (Tabla 9). Se utilizó el protocolo validado por el laboratorio de referencia de la OIE para clamidiosis (Ehrich y col., 2006). Se utilizó una cepa de *Chlamydia abortus* 09DC76 como control positivo y agua bidestilada estéril como control negativo.

Se realizó la mezcla de reacción para qPCR con 12,5 μ l de solución tampón 2X (TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), con 5 pmol μ l⁻¹ de cada primer y de la sonda (Microsynth, Balgach, Suiza) y 2,5 μ l de ADN. Se llevó a 25 μ l de volumen final con agua libre de nucleasas.

Se consideraron como positivos las muestras que presentaron un ciclo umbral (threshold point, Ct) menor o igual a 42,0.

Tabla 9: Cebadores utilizados para familia *Chlamydiaceae* dirigidos al gen 23S ARNr.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón
Ch23S-F	CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T	
Ch23S-R	ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC	111 pb
Ch23S-p	FAM/CT CAT CAT GC AAA AGG CAC GCC G/ BHQ	

Se utilizó el sistema de microarrays en tubo ArrayTube (Alere Technologies GmbH, Jena Alemania) para la determinación de especies. El chip de ADN incluyó sondas para *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. suis* y *C. psittaci*; *C. avium*, *C. muridarum*, *C. caviae*, *C. abortus*, *C. felis* y *C. gallinacea*. El chip dispone de cuatro controles positivos (sondas consenso) y un control interno (marcador de biotina). Se realizó una PCR de un fragmento del gen 23S ARNr utilizando los cebadores biotinilados según Borel y col. (2008) (Tabla 10). El resultado se leyó por un equipo específico (ATR-01 Array Tube Reader) y analizado por el software correspondiente (Iconoclust Software, versión 2.3).

Tabla 10: Cebadores biotinilados para la técnica de microarray.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
U23F-19	ATTGAMAGGCGAWGAAGGA
23R-22	biotin-GCYTACTAAGATGTTTCAGTTC

Determinación de anticuerpos séricos contra *Chlamydia abortus* en terneros, vaquillonas/vacas y toros.

La determinación del tamaño de muestra mínimo requerido para detectar presencia de anticuerpos contra *Chlamydia abortus* consideró el algoritmo propuesto por Thrusfield (2005) y una prevalencia estimada del 20 % (Rodríguez Fermepin y col, 1995), considerando un nivel de confianza de 95 % y un error del 5 %:

$$N = \frac{Z^2 \times p \times (q)}{e^2}$$

donde: Z = 1,96 (95 % de nivel de confianza)

p= 0,20 (Prevalencia estimada),

q=1-p (Complemento de la prevalencia referencial),

e=0,05 (Error máximo permisible).

$$N = \frac{1,96^2 \times 0,2 \times (1 - 0,2)}{0,05^2} = 246 \text{ bovinos}$$

Se seleccionaron animales al azar provenientes de lotes independientes de terneros, vaquillonas/vacas y toros provenientes de las regiones Centro y Este, período 2013-2015. Se individualizaron lotes de hembras con y sin problemas reproductivos. El muestreo de terneros se realizó conjuntamente con SENASA durante la vacunación antiaftósica de la categoría ñmenoresõ del 2015. El muestreo de toros se realizó previo al servicio.

Se extrajeron 5 cm³ de sangre de la vena de la cola, utilizando una aguja y jeringa por animal (medida 18Gx1 ¼ y jeringa de 10 cc) y se dejó coagular a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 500 g durante 15 min. Se extrajo el suero mediante pipeta Pasteur. Los sueros obtenidos se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Para evaluar la presencia de anticuerpos contra *Chlamydia abortus* se utilizó un equipo comercial de ELISA indirecto (*ID Screen C. abortus Indirect Multi-species*, IDvet ó Francia) según instrucciones del fabricante. Cada pocillo esta sensibilizado con un antígeno sintético específico (especificidad= 99,7 %; sensibilidad=100 %). El antígeno procede de una proteína de la membrana externa (en inglés *Major Outer Membrane Protein*, MOMP) para la reducción de reacciones no específicas (Pourquier y col., 2007).

Los sueros y los reactivos fueron estabilizados a temperatura ambiente (18°C) y agitados en vórtex 15s y:

- Se colocaron 90 μ l del diluyente 13 en cada pocillo.
- Se agregaron 10 μ l de cada muestra a analizar por pocillo.
- Se reservó un pocillo para adicionar 10 μ l de control positivo y otro para 10 μ l de control negativo, listos para usar incluidos en el equipo comercial (Figura 19).
- Se incubaron durante 45 min a 21 °C.
- Se vaciaron los pocillos y se lavaron 3 veces con 300 μ l de solución de lavado.
- Se diluyó el conjugado 10X a 1X con el diluyente 3.
- Se adicionaron 100 μ l de conjugado 1X a cada uno.
- Se incubaron durante 30 min a 21 °C.
- Se vaciaron los pocillos y se lavaron 3 veces con 300 μ l de solución de lavado.
- Se agregaron 100 μ l de solución de revelado por pocillo.
- Se incubaron durante 15 min a 21 °C en ausencia de luz.
- Se agregaron 100 μ l de solución de *stop* en todos los pocillos para detener la reacción.

Las lecturas se realizaron a una densidad óptica (DO) de 450 nm (STAT FAX 2100, EE.UU.). La diferencia de DO entre los controles negativos y positivos se valido para $\times 0,3$ unidades de absorbancia. Se consideró la negatividad o positividad de una muestra a partir de la siguiente fórmula:

$$S/P\% = \frac{DO_m}{DO_p} \times 100$$

Donde DO_m = densidad óptica de la muestra en estudio

DO_p = densidad óptica del control positivo

Se consideró suero positivo cuando el valor S/P% fue $\times 60\%$ (Figura 19).

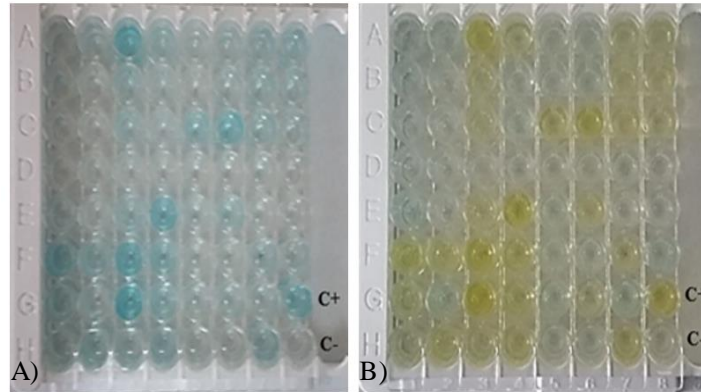


Figura 19: Placas de ELISA. A) reacción sin solución de stop. B) reacción con solución de stop. Control positivo (C+) y control negativo (C-).

Muestras oculares.

Se tomaron las muestras oculares como se describió en la página 27. Posterior a la centrifugación, para el cultivo de AVL, se extrajo el ADN según Sachse y Hotzel (2003):

- Se recolectó una alícuota de 200 μ l del fondo (sedimento) y se colocó en un tubo estéril de 1,5 ml.
- Se agregó 500 μ l de un *buffer* de lisis (página 54).
- Se agitó con vórtex (ThermoLyne-SYBRON, EE.UU.) durante 1 min.
- Se centrifugó a 15.000 g durante 15 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió el precipitado (sedimento) en 50 μ l *buffer* de lisis (página 54).
- Se agregó 20 μ l de proteínasa *K* y se incubó a 60 °C durante 2 h.
- Se inactivó la proteínasa *K* por calentamiento a 97 °C durante 15 min.
- Se centrifugó a 15.000 g durante 5 min para eliminar restos
- Se usó 5 μ l de sobrenadante como muestra de ADN para la PCR.

Muestras de ADN de Amebas de Vida Libre para el estudio de endosimbiontes.

De la extracción de ADN que se realizó para las AVL (descrita en página 29), se utilizaron 5 μ l para el estudio molecular del orden *Chlamydiales*.

Muestras de cérvix.

Se tomaron muestras a nivel del segundo anillo del cérvix de 84 hembras con problemas reproductivos (abortadas y vacías) y 20 vaquillonas vírgenes para obtener mayor cantidad de células y la mínima cantidad de moco (Figura 20). Se siguió el siguiente protocolo:

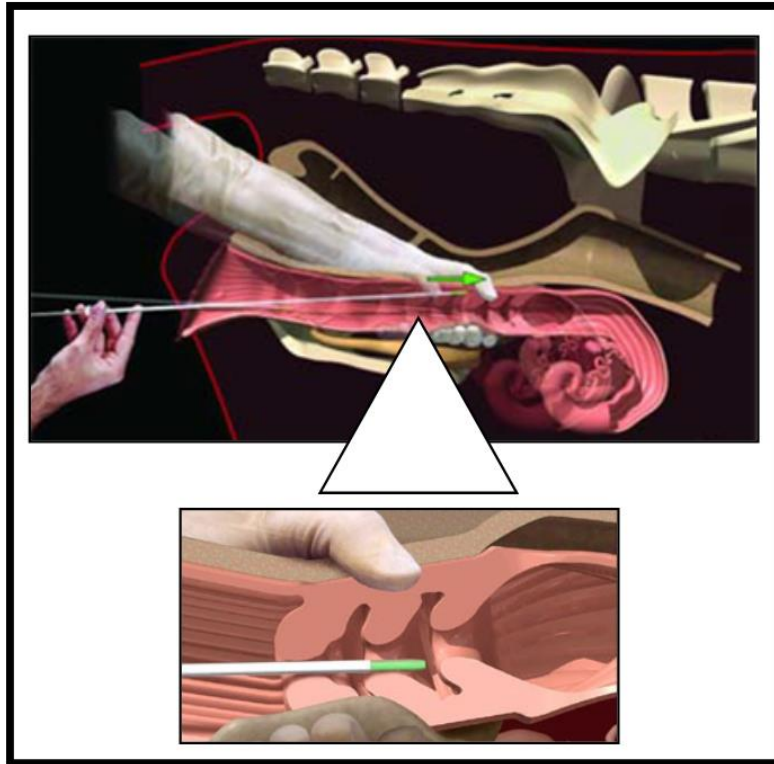


Figura 20: Esquema del lugar de muestreo a nivel de cérvix.

- Se limpió la entrada de la vulva con papel absorbente para eliminar materia fecal.
- Se separaron los labios y se introdujo un dispositivo metálico de 45 cm de largo con una vaina de Cassou (descartable) hasta el segundo anillo del cérvix.
- Se rasparon las paredes laterales con el dispositivo y se realizó una aspiración.
- Se extrajo el dispositivo del segundo anillo y a la altura del primer anillo se aspiró nuevamente para generar un tapón con el moco cérvico vaginal (Figura 21).
- Se descartó la última porción recolectada (moco) en un papel y el resto de la muestra se colocó en un tubo con medio 2-SP (página 53) hasta su procesamiento en el laboratorio.

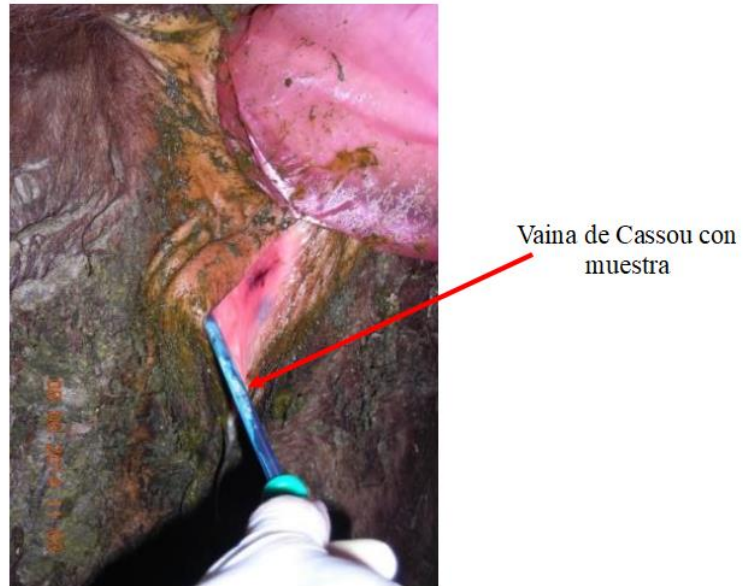


Figura 21: Muestreo de cérvix.

Todas las muestras presentaron una proporción de moco, por lo cual se sonicaron mediante diez pulsos de 5 s cada uno con una potencia del 75 % (sonicador SONIC Vibra Cell, Model CV 18, Newton, EE.UU.) (Figura 22).

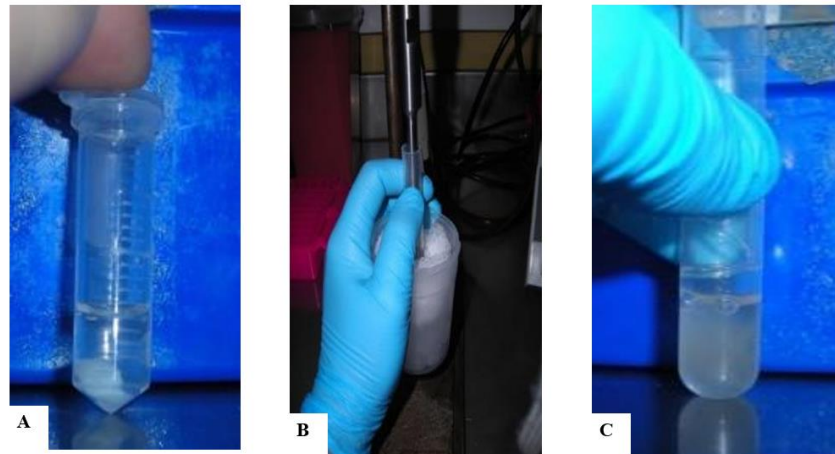


Figura 22: Procesamiento de las muestras de cérvix por sonicado; A) muestra de cérvix con moco, B) sonicado, C) muestra acondicionada para extracción de ADN.

Muestras de hembras donadoras de embriones.

Se introdujo un catéter con estilite acerado para llegar a los cuernos del útero. Por diferencia de presión se lavaron con un líquido comercial (PBS Dulbecco, Cell-tonis, Argentina) + suero fetal bovino inactivado por calor + antibióticos/antimicóticos (GIBCO). El fluido cayó por gravedad y se recolectó en un recipiente estéril con filtros para retener ovocitos y embriones de 12 vacas donadoras. Se colectaron de cada animal entre 500 y 900 ml de fluido residual con células uterinas en suspensión. Este medio de lavado se dejó reposar 8 horas en heladera y se centrifugó a 500 g durante 10 min hasta obtener un sedimento.

Muestras de esmegma prepucial de toros.

Las muestras prepuciales de 100 toros en servicio natural y 50 toros vírgenes de cabaña se obtuvieron mediante 20 a 30 movimientos en sentido anteroposterior con raspador metálico de 70 cm con extremo ranurado (Terzolo y col., 1992). El material obtenido se descargó en tubos con medio 2-SP (página 54) hasta su procesamiento en el laboratorio (Figura 23).



Figura 23: Obtención de muestras prepuciales con raspador metálico.

Muestras de semen de toros.

La extracción de semen se realizó en 50 toros de cabaña según indica el protocolo de bienestar animal. Se recortaron los pelos del orificio prepucial, se lavó y se secó cuidadosamente toda el área. Se limpió el recto para eliminar las heces, se levantó la cola del toro y se introdujo el electro-eyaculador (ePORVARC) lubricado. Inicialmente se realizó una pequeña estimulación hasta que el macho demostró una mínima respuesta (exteriorización del pene). No se utilizó el fluido preseminal (incolore) ya que no contiene células. Se recolectaron 2,5 ml de eyaculado (color cremoso u opalescente) de cada animal y se conservaron en solución 2-SP a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio (Figura 24).



Figura 24: Obtención muestras de semen. A) Introducción rectal del electroeyaculador, B) Fluido seminal descartado.

El lisado de la muestra se realizó con dos pasajes por aguja de 25G (tuberculina) y se sonicaron mediante tres pulsos de 5 s cada uno con una potencia del 80 % (sonicador SONIC Vibra Cell, Model CV 18, Newton, EE.UU.)

Muestra de órganos de fetos no abortados de frigoríficos.

Se obtuvieron muestras de 50 fetos no abortados de frigorífico (vacas preñadas destinadas a faena). Se determinó el sexo y peso; la edad gestacional se calculó a partir de la longitud del eje corona ó base de la cola (Winters y col., 1942; Thomsen 1974) (Figura 25). Se recolectaron por feto 1,5 gramos de tejido provenientes de hígado, pulmón, corazón y riñón en tubos estériles con medio 2-SP y conservados a -20 °C. Cada muestra se trituró individualmente en mortero y se reservaron 400 µl para la extracción de ADN.

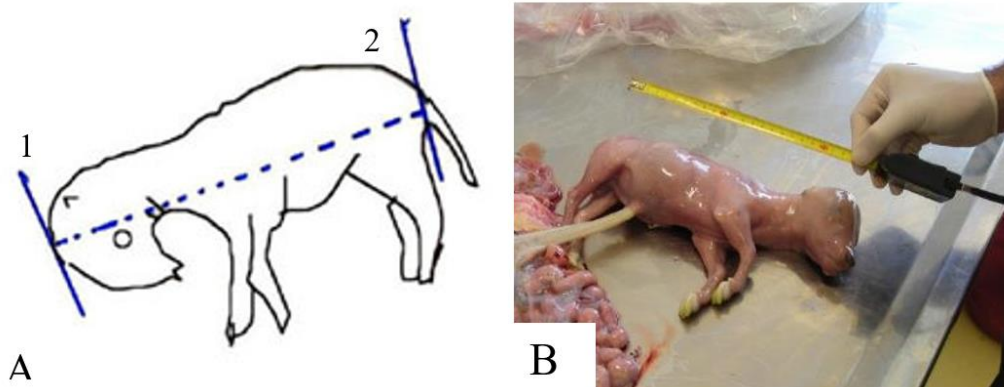


Figura 25: Determinación de edad gestacional. A) Distancia corona ó base de la cola, B) Feto de frigorífico.

Muestra de órganos de fetos abortados formolados.

La metodología para este punto se explicó en la página 29.

Extracción de ADN de las muestras de cérvix, lavado, esmegma, semen y órganos de fetos no abortados.

Se utilizó un kit de extracción de ADN comercial (Quick Tissue/Culture Cells GENOMIC DNA EXTRACTION-DONGSHENG BIOTECH-Montebio-China), siguiendo las instrucciones del fabricante:

-Se colocaron 200 µl de muestra en un tubo estéril de 1,5 ml.

- Se añadieron 200 µl de solución tampón DS y se agitó en vórtex durante 30 s para re suspender las células.
- Se agregaron 20 µl de proteinasa *K* y 220 µl de solución tampón MS. Se agitó en vórtex 10 s y se incubó a 65 °C durante 10 min para obtener una solución homogénea.
- Se añadieron 220 µl de etanol (96-100 %) y se agitó en vórtex 10 s.
- Se colocó la muestra en la columna de extracción. Se centrifugó a 15.000 g durante 1 min y se descartó el líquido filtrado
- Se lavó la columna de extracción con 500 µl de solución tampón PS y se centrifugó durante 1 min a 15.000 g. Se descartó el filtrado.
- Se añadieron 500 µl de solución tampón PE y se centrifugó durante 1 min a 15.000 g. Se descartó el filtrado (se repitió este paso una vez más).
- Se centrifugó durante 3 min a 15.000 g para secar la membrana de la columna de extracción. Se descartó el filtrado.
- Se colocó la columna de extracción de ADN en un tubo estéril de 1,5 ml y se agregó 70 µl de agua libre de nucleasas (Biodynamics) precalentada a 65 °C directamente sobre la membrana para eluir el ADN.
- Se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó durante 2 min a 15.000 g.
- Se conservó el ADN a -20 °C.

Extracción de ADN por *Salting - Out* de órganos de fetos abortados formolados.

Esta metodología se explicó en la página 30.

Detección del orden *Chlamydiales*.

Las muestras fueron ensayadas en una reacción de PCR con cebadores específicos (INVITROGEN ó Massachusetts, EE.UU.) (Tabla 11) para amplificar un fragmento de 293-298 pb del gen 16S del ARNr del orden *Chlamydiales* (posiciones 33-326) (Bodetti y col., 2003). Como control positivo se utilizó una muestra liofilizada de *Chlamydia trachomatis* (Linfogranuloma venéreo, LGV).

Tabla 11: Cebadores utilizados para la detección específica del orden *Chlamydiales*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón
16SIGF	CGG CGT GGA TGA GGC AT	293-298 pb
16SIGR	TCA GTC CCA GTG TTG G	

Se realizó la mezcla de reacción con 2,5 µl *buffer* (Promega), 0,5µl de una mezcla de DNTP (10mM de cada uno, Promega), 1,5 µl (20 µM) de cada cebador, 1,25 Utaq (Promega) y 5,0 µl de ADN. Se llevó a 25 µl de volumen final con agua libre de nucleasas (Biodynamics).

Se utilizó un termociclador IVEMA T18 para la amplificación. Las condiciones de reacción fueron: 95 °C durante 15 min, 45 ciclos (94 °C durante 30 s; 51 °C durante 30 s; 72 °C durante 2 min); y una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Biodynamics) al 2 % con 5 µl de GEL RED (BIOTIUM) en *buffer* de corrida TBE 1X (página 55). Por cada calle se cargaron 10µl del producto de la amplificación. Se efectuó la la corrida electroforética en una cuba ENDURO LabNet (LabNet International Inc, EE.UU.) a 80 V durante 60 min.

El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con una escalera de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos. Argentina). Se visualizó el resultado de la electroforesis bajo luz UV con un transiluminador DyNA Light Dual LABNET. (Figura 26).

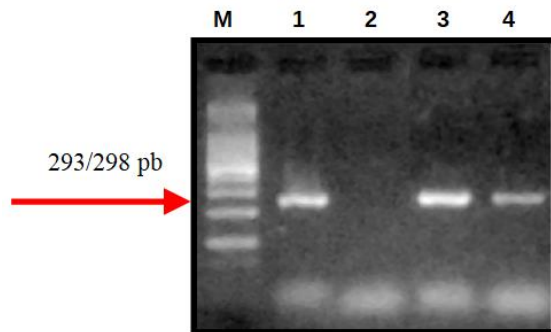


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa 2 % de los productos de amplificación específico para orden *Chlamydiales*. Calles: M) Marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo. 2) Control negativo.3) Control positivo 1/1000. 4) Control positivo 1/10000.

Detección de familia *Chlamydiaceae* por PCR.

Las muestras fueron sometidas a una PCR con cebadores específicos (INVITROGEN ó Massachusetts, EE.UU.) para amplificar un fragmento de 230 pb del gen 16S del ARNr según el protocolo de Condon y Oakey (2007) (Tabla 12). Como control positivo se utilizó una muestra liofilizada de *Chlamydia trachomatis* (Linfo granuloma venéreo, LGV).

Tabla 12: Cebadores utilizados en PCR para la identificación de familia *Chlamydiaceae*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón
CHYF-1	GCCTAC CGG CTT ACC AAC	230 pb
CHYR-2	GGC GCA ATG ATT CTC GAT	

Se realizó la mezcla de reacción con 2,5 µl *buffer* (Promega), 0,5µl de una mezcla de DNTP (10mM de cada uno, Promega), 1,5 µl (20 µM) de cada cebador, 1,25 Utaq (Promega) y 5,0 µl de ADN. Se llevó a 25 µl de volumen final con agua libre de nucleasas (Biodynamics).

Se utilizó un termociclador IVEMA T18 para la amplificación. Las condiciones de reacción fueron: 95 °C durante 75 s, 35 ciclos (94 °C durante 45 s; 56 °C durante 45 s; 72 °C durante 45 s), y una extensión final de 72 °C durante 1 min.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Biodynamics) al 2 % con 5 µl de GEL RED (BIOTIUM) en *buffer* de corrida TBE 1X (página 55). Por cada calle se cargaron 10µl del producto de la amplificación. Se efectuó la la corrida electroforética en una cuba ENDURO LabNet (LabNet International Inc, EE.UU.) a 80 V durante 65 min.

El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con una escalera de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos. Argentina). Se visualizó el resultado de la electroforesis bajo luz UV con un transiluminador DyNA Light Dual LABNET. (Figura 27).

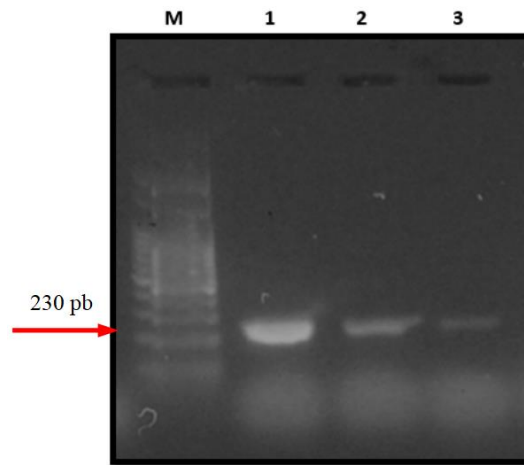


Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa 2 % de los productos de amplificación específico para familia *Chlamydiaceae*. Calles: M) Marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo *Chlamydia trachomatis* (Linfogranuloma venéreo, LGV). 2) Control positivo 1/1000, 3) Control positivo 1/10000.

Secuenciación de muestras.

Se purificaron y concentraron los productos obtenidos por PCR con un kit comercial (DONGSHENG BIOTECH - China, Montebio) según instrucciones del fabricante:

- Se transfirió el producto de PCR a un tubo estéril de 1,5 ml y se añadió un volumen igual de solución de unión (Binding Buffer, BD).
- Se transfirió la mezcla del punto anterior a una columna de purificación y se incubó 2 min a temperatura ambiente.
- Se centrifugó durante 1 min a 10.000 g y se descartó el líquido.
- Se añadieron 500 μ l de solución de lavado (Wash Buffer, PE) a la columna.
- Se centrifugó durante 1 min a 10.000 g y se descartó el líquido (dos veces)
- Se centrifugó la columna vacía durante 3 min para eliminar por completo cualquier residuo de solución de lavado.
- Se descartó el líquido y se centrifugó la columna durante 1 min con la tapa abierta para permitir la evaporación de restos de solución de lavado.
- Se transfirió la columna a un tubo estéril de 1,5 ml y se añadieron 70 μ l de agua libre de nucleasas precalentada a 60 °C (Biodynamics) para colectar el ADN.
- Se incubó 2 min a temperatura ambiente.

- Se centrifugó 1 min a 10.000 g, se desechó la columna y se conservó el ADN eluido a -20 °C.

- Se enviaron las muestras a la Unidad Genómica -Instituto de Biotecnología-CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires) para secuenciación por electroforesis capilar.

El resultado se cotejó con secuencias homólogas depositadas en Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para buscar secuencias similares referenciadas.

Un resumen del procesado de las muestras para el estudio del orden *Chlamydiales* en el ambiente ganadero se observa en la Figura 28.

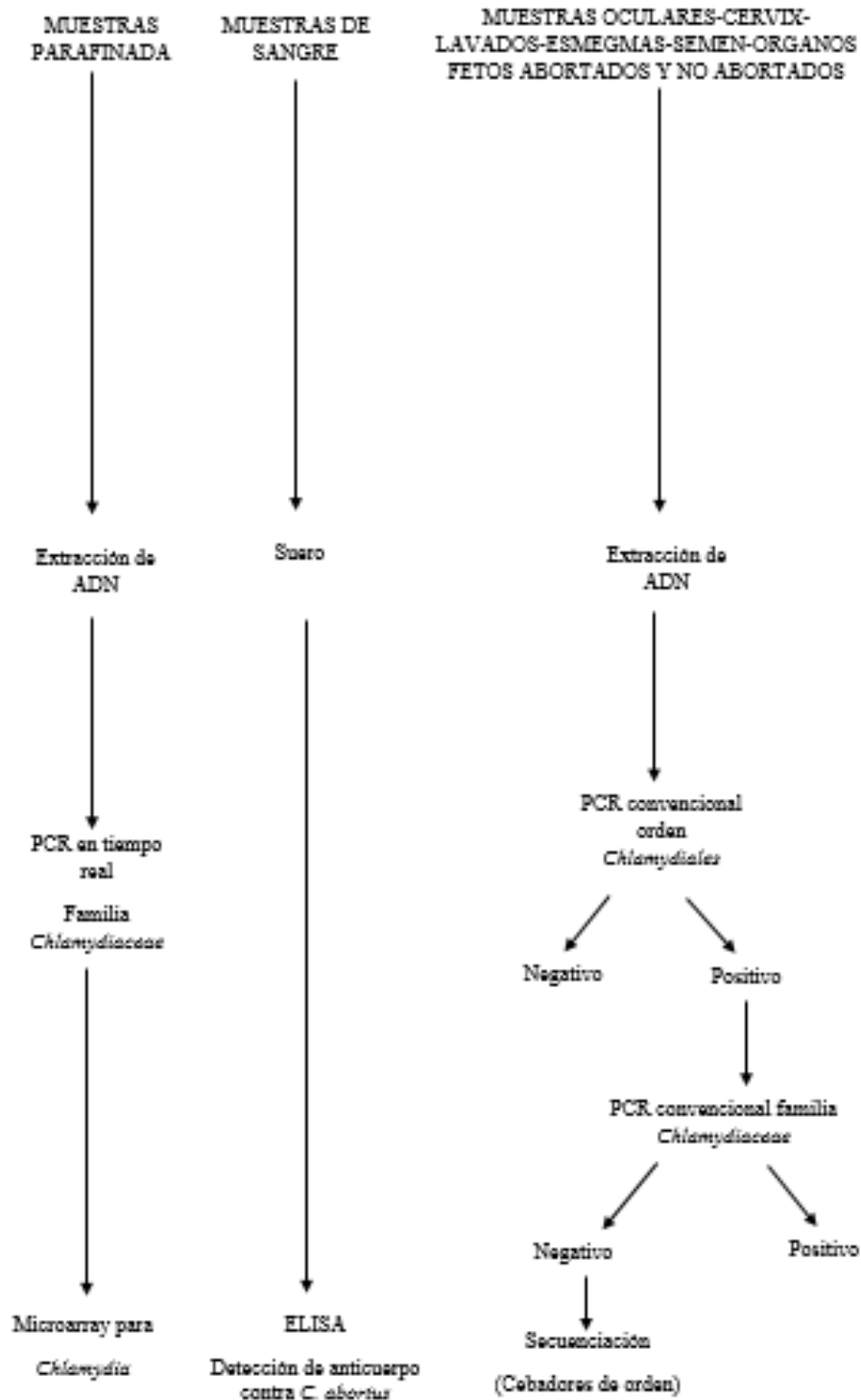


Figura 28: Diagrama de flujo de las muestras para el estudio del orden *Chlamydiales*.

Cuantificación del ADN.

Se cuantificó cantidad ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) y calidad (relación 260/280 de absorbancia) sobre una alícuota de 1 μl por muestra mediante espectrofotometría (DeNovix DS 11-Spectrophotometer).

Análisis estadísticos generales.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Epi Info versión 7 (CDC, Atlanta). Se compararon las prevalencias entre categorías y lotes mediante un test χ^2 ($\alpha=0,05$) y se calcularon sus intervalos de confianza (IC) al 95 %.

Para determinar la prevalencia de anticuerpos séricos contra *Chlamydia abortus* respecto de trabajos publicados en otros países, se ajustaron las observaciones mediante una prueba de diferencias simultáneas para prevalencias (Putt y col., 1988). La frecuencia esperada de, por ejemplo, número de animales no positivos (fila i) en La Pampa (columna j), se obtuvo multiplicando el total de la i -ésima fila (f_i), por el total de la j -ésima columna (c_j), y dividiendo el producto por el total general (N):

$$\frac{f_i \times c_j}{N}$$

Luego se estimó el desvío de la frecuencia observada (f_O) respecto a la frecuencia esperada (f_E) como:

$$\frac{(f_O - f_E)^2}{f_E}$$

Se comparó el gran total de esta tabla de desviaciones respecto el valor de χ^2 correspondiente a los grados de libertad de la tabla analizada. Se calcularon considerando filas (f) y columnas (c) de la tabla:

$$gl = (f - 1) \times (c - 1)$$

Este resultado permite identificar diferencias significativas entre las prevalencias comparadas.

Por medio de un ajuste indirecto, se compararon las tasas de circulación de anticuerpos contra *C. abortus* en lotes infectados (L_i) y la tasa de animales positivos por lote infectado (A_p/L_i) sobre una población teórica de 100 lotes con 100 cabezas

cada uno (Thrusfield, 2005). Se consideraron estudios realizados con técnicas similares (ELISA).

Bienestar animal.

Los procedimientos realizados en los animales se desarrollaron bajo las normas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación implementado por INTA Castelar (CICUAE INTA-CICVyA), ya que al momento de elaboración de esta tesis no se encontraba conformada la CICUAE en el Centro regional INTA La Pampa- San Luis.

Soluciones y reactivos utilizados.

Solución de Page.

NaCl (cloruro de sodio) 120 mg

MgSO₄·7H₂O (sulfato de magnesio heptahidratado) 0.4 mg.

CaCl₂·2H₂O (cloruro de calcio dihidratado) 0.4 mg.

Na₂HPO₄ (fosfato disódico) 0.142 mg.

KH₂PO₄ (fosfato de potasio) 0.136 mg.

H₂O destilada 1000 ml.

pH de la solución de Page: 6.8-7

Agar No Nutritivo (ANN): para preparar el ANN 1,5 % (15 gramos en 1000 ml) de Agar-Agar Britania, en solución de Page. El medio se calentó a baño María hasta ebullición, se fraccionó de acuerdo a su uso y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Cepas de *Escherichia coli*: se utilizaron cepas viables aisladas en placas de Agar Sangre. Desde esta placa se tomó una ansada y se suspendió en un tubo con solución de Page estéril. Para perpetuar la cepa se realizaron repiques en Agar Sangre que se conservaron en heladera.

Solución fisiológica estéril.

NaCl í í í í í í í í í í í í í í í í í 8,5 g.

Agua destilada í í í í í í í í í í í í í í í í í ..1000 ml (Autoclavar).

Medio de transporte y almacenamiento para *Chlamydia*.

Sacarosa/fosfato o 2-SP (0.2M sacarosa y 0.02M phosphate, en inglés).

Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) í í í í í í í í í í 2,01 g.

Fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) í í í í í ...1,01 g.

Sacarosa í í í í í í í í í í í í í í í í í ...68,46 g.

Suero fetal bovino descomplementado í í í í í 20,00 ml.

Gentamicina estéril í í í í í í í í í í í í í í í í í ..40 mg/ml.

Agua destilada csp í í í í í í í í í í í í í í í í í 1000 ml.

Se disolvieron las dos sales de fosfato en 300 ml de agua destilada y aparte la sacarosa en 500 ml de agua destilada. Se mezclaron ambas soluciones y se completó con agua destilada hasta llegar a 900 ml. Ajustar a pH 7,2- 7,4. Se agregó agua destilada hasta llegar a 980 ml. Se esterilizó el medio a 121 °C durante 15 min. En forma estéril se agregó 20 ml de suero fetal bovino y 125 µl de gentamicina. Se adicionaron Vancomicina 100 µm/ml y Anfotericina B 25 µm/ml Todos los medios fueron sometidos a control de calidad, por lo cual se dejaron: 1) dos tubos con medio en estufa a 37 °C durante 24 horas para verificar contaminación. 2) se sembraron en placa de agar sangre pequeñas alícuotas de medio las cuales permanecieron en estufa a 37 °C durante 24 horas para verificar contaminación. Se fraccionaron 5 ml en tubos de transporte. Se conservaron a -20°C hasta su uso.

Buffer de lisis UNSET (Para 100 ml de solución).

8M urea í í í í í í í í í ..48,05 g

2 % SDS (calor para disolver) í í .2,00 g

Se disolvieron en 84,5 ml de agua destilada la urea y el SDS, luego se se agregó:

0,15M NaCl í í í í í í í í .5 ml

0,001M EDTA í í í í í í í í .0,05 ml

0,1M Tris pH 7,5 í í í í í í í í 10,00 ml

Agua csp í í í í í í í í 100 ml

Buffer de lisis para la muestra ocular.

100mM Tris-HCl (pH 8.5) y

0,05 % (v/v) de Tween 20

Solución (pH 8) proteinasa K *Salting ó Out*.

1 M NaCl í í í í í í í í .10 ml

1 M Tris-HCl í í í í í í í í 10 ml

0,5 M EDTA í í í í í í í í .10 ml

10 % SDS í í í í í í í í .20 ml

100 g/ml proteinasa K í í ..1 ml

Agua csp í í í í í í í í ..100 ml

La solución se prepara y se autoclava sin proteinasa K.

Solución de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1).

Fenolí í í í í í í í í í í í í 50 ml.

Cloroformoí í í í í í í í í í í ..48 ml.

Alcohol isoamílicoí í í í í í í í2 ml.

3M NaCl.

NaClí í í í í í í í í í í í í .17, 53 g/100 ml (precipitado en solución)

Disolver en 80 ml de agua destilada y llevar a 100 ml (Autoclavar).

EDTA 0,5M.

1M Tris pH 7,5

Tris Baseí í í í í í í í í í ... 12,11 g/100 ml (pH 7,5).

Disolver en 80 ml de agua destilada, ajustar pH con HCl y llevar a 100 ml (Autoclavar).

Buffer Tris (10X) solución madre.

Trisí í í í í í í í í í í í í í 109 g.

Ácido bóricoí í í í í í í í í í í í 55 g.

EDTAí í í í í í í í í í í í í í 4,65 g.

Agua destiladaí í í í í í í í í í .1000 ml.

Disolver en 950 ml de agua destilada ajustar pH con HCl y llevar a 1000ml (Autoclavar).

Buffer TBE de trabajo (corrida) 1X.

TBE 10Xí í í í í í í í í í100 ml.

Agua destiladaí í í í í í í í í í ..900 ml.




RESULTADOS Y DISCUSION

Presencia de Amebas de Vida Libre en agua destinada a consumo ganadero.

Se determinó la presencia de AVL en el 83,07 % de los sitios (54/65) analizados. El diámetro mayor promedio de los trofozoítos fue de $13,7 \mu\text{m} \pm 5,8 \mu\text{m}$ y el menor fue de $9,9 \mu\text{m} \pm 3,3 \mu\text{m}$ (N=3240) (Figura 29).





La proporción de AVL con acantopodios y lobopodios fue similar. No se observó presencia de prolongación citoplasmática en el restante 14,00 %.

Tabla 13: Proporción de morfologías de trofozoítos halladas en AVL aisladas de agua para consumo ganadero.

Trofozoitos		%
Acantopodios		44
Lobopodios		42
Sin prolongación citoplasmática evidente		14

Los quistes presentaron un diámetro mayor promedio de $10 \mu\text{m} \pm 3,2 \mu\text{m}$ y el menor de $9,6 \mu\text{m} \pm 2,9 \mu\text{m}$ (N=3240). El 99,5 % presentó doble pared con diferentes morfologías (Tabla 14). Solo el 0,5 % no presentó endoquiste.

Tabla 14: Proporción de morfologías de quistes halladas en AVL aisladas de agua para consumo ganadero.

Quistes		%
Triangular		1
Estrellado		12
Poligonal		28
Redondo		59

El género *Acanthamoeba* spp. se identificó por morfología en el 24,07 % (13/54) de las muestras (Figura 29). Se confirmó su presencia por PCR utilizando los cebadores específicos JDP1/JDP2 (Figura 30).

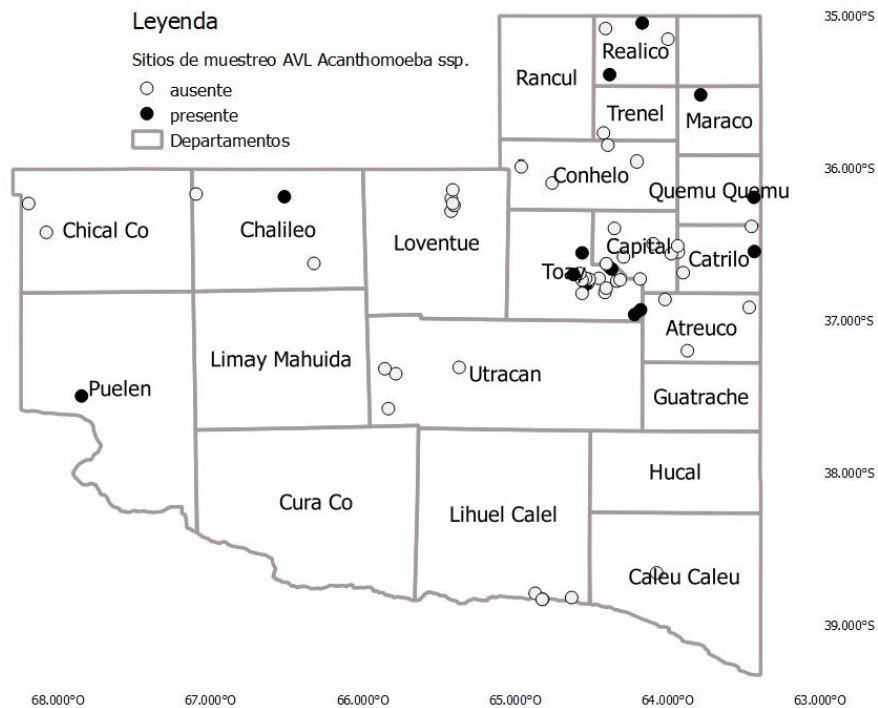


Figura 29: Localización de aguadas muestreadas para identificar presencia de AVL (N=65).

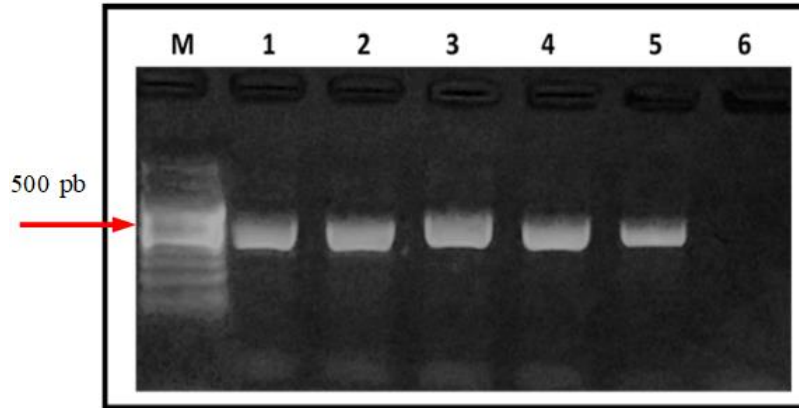


Figura 30: Identificación de *Acanthamoeba* spp. por PCR, cebadores JDP1/JDP2. M) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461). 2, 3, 4 y 5) Muestras positivas de agua para consumo ganadero. 6) Control negativo.

La Transformación Amebo Flagelar resultó positiva en un cultivo (Figura 31). Las PCR específicas para el género *Naegleria* spp. resultó negativa. La caracterización molecular posterior, indicó que se trataba de un protozoo perteneciente a la familia Vahlkampfiidae. Se utilizaron cebadores específicos JITSTF/ JITSTR (De Jonckheere, 1998, De Jonckheere, 2004; De Jonckheere y Brown, 2005). La mezcla de reacción para PCR y la visualización de los productos fue descrita en la página 35.

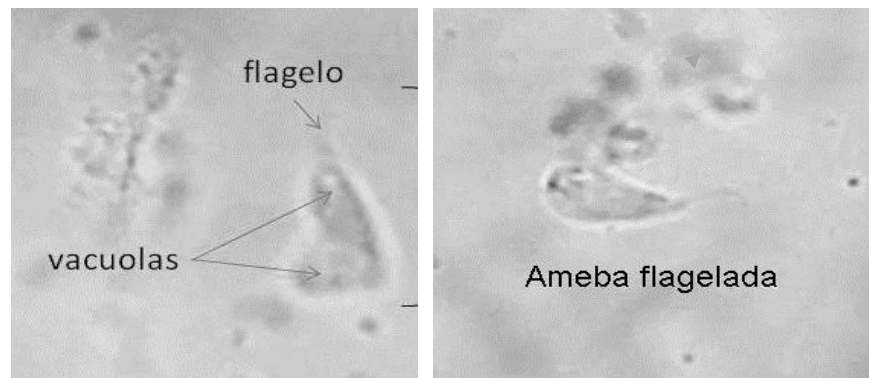


Figura 31: Forma flagelada hallada en un cultivo de ANN después de realizar la Transformación Ameboflagelar. Las flechas indican el flagelo y las vacuolas.

En la Tabla 15 se resumen los resultados hallados por sitio de muestreo.

Tabla 15: Ubicación espacial de sitios muestreados y determinación de presencia (+) o ausencia (-) de AVL por medio de cultivo en placa con ágar no nutritivo (ANN), transformación amebo flagelar (TAF) y PCR del género *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.

N°	Código	Lat.S	Long.O	ANN	TAF	PCR	
						<i>Acanthamoeba</i>	<i>Naegleria</i>
1	HLP	36,178	66,520	+	-	+	-
2	OF	35,516	63,785	+	+	+	-
3	LV	36,310	62,203	+	-	+	-
4	IRU	36,394	62,184	+	-	+	-
5	LP DG	36,921	64,180	+	-	+	-
6	DT	36,190	65,423	-	-	-	-
7	ESC-Agro	36,133	65,414	+	-	-	-
8	Verg_LF	36,255	68,466	+	-	-	-
9	JL	36,273	65,425	+	-	-	-
10	DJ	36,235	65,406	+	-	-	-
11	CM	36,222	65,414	+	-	-	-
12	Plu	36,160	67,093	+	-	-	-
13	Pcer	37,487	67,846	+	-	+	-
14	PmaMo	36,412	68,077	+	-	-	-
15	HR-3	35,846	64,395	+	-	-	-
16	HR-1	35,950	64,204	-	-	-	-
17	Gir	36,644	64,381	+	-	-	-
18	Cu	36,620	64,404	+	-	-	-
19	Ita	36,732	64,336	+	-	-	-
20	Lac	36,718	64,183	+	-	-	-
21	Cmart	34,756	64,169	+	-	+	-
22	MZ	36,653	64,370	+	-	+	-
23	Gz Mz	36,574	64,292	+	-	-	-
24	Rolr	36,618	64,405	+	-	-	-
25	Agro_ST	36,386	64,352	-	-	-	-
26	Ed-Mz	36,714	64,453	+	-	-	-
27	Can-tti	36,747	64,526	+	-	-	-
28	CV	36,754	64,540	+	-	+	-
29	Mchio	36,720	64,517	+	-	-	-
30	PPri	36,715	64,540	+	-	-	-
31	El-Sos	36,726	64,564	-	-	-	-
32	Abar	36,813	64,564	-	-	-	-
33	Berh	36,682	64,569	+	-	-	-
34	DJ-Pund	36,547	64,564	+	-	+	-
35	LM-Zap	36,689	64,621	+	-	+	-
36	IN-Angu	36,541	63,932	-	-	-	-

Tabla 15: Continuación

N°	Código	Lat.S	Long.O	ANN	TAF	PCR	
						<i>Acanthamoeba</i>	<i>Naegleria</i>
37	MONAV	35,080	64,410	+	-	-	-
*38	L-INTA	36,553	63,978	+	-	-	-
39	AE-CP	37,570	65,837	+	-	-	-
40	Chacha-IN	37,341	65,788	+	-	-	-
41	LA-Mont	36,952	64,219	+	-	+	-
42	Bald-Bich	35,766	64,423	+	-	-	-
43	Igles	35,383	64,383	+	-	+	-
44	VA	37,190	63,872	-	-	-	-
45	PZ	36,501	63,936	+	-	-	-
46	BLAn	36,853	64,019	+	-	-	-
47	Lpalo	36,777	63,370	+	-	-	-
48	CIN	36,677	63,900	+	-	-	-
49	HR-99	36,088	64,761	-	-	-	-
50	LR_La PAST	36,616	66,326	-	-	-	-
*51	PI-M1	38,783	64,872	-	-	-	-
*52	PI- M2	38,822	64,823	+	-	-	-
*53	PI-M3	38,823	64,826	+	-	-	-
*54	PI-M4	38,811	64,633	+	-	-	-
*55	PI-M5	38,649	64,074	-	-	-	-
*56	LJUA	37,299	65,372	+	-	-	-
*57	Cuen_MR	36,807	64,414	+	-	-	-
58	Pamp-MIA	36,724	64,314	+	-	-	-
59	PN-	36,778	64,406	+	-	-	-
60	TLAG	34,482	64,000	+	-	-	-
61	D-TERE	35,150	64,000	+	-	-	-
62	LA-ISAB	35,982	64,964	+	-	-	-
63	EL-MIST	36,405	63,355	+	-	-	-
64	GALL	36,487	64,098	+	-	-	-
65	LA-LAUR	37,308	65,860	+	-	-	-

*Aguadas naturales

De las 13 muestras cultivadas con presencia de ADN de *Acanthamoeba* spp., seis no se desenquistaron. Las siete restantes fueron secuenciadas a partir del gen 18S del ADNr. Se identificaron cinco aislamientos como T4 (HLP, OF, LV, IRU, CV), un aislamiento como T5 (LP-DG) y otro como T15 (MZ) (ANEXO I).

Presencia de Amebas de Vida Libre en ojos con y sin sintomatología de queratoconjuntivitis.

Todos los cultivos de AVL realizados a partir de las muestras oculares resultaron negativos. No se observaron quistes y durante los 15 días de cultivo no se desarrollaron trofozoítos.

Presencia de Amebas de Vida Libre en fetos abortados.

El 95 % de las muestras fijadas en formol correspondieron a abortos entre 4 y 8 meses (Figura 32).

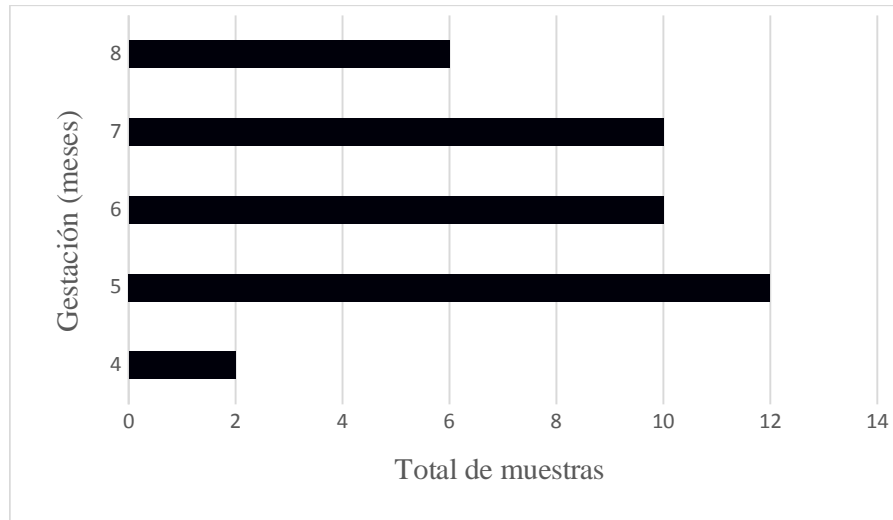


Figura 32: Cantidad de muestras estudiada según los meses de gestación.

Se logró extraer como mínimo 100 ng/ μ l de ADN con pureza A260/A280 entre 1,52 y 1,86 valores adecuados para la amplificación por PCR. El rango del patrón electroforético fue de 2000 pb a 100 pb. El ADN se tiñó de manera homogénea, con una intensidad más fuerte en el frente de la corrida, lo que sugiere la predominancia de ADN de bajo peso molecular (Figura 33).

En las muestras estudiadas no se encontró evidencia de ADN por la técnica de PCR para *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp.

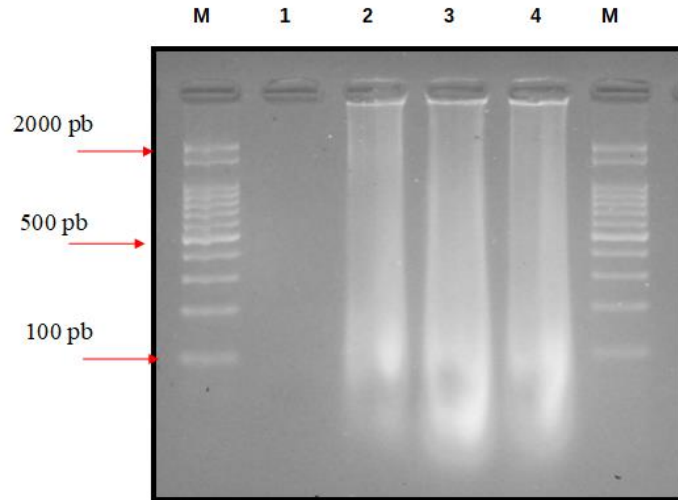


Figura 33: Patrón electroforético de ADN obtenido en gel de agarosa al 1 % obtenido por el método de extracción utilizado en esta tesis. Calles M) Marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Agua calidad molecular. 2) Muestras de hígado. 3) Muestra de corazón. 4) Muestra de pulmón.

Discusión.

Las AVL se encontraron en todos los ambientes muestreados de esta provincia re afirmando el concepto de ubicuidad planteado por otros autores (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Costamagna y col., 2010; Gertiser y col., 2010).

De las siete muestras secuenciadas el 71,42 % (5/7) correspondió al genotipo T4 y el 14,28% (1/7) a los genotipos T5 (1/7) y T15. El genotipo T4 el más frecuentemente aislado y asociado a Queratitis Acanthamoebiana y Encefalitis Amebiana Granulomatosa a nivel mundial (Booton y col., 2002; Booton y col., 2005; Khan, 2006; Magliano y col., 2009).

Los genotipos T5 y T15 fueron considerados de tipo ambiental hasta hace pocos años, donde se registraron casos de Queratitis Acanthamoebiana y Encefalitis Amebiana Granulomatosa asociados a estos (Di Cave y col., 2009; Walochnik y col., 2015).

La República Argentina presenta escasos estudios de Queratitis Acanthamoebiana en humanos (D'Alessandro y col., 2007, Menghi y col., 2012) y solo en una oportunidad se identificó el genotipo T4 asociado a esta patología (Casero y col., 2017).

Los resultados negativos al cultivo de AVL pueden ser explicados por el bajo número de casos registrados de queratoconjuntivitis infecciosa bovina durante el período de muestreo y la imposibilidad de realizar la técnica raspado corneal en el campo, a cielo abierto.

Se reporta un 47 % de registros de síndrome nervioso bovino y un 39 % asociados a queratoconjuntivitis infecciosa bovina sin identificación del agente causal (N=537) (Laboratorio Azul, 2013). La falta de un diagnóstico veterinario de rutina en el país que incluya a las AVL, podrían explicar la participación de estos protozoos en estas patologías (Fuentelba y col., 1992, Kinde y col., 1998).

Las muestras fijadas en formol representan una importante fuente para estudios retrospectivo y son un material valioso para el diagnóstico rutinario del laboratorio para evaluar su impacto en ambientes ganaderos. Sin embargo, los ácidos nucleicos sometidos a formol y parafina son severamente degradados y contienen principalmente fragmentos pequeños (aproximadamente 300 pb). Estos fragmentos representan un escaso sustrato cuando se requiere identificar ADN con más cantidad de pares de bases (Berezcki y col., 2007).

El proceso de fragmentación podría haber afectado la secuencia diana y provocar una ausencia de molde para la identificación por PCR de las amebas. No se pudo comprobar, molecularmente, la presencia de *Acanthamoeba* spp. ni de *Naegleria* spp. en muestras de órganos formolados. Hasta la fecha no existen trabajos con respecto a este tipo de estudio a nivel mundial.

Presencia del orden *Chlamydiales* en pérdidas reproductivas en el ganado bovino: estudio retrospectivo.

Se detectó ADN de la familia *Chlamydiaceae* en 12 de las 251 muestras provenientes de pérdidas reproductivas conservadas en parafina (4,78%). Los valores de qPCR (Ct) fueron de 31,90 a 42,00. El análisis por microarray identificó *Chlamydia abortus* en el 1,99 % de las muestras (5/251), lo cual representó el 41,67 % de las muestras con detección de *Chlamydiaceae* (5/12) (Tabla 16).

Tabla 16: Detección de *Chlamydiaceae* (qPCR) y *C. abortus* (microarray) en muestras parafinadas correspondientes a pérdidas bovinas, período 2004 ó 2011.

Año	N	<i>Chlamydiaceae</i> positivos (%)		<i>C. abortus</i> positivos (%)	
2004	22	2	(9)	0	(0)
2005	55	0	(0)	0	(0)
2006	34	1	(3)	0	(0)
2007	38	4	(11)	2	(5)
2008	28	5	(18)	3	(11)
2009	18	0	(0)	0	(0)
2010	22	0	(0)	0	(0)
2011	39	0	(0)	0	(0)
Total	251	12	(4,78)	5	(1,99)

El 83,33 % (10/12) de los casos con detección de ADN de *Chlamydiaceae* correspondió a abortos; los restantes fueron mortinatos. El 70,00 % de los abortos (7/10) correspondió al último trimestre. Un 40,00 % (4/10) estuvo asociados a otros agentes infecciosos, el caso 8 presentó neuritis y el caso 9 reveló lesiones inflamatorias localizadas en pulmón e hígado. No se encontró ninguna lesión o diagnóstico previo en 6 muestras (50,00 %) (Casos 3, 4, 5, 10, 11 y 12) (Tabla 17).

Tabla 17: Asociación de muestras positivas a *Chlamydiaceae* (qPCR) y *C. abortus* (microarray) de muestras parafinadas con diagnóstico previo.

Caso	Producto	Mes gestacional	qPCR (Ct)	microarray	Diagnóstico previo
1	Aborto	6	38,0	<i>C. abortus</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
2	Aborto	8	36,0	<i>C. abortus</i>	<i>Neospora caninum</i>
3	Aborto	7	33,6	<i>C. abortus</i>	Negativo
4	Mortinato	A término	34,1	<i>C. abortus</i>	Negativo
5	Mortinato	A término	31,9	<i>C. abortus</i>	Negativo
6	Aborto	7	38,0	Negativo	<i>Brucella abortus</i>
7	Aborto	6	39,0	Negativo	<i>Leptospira</i> spp.
8	Aborto	7	41,0	Negativo	Neuritis
9	Aborto	7	42,0	Negativo	Lesiones inflamatorias
10	Aborto	4	33,7	Negativo	Negativo
11	Aborto	3	32,2	Negativo	Negativo
12	Aborto	6	35,1	Negativo	Negativo

Discusión.

La prevalencia de 4,78 % hallada para la familia *Chlamydiaceae* debe ser considerada como un valor basal. La sensibilidad de la técnica pudo verse afectada por el proceso de parafinado/desparafinado, degradando la calidad del ADN. La placenta, órgano blanco para el diagnóstico de aborto por clamidias, es de difícil recuperación en campos de cría extensiva (Idtse, 1984; Perez Martinez y Storz, 1985; Borel y col., 2006). El tipo de muestra analizada y la falta del órgano blanco pueden provocar una subestimación de la prevalencia. La inclusión de esta bacteria en el diagnóstico de pérdidas reproductivas llevado a cabo por Rojas y col. (2014) permitió explicar un 12,63 % (12/95) de los casos sin diagnóstico. La presencia de material genético de *Chlamydiaceae* no coincidente con las especies conocidas podría deberse a variantes intraespecie o a especies ambientales aún no descriptas.

La prevalencia de 2 % hallada para *C. abortus* también debe ser tomado como mínimo por los motivos ya mencionados. El aborto causado por *C. abortus* en el ganado bovino ocurre entre el sexto y octavo mes de gestación, dato coincidente con nuestros resultados (Reinhold y col., 2008, Reinhold y col., 2011). La presencia de *C. abortus* en abortos coinfectados con *Neospora caninum*, *Campylobacter* spp., *Brucella abortus* o *Leptospira* spp. refuerza la necesidad de su diagnóstico conjunto (Borel y col., 2008). La detección de ADN de *C. abortus* en dos mortinatos son otra forma de

expresión de la infección (Aitken 2000; Marsilio y col., 2005; Kemmerling y col., 2009; Poudel y col., 2012).

Determinación de anticuerpos séricos contra *Chlamydia abortus* en terneros, vaquillonas/vacas y toros.

El 25 % de los lotes analizados (32/128) presentó al menos un animal positivo (Tabla 18).

Tabla 18: Lotes positivos a *C. abortus* en terneros, vaquillonas/vacas y toros de la provincia de La Pampa, período 2013-2015.

Categoría	Lotes positivos (%)	IC	Lotes negativos
Terneros	11 (31,42)	18-48	24
Vaquillonas/Vacas	16 (30,77)	20-44	36
Toros	5 (12,20)	5-26	36
TOTAL	32 (25,00)	18-33	96

La proporción de lotes positivos hallados para las categorías terneros y vaquillonas/vacas no difirieron entre si significativamente ($\chi^2=0,004$; $p=0,9$), pero ambos fueron superiores respecto de los lotes de toros ($\chi^2=4,2$; $p=0,04$; $\chi^2=4,52$; $p=0,03$ respectivamente).

De 656 sueros bovinos analizados, el 8,07 % resultaron positivos a *C. abortus*. No se encontraron diferencias significativas entre seroprevalencias comparadas por categorías (Tabla 19).

Tabla 19: Seroprevalencia a *C. abortus* en terneros, vaquillonas/vacas con y sin problemas reproductivos y toros de la provincia de La Pampa, período 2013-2015.

Categoría	N	Sueros positivos (%)	IC	Sueros negativos
Terneros	210	15 (7,14)	4-11	195
Vaquillonas/ Vacas	Con problema reproductivo	12 (6,45)	4-11	174
	Sin problema reproductivo	21 (11,66)	8-18	159
	Total	33 (9,01)	6-12	333
Toros	80	5 (6,25)	2-14	75
TOTAL	656	53 (8,07)	6-10	603

Las seroprevalencias de vaquillonas/vacas no presentaron diferencias significativas entre animales con y sin problemas reproductivos ($\chi^2 = 3,03$; $p = 0,08$).

No se hallaron diferencias significativas en la proporción de animales seropositivos entre lotes positivos independientes de vaquillonas/vacas y terneros. Los toros no se incluyeron en este análisis por disponer de un animal por lote (Tabla 20).

Tabla 20: Proporción de animales con anticuerpos séricos contra *C. abortus* en lotes positivos de vaquillonas/vacas y terneros.

Categoría	Muestras		N	Seroprevalencia (%)	p
	(+)	(-)			
Vaquillonas/vacas	33	101	134	24,62	4,3
Terneros	15	52	67	22,38	
Total	48	153	201	23,88	

Discusión.

La comparación de los resultados séricos hallados en este trabajo con los reportados para otros países, a partir del ajuste de las observaciones mediante una prueba de diferencias simultáneas para prevalencias (Putt y col., 1988), ubicó a la provincia de La Pampa junto a Turquía en segundo lugar, por debajo de Jordania (Tabla 21).

Tabla 21: Comparación del valor de seroprevalencia a *C. abortus* hallado en la provincia de La Pampa con los citados por otros países a partir de la técnica ELISA mediante la prueba de diferencias simultáneas.

		La Pampa	Argelia ¹	Turquía ²	Suecia ³	Jordania ⁴	Bélgica ⁵	Irlanda ⁶	Total
Observado	Sero N	603,0	354,0	176,0	523,0	544,0	1812,0	1904,0	5916,0
	Sero P	53,0	3,0	16,0	2,0	127,0	37,0	96,0	334,0
	Total	656,0	357,0	192,0	525,0	671,0	1849,0	2000,0	6250,0
Esperado	Sero N	621,0	337,9	181,7	497,0	635,2	1750,3	1893,2	5916,3
	Sero P	35,0	19,1	10,3	28,0	35,8	98,7	106,8	333,7
	Total	656,0	357,0	192,0	525,0	671,0	1849,0	2000,0	6250,0
Desvío	Sero N	0,5	0,8	0,2	1,4	13,0	2,2	0,1	18,1
	Sero P	9,2	13,5	3,2	24,2	232,0	38,6	1,1	321,9
	Total	9,7	14,3	3,4	25,5	245,1	40,8	1,1	340,0 *
Seroprevalencia		8,1	0,8	8,3	0,4	18,9	2,0	4,8	
		2	23**	ns	39**	33**	52**	10**	

* $340 > 12,6$, 6 gl, $p=0,05$

** diferencias significativas $p < 0,01$

¹ Derdour y col., 2017

² Gokce y col., 2007

³ Godin y col., 2008

⁴ Talafha y col., 2012

⁵ Yin y col., 2014

⁶ Wilson y col., 2012

La seroprevalencia de 8,07 % para *C. abortus* detectada en bovinos de sistemas de cría extensivos de la provincia de La Pampa es inferior al 23 % citada para zonas tamberas del centro de la provincia de Buenos Aires (Rodríguez Fermepin y col., 1995). La diferencia encontrada en ambos estudios puede explicarse por las diferentes técnicas utilizadas y los sistemas de producción analizados. La combinación FC ó IFI se implementó para asegurar la identificación positiva a familia *Chlamydiaceae* (Rodríguez Fermepin y col., 1995). La técnica utilizada en este trabajo es específica para la especie *C. abortus*.

La seroprevalencia de hembras con y sin problemas reproductivos, si bien no difirieron significativamente ($p=0,08$), indica la importancia del estudio de hembras asintomáticas, ya que no identificar los problemas reproductivos a campo no implica su ausencia. Los lotes no reconocidos con problemas reproductivos pueden ser el resultado de una falta de seguimiento de los animales, característico en sistemas extensivos. La práctica del servicio continuo acentúa el curso de esta enfermedad de manera silenciosa.

Al comparar las tasas de animales seroprevalentes pertenecientes a lotes positivos con los hallados en los seis países analizados (Tabla 21) por medio de un ajuste indirecto (Thrusfield 2005), se evidencia una situación de riesgo para la provincia. Se observaron altas seroprevalencias tanto a nivel de lote como de animales dentro de lote. Esto se agrava si se considera que el trabajo se realizó en establecimientos de cría y las citas corresponden a sistemas de producción lechera (Tabla 22).

Tabla 22: Análisis comparativo entre valores hallados de tasa de lotes infectados (Li), tasa de animales positivos por lote infectado (Ap/Li) y animales infectados esperados ajustado por método indirecto (AiE) en diferentes países y La Pampa.

Ubicación	Li	Ap/Li	AiE ³	Referencias
Jordania ¹	0,68	0,27*	1836	Talafha y col., 2012
La Pampa ¹	0,31	0,25	775	Este trabajo
Turquía ¹	0,27	0,28*	756	Gokce y col., 2007
Irlanda ²	0,60	0,10	600	Wilson y col., 2012
Bélgica ¹	0,20	0,15	300	Yin y col., 2014
Suecia ¹	0,03	0,12*	36	Godin y col., 2008
Argelia ¹	0,05	0,01	5	Derdour y col., 2017

¹ ELISA (IDvet, ID Screen, multi-species)

² ELISA (SolPr, antígeno clamidial soluble)

³ Se consideraron 100 lotes de 100 animales cada uno ($100 * Li * 100 * Ap/Li$)

*Dato estimado

La actual circulación de anticuerpos contra *C. abortus* representan un riesgo para el sistema ganadero provincial por la falta de un cuadro clínico específico, enmascarado por otras patologías más estudiadas (campylobacteriosis, leptospirosis, brucelosis, tricomonosis y neosporosis). Su seroprevalencia es similar a la hallada para *Neospora caninum* en la provincia (Fort y col., 2015). La provincia de La Pampa implementó desde 2002 un plan para el control y erradicación de brucelosis (SENASA, 2002) y desde el 2008 un plan de control y erradicación de enfermedades venéreas (campylobacteriosis y tricomonosis) (SENASA, 2008), los cuales no han mejorado los índices de procreo provinciales (Vázquez y col., 2012). En la provincia no se realiza ningún tipo de vacunación o tratamiento contra la clamidiosis, por lo cual los anticuerpos encontrados reflejan una respuesta natural a la infección y no provienen de anticuerpos vacunales. Los valores hallados para la región de estudio representan el umbral de seroprevalencia mínimo esperable.

La circulación de *C. abortus* refuerza la necesidad de extremar las condiciones de bioseguridad y protección de los veterinarios, personal de campo y de frigorífico en debido a su carácter zoonótico (Bazala y Renda, 1992; Hinton y col., 1993; Wittenbrink, 2002; Rodolakis y Yousef Mohamad, 2010; Essing y Longbottom, 2015; Borel y col.; 2018). Por ello se aconseja limitar el contacto de mujeres embarazadas con los animales para el momento de la parición (Kampinga y col. 2000, Pospischil y col 2002, Walder y col. 2005).

Detección del ADN del orden *Chlamydiales* y de la familia *Chlamydiaceae* en distintas muestras bovinas.

Muestras oculares.

Se estudiaron 50 muestras oculares, en 3 se detectó ADN del orden *Chlamydiales* (6,00 %; IC 1,44-16,84) y una de ellas ADN de la familia *Chlamydiaceae* (2,00 %; IC 0,34-14,22) (Figura 34). La secuenciación de las muestras negativas a familia identificó en una muestra la presencia de clamidiales no clasificadas hasta el momento (*Uncultured Chlamydiales*) con un 92 % de homología (ANEXO I).

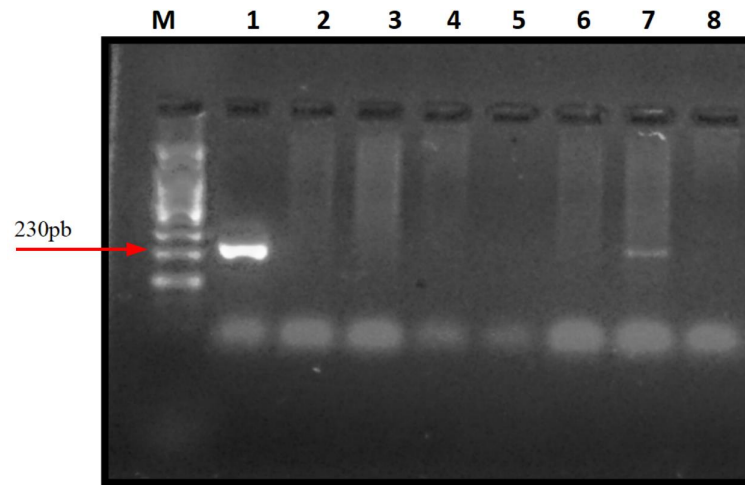


Figura 34: Amplificación específica para familia *Chlamydiaceae*. Calles: M) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos, Argentina). 1) Control positivo *Chlamydia trachomatis* (Linfogranuloma venéreo, LGV). 2 a 6) Muestras negativas de hisopados de ojo. 7) Muestras positiva de hisopado de ojo. 8) Control negativo.

Muestras de cérvix y de lavado de úteros de hembras donadoras de embriones.

Sobre 104 muestras de cérvix analizadas, 84 correspondieron a hembras con problemas reproductivos (80,77 %; IC 72,08-87,27) y 20 a vaquillonas vírgenes (19,23 %; IC 12,73-27,92).

Del total de muestras analizadas, 32 registraron presencia de ADN del orden *Chlamydiales* (30,76 %; IC 22,70-40,22) y 4 ADN de la familia *Chlamydiaceae* (3,84 %; IC 1,20-9,80) (Tabla 23).

En 27 muestras de las hembras con problemas reproductivos se amplificó ADN del orden *Chlamydiales* (32,14%; IC 23,10-42,75) y en 2 ADN de la familia *Chlamydiaceae* (2,38%; IC 0,15-8,78).

De las 20 muestras de cervix provenientes de vaquillonas vírgenes se amplificó ADN del orden y de la familia en 5 (25,00 %; IC 10,81- 47,25) y en 2 (10,00 %; IC 1,57-31,32) respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas entre prevalencias de hembras con y sin problemas reproductivos a nivel de orden ($\chi^2 = 0,38$ $p = 0,53$, $p < 0,05$) pero si a nivel de familia ($\chi^2 = 4,1$ $p = 0,04$, $p < 0,05$) (Tabla 23). El resultado de la secuenciación fue negativa debido a la baja calidad del ADN (ANEXO I).

Tabla 23: Prevalencia a orden *Chlamydiales* y a familia *Chlamydiaceae* en muestras de cérvix de hembras con y sin problemas reproductivos.

Cérvix	N	<i>Chlamydiales</i>		Prevalencia del orden	<i>Chlamydiaceae</i>		Prevalencia a familia
			N			N	
Con problemas	84	(+)	27	32,14%	(+)	2	2,38 %
		(-)	57		(-)	25	
Sin problemas (vírgenes)	20	(+)	5	25,00 %	(+)	2	10,00 %
		(-)	15		(-)	3	
TOTAL	104	(+)	32	30,76 %	(+)	4	3,84 %
		(-)	72		(-)	28	

Del total de las muestras de lavado de úteros de hembras donadoras, solo una muestra presentó ADN clamidial, tanto para orden como para familia (8,33%; IC:<0,01-37,53).

Muestras de esmegma y semen.

Se analizaron 150 muestras de esmegma prepucial de toros, 100 en servicio natural (66,67 %; IC 58,78- 73,72) y 50 de cabañas (33,33 %; IC 26,28-41,22). Se detectó la presencia del orden *Chlamydiales* en 35 muestras (23,33 %; IC 17,25- 30,75) y de la familia *Chlamydiaceae* en 7 muestras (4,66 %; IC 2,11- 9,49).

En toros de servicio natural se amplificó ADN del orden *Chlamydiales* en 11 muestras (11,00 %; IC 6,09- 18,79) y ADN de la familia *Chlamydiaceae* en 4 muestras (4,00 %; IC 1,24- 10,16).

En toros de cabañas se amplificó ADN del orden *Chlamydiales* en 24 muestras (48,00 %; IC 34,80-61,49) y ADN de la familia *Chlamydiaceae* en 3 muestras (6,00 %; IC 1,44- 16,84).

Se encontraron diferencias significativas al comparar prevalencia del orden *Chlamydiales* entre toros en servicio natural y de cabaña ($\chi^2 = 25,5$ $p=0,000001$, $p<0,05$). No se hallaron diferencias significativas a nivel de familia ($\chi^2 = 2,1$ $p=0,10$, $p<0,05$) (Tabla 24).

No se pudo identificar las especies de la familia *Chlamydiaceae* involucradas debido a que los cromatogramas presentaron baja eficiencia y ruidos de base.

Tabla 24: Prevalencia al orden *Chlamydiales* y a familia *Chlamydiaceae* en muestras de esmegma prepucial de toros en servicio natural y de cabañas.

Esmegma	N	<i>Chlamydiales</i>		Prevalencia a orden	<i>Chlamydiaceae</i>		Prevalencia a familia
		(+)	N		(+)	N	
Servicio natural	100	(+)	11	11,00 %	(+)	4	4,00 %
		(-)	89		(-)	7	
Cabaña (vírgenes)	50	(+)	24	48,00 %	(+)	3	6,00 %
		(-)	26		(-)	21	
TOTAL	150	(+)	35	23,33 %	(+)	7	4,66 %
		(-)	115		(-)	28	

Se estudiaron 50 muestras de semen de toros de cabaña y en 15 se detectó la presencia de ADN del orden *Chlamydiales* (30%; IC 19,03- 43,83) y en 3 muestras se detectó ADN de la familia *Chlamydiaceae* (6,00 %; IC 1,64- 16,84). El informe de secuenciación indicó que las muestras presentaron una baja intensidad por lo cual no se obtuvo una identificación positiva.

Muestra de fetos formolados.

En órganos de 42 fetos formolados se detectó la presencia del orden *Chlamydiales* en 2 muestras (4,76 %; IC 0,46- 16,65) y en 1 muestra a la familia *Chlamydiaceae* (2,38 %; IC < 0,01- 13,44). Ambos casos se correspondieron con abortos del tercer trimestre registrados en 2013. El ADN clamidial en familia se encontró presente en los cuatro órganos estudiados (Tabla 25).

En la secuenciación de las muestras formoladas la cantidad de ADN fue correcta, pero de mala calidad. Se repitió el proceso de concentración y purificación, sin cambios en el resultado por lo que no se pudo identificar especies.

Tabla 25: Órganos positivos a orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* por PCR provenientes de fetos abortados formolados.

	<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	Hígado	Corazón	Riñón	Pulmón
Feto 1	(+)	(+)	1	1	1	1
Feto 2	(+)	(-)	1	0	1	0

Muestras de fetos no abortados.

Los 50 fetos no abortados recolectados de frigoríficos correspondieron, en mayor proporción, al segundo y tercer trimestre de gestación. El peso promedio para el primer trimestre fue de 0,4 kilos, 5,3 kilos para el segundo trimestre y de 17,5 kilos para el tercer trimestre.

En los órganos de los fetos no abortados se detectó la presencia del orden *Chlamydiales* en 10 muestras (20,00 %; IC 11,05- 33,23) y en 5 muestras a la familia *Chlamydiaceae* (10,00 %; IC 3,91- 21,79) (Tabla 26 y Figura 35).

Tabla 26: Trimestre de gestación y órganos positivos a orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* por PCR de fetos no abortados provenientes de frigoríficos.

Muestra	Trimestre	<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	Hígado	Corazón	Riñón	Pulmón
1	2	(+)	(+)	1	1	1	0
2	2	(+)	(+)	1	1	1	0
3	3	(+)	(+)	1	1	0	1
4	3	(+)	(+)	1	0	0	1
5	2	(+)	(+)	0	1	1	1
6	1	(+)	(-)	1	1	0	0
7	3	(+)	(-)	1	1	0	0
8	2	(+)	(-)	1	0	0	0
9	2	(+)	(-)	1	0	0	1
10	3	(+)	(-)	0	0	1	0

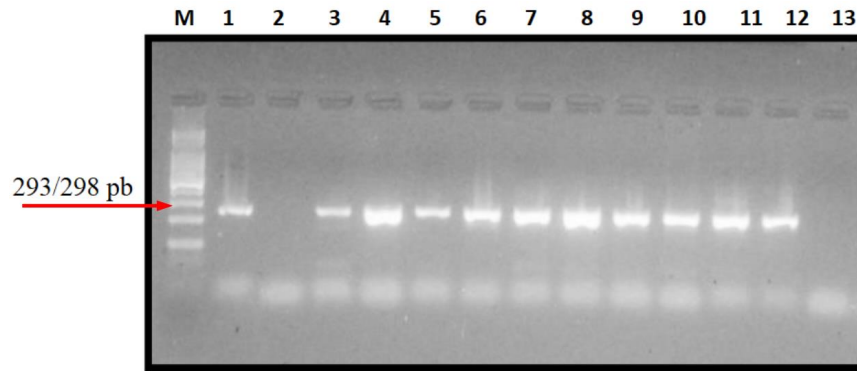


Figura 35: Electroforesis en gel de agarosa 2 % de los productos de amplificación específico para orden *Chlamydiales*. Calles: M) marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). 1) Control positivo. 2) Muestras negativa. 3 al 12) Muestras positivas. 13) Control negativo.

Los fetos con amplificaciones positivas a orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* presentaron una mayor tasa de órganos afectados respecto de aquellos en los que solo se amplificó orden ($\chi^2 = 3,7$ $p=0,05$, $p<0,05$).

La mayor tasa de detección de ADN clamidial se registró en hígado (8/10), seguido de corazón (6/10). Pulmón y riñón fueron los órganos con menor tasa de identificación (4/10) (Tabla 26). El ADN clamidial de las muestras de órganos resultó insuficiente para la secuenciación (ANEXO I).

Presencia de endosimbiontes del orden *Chlamydiales* en cultivos de Amebas de Vida Libre.

Se identificaron endosimbiontes del orden *Chlamydiales* en el 9,25 % (5/54, IC: 3,60-20,33) de los cultivos positivos a AVL. Solo se identificó al orden *Chlamydiales* en cultivos de *Acanthamoeba* spp. La secuenciación identificó el género *Neochlamydia* spp., con una homología del 99,00 % en un cultivo de *Acanthamoeba* spp. genotipo T5 (ANEXO I). Las 4 secuenciaciones restantes presentaron ruido de base.

Este resultado concuerda con los citados por otros autores (Horn y col., 2000; Wu y col., 2012; Lagkouvardos y col., 2014; Fukumoto y col., 2016) y confirma el rol del agua como reservorio del orden *Chlamydiales* (Wheelhouse y col., 2011). Las clamidias ambientales evolucionaron como endosimbiontes de eucariotas inferiores, como las AVL. Recientes trabajos han ubicado a estas bacterias como patógenos emergentes, con potencial importancia en sistemas de producción ganadera. Ruhl y col. (2008) detectaron la presencia de *Parachlamydia* spp. en placentas de abortos ovinos, pero aun queda por definir el rol de la *Neochlamydia* spp.

La presencia de *Acanthamoeba* spp., podría favorecer su presencia y persistencia en el sistema ganadero de La Pampa.

Discusión.

La presencia de ADN del orden *Chlamydiales* se detectó en 110 muestras (15,51 %; IC 13,03-18,37) y en 34 muestras (4,79 %; IC 3,43-6,64) presentó material genético de familia *Chlamydiaceae*. La información se resume en la Tabla 27.

La importancia de las clamidias como agentes infecciosos en ojos solo ha sido estudiado en los ovinos (Polkinghorne y col., 2009; Gupta y col., 2015) y se ha encontrado una gran diversidad de especies dentro de la familia, pero no ha ganado tanta importancia en el ganado bovino (Gupta y col., 2015). Los resultados de este estudio indican la presencia de *Chlamydiaceae* en bovinos con QIB, coincidente con otros autores de la República Argentina (Odeón, 2006; Laboratorio de diagnóstico Veterinario Azul, 2013). No se encontraron muestras positivas en animales sin QIB, lo que permite sospechar que no es una habitante normal del ojo sano.

Las técnicas moleculares permiten ampliar el espectro en la identificación de patógenos. Este trabajo permitió identificar la diversidad de este orden en patologías oculares. Debe considerarse en el diagnóstico la presencia de especies del orden *Chlamydiales* no pertenecientes a la familia *Chlamydiaceae*. La recurrencia de la QIB en los establecimientos ganaderos puede atribuirse, entre otros factores, a la falta de reconocimiento de las clamidias como parte del tratamiento para el complejo infeccioso.

Tabla 27: Prevalencia a orden *Chlamydiales* y a familia *Chlamydiaceae* en diferente tipo de muestras bovinas estudiadas.

Tipo de muestra	N	<i>Chlamydiales</i>		Prevalencia	<i>Chlamydiaceae</i>		Prevalencia a familia	Secuenciado
		(+)	N		(+)	N		
Muestra parafinadas de pérdidas reproductivas	251	(+)	12	4,78 %	(+)	12	4,78 %	<i>Chlamydia abortus</i>
		(-)	239		(-)	0		
Muestra ocular	50	(+)	3	6,00 %	(+)	1	2,00 %	<i>Uncultured Chlamydiales</i>
		(-)	47		(-)	2		
Cérvix	104	(+)	32	30,76 %	(+)	4	3,84 %	SD
		(-)	72		(-)	28		
Lavado hembras donadoras	12	(+)	1	8,33 %	(+)	1	8,33 %	SD
		(-)	11		(-)	0		
Esmegma	150	(+)	35	23,33 %	(+)	7	4,66 %	SD
		(-)	115		(-)	28		
Semen	50	(+)	15	30,76 %	(+)	3	6,00 %	SD
		(-)	35		(-)	12		
Fetos abortados formolados	42	(+)	2	4,76 %	(+)	1	2,38 %	SD
		(-)	40		(-)	1		
Fetos no abortados	50	(+)	10	20,00 %	(+)	5	10,00 %	SD
		(-)	40		(-)	5		
TOTAL	709	(+)	110	15,51 %	(+)	34	4,79 %	
		(-)	599		(-)	76		

La mayor proporción de integrantes del orden *Chlamydiales*, no pertenecientes a familia *Chlamydiaceae* detectadas en este trabajo, indican su importancia en el ambiente ganadero a nivel provincial. Esto es coincidente con los escasos estudios realizados hasta el momento (Teankum y col., 2007; Borel y col., 2007; Ruhl y col., 2009; Deuchande y col., 2010; Wheelhouse y col., 2010; Barkallah y col., 2014; Wheelhouse y col., 2015).

Los valores de prevalencia a nivel de familia hallados en lotes de hembras con y sin problemas reproductivos son similares a los descritos por otros autores a nivel mundial (Tabla 5). Las hembras que fallan en su gestación (segundo y tercer trimestre) generalmente son eliminadas del lote (faena) pero algunas pueden ser no detectadas (primer trimestre) y persistir en el rodeo, lo cual dificulta determinar la prevalencia real de infección o portación de clamidias en sistemas de producción con servicio estacionado. Este problema es aún mayor en lotes con servicio continuo donde las pérdidas reproductivas no están cuantificadas y el control sanitario esta enfocado en el toro. La transmisión horizontal (ingestión/inhalación) es la ruta más probada hasta el momento. Todos los fluidos (vaginales, oculares y nasales), el semen, la orina y la materia fecal son la manera que en que los potreros se contaminan.

Una proporción de las vaquillonas se destina para la reposición de vientres. Esta categoría puede adquirir la enfermedad por contacto no sexual (ambiente contaminado, hacinamiento) o por transmisión vertical, no comprobada aún (Kauffold y col., 2014). La identificación de clamidias en fetos no abortados entre el primer y tercer trimestre de gestación refuerza la teoría de la transmisión vertical. El estudio de los fetos no abortados provenientes de frigoríficos ofrece una oportunidad para la investigación de este tipo de agentes patógenos.

No se pudo valorar la prevalencia hallada en las muestras de lavado de hembras donadoras de embriones ya que no existen precedentes a nivel mundial. Se puede mencionar que existe el riesgo de transmisión de clamidias a través de la transferencia de embriones in vitro en bovinos, incluso con las normas actuales del Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (en inglés IETS) (Fieni y col., 2015). Las hembras son tratadas con altos niveles de progesterona (dispositivo intrauterino para sincronización de celo y superovulación) lo que aumenta el riesgo de infección uterina a microorganismos.

La prevalencia a nivel de familia hallada en muestras de esmegma obtenidas por raspaje fue similar a la citada para cabañas en Alemania (Kauffold y

col., 2007). La provincia de La Pampa se encuentra adherida a un plan obligatorio de control y erradicación de enfermedades venéreas (tricomosis y campylobacteriosis). Los toros positivos son eliminados de los rodeos, lo que podría incrementar de manera relativa la persistencia de animales portadores o infectados por clamidias destinados al servicio.

La presencia de clamidias en semen se encuentra entre los valores citados para otros países del mundo (Teankum y col., 2007; Kauffold y col., 2007). Su presencia puede explicarse a partir de la contaminación en la cavidad prepucial por contacto homosexual (heces) o de la infección del tracto genitourinario. Los toros de cabaña podrían infectarse a edades tempranas de manera horizontal y/o vertical.

El valor de prevalencia en abortos del 4,76 % a orden *Chlamydiales* se ubica entre los citados a nivel mundial (Tabla 6). La prevalencia del 2,38 % a familia *Chlamydiaceae* es consistente con el estudio retrospectivo de muestras parafinadas y con lo hallado para provincia de Buenos Aires (Laboratorio Azul, 2013). Resultó difícil acceder a las placentas en los campos de cría extensivos por las dimensiones, el tiempo/hombre y los animales carroñeros. Tratar de obtener un diagnóstico a partir de productos del aborto resultó un desafío debido a que frecuentemente están contaminados (tierra, heces, barro) y pueden producir falsos positivos en la PCR. Pese a los esfuerzos y mejoras en las técnicas de diagnóstico, se desconoce la etiología de más del 50 % de los casos de abortos (Rojas y col., 2012). Si bien los laboratorios de diagnóstico veterinario pueden recurrir a técnicas moleculares para detectar la presencia de clamidias, se requiere asociarla a una lesión. La histopatología y la inmunohistoquímica son herramientas necesarias para este tipo de diagnóstico (Borel y col., 2018).

Los tejidos en formol reducen los riesgos zoonóticos y son una fuente de material para estudios moleculares. La integridad del ADN está condicionada por la presencia de ácido fórmico en la solución y el tiempo de fijación. Aunque se ha demostrado que la fijación en formalina reduce la eficacia de la PCR, con un adecuado acondicionamiento se puede obtener ADN para el diagnóstico de clamidias (Creer y col., 1991; Borel y col., 2006; Ortega y col., 2007; Hunt y col., 2016).

La faena de vacas preñadas ocurre a nivel mundial. A pesar de considerarse una práctica irracional, permite el estudio de diversas enfermedades a partir de los fetos descartados (Macedo y col., 2012; Maurer y col., 2016). La detección de ADN clamidial en muestras de órganos de fetos no abortados provenientes de frigoríficos de

la provincia de La Pampa fortalece la teoría de una transmisión vertical, con la placenta e hígado como principales órganos de identificación. La infección del feto por clamidias podría ocurrir en los primeros 100-120 días, cuando el sistema inmune fetal es inmaduro. La reinfección por clamidias durante lo que resta de la gestación podría provocar el aborto o el nacimiento de animales débiles.

Las prevalencias similares halladas a familia *Chlamydiaceae* en vaquillonas de reposición (10,00%), en semen de toros vírgenes de cabaña (6,00%) y los fetos no abortados (10,00%) indicaría la adquisición de clamidias principalmente por transmisión vertical, cuando el feto aún no es inmunocompetente (Kauffold y col., 2014). La transmisión horizontal sería de menor relevancia en condiciones extensivas; en caso contrario debería existir una relación directa entre prevalencia y edad del bovino.

La secuenciación de las muestras negativas a familia fue un proceso complementario para conocer la diversidad del orden en el sistema ganadero. Se identificaron *Uncultured Chlamydiales* en muestras oculares. No se obtuvieron resultados positivos en el resto de las muestras.

Las clamidias ambientales (*Neochlamydia* spp.) halladas en este estudio corresponden a un grupo con limitada capacidad para colonizar otros hospedadores diferentes de los protozoos. Sin embargo, estudios clínicos en humanos y modelos experimentales en animales sugieren que algunos miembros de este grupo pueden tener el potencial de generar enfermedades. En un futuro cercano, los diagnósticos de rutina veterinaria deberían contemplar a todas las clamidias.

CONCLUSIONES

- Se adaptó un protocolo de diagnóstico por técnicas moleculares para la detección de ADN de AVL, de bacterias del orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae*, a las condiciones de trabajo del laboratorio de Sanidad Animal de la EEA INTA-Anguil (La Pampa-Argentina).
- Se determinó la presencia de AVL en aguas destinadas para consumo ganadero en bovinos de cría. Los puntos de localización positivos se encontraron distribuidos en toda la región estudiada lo que reafirma su òubicuidad. El rango de pH y temperatura, asociados a los lugares de muestreo y a las estaciones climáticas, no afectaron a la presencia de los AVL.
- Se caracterizó a nivel morfológico y molecular el género *Acanthamoeba* spp. aislado en ambientes ganaderos de la provincia de La Pampa.
- Se identificaron amebas con transformación ameboflagelar no correspondiente al género *Naegleria* spp.
- No se aislaron AVL en muestras de ojos independientemente de la presencia de sintomatología de queratoconjuntivitis.
- No se pudo comprobar molecularmente la presencia de AVL en muestras de òrganos de fetos abortados conservados en formol.
- Se confirmó la presencia de ADN del orden *Chlamydiales* perteneciente a la familia *Chlamydiaceae* (4,78 %) y de *Chlamydia abortus* (1,99 %) en muestras de pérdidas reproductivas de ganado bovino en la provincia correspondientes al período 2004-2011. No se descarta la presencia de cepas autóctonas.
- Se detectó la presencia de anticuerpos séricos contra *Chlamydia abortus* en todas las categorías bovinas de la provincia. Se comprobó una seroprevalencia del 8 % a nivel individual y del 25 % a nivel de rodeo sin distinción de categorías ni condición reproductiva. Esto confirma la presencia de especies del orden *Chlamydiales* en los bovinos de La Pampa.
- Se determinó la presencia de ADN perteneciente al orden *Chlamydiales* en ojos con queratoconjuntivitis. Se detectó la familia *Chlamydiaceae* y un integrante no clasificado aún (*Uncultured Chlamydiales*).

- Se comprobó la presencia del orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* en el aparato reproductor de hembras (con y sin problemas reproductivos) y machos, incluyendo animales sin contacto sexual (vírgenes).
- Se confirmó la presencia del orden *Chlamydiales* y familia *Chlamydiaceae* en muestras de órganos de fetos abortados formolados con prevalencia similar a la hallada en el estudio retrospectivo.
- La identificación en fetos no abortados de material genético de bacterias del orden *Chlamydiales* y de la familia *Chlamydiaceae*, asociados a similares prevalencias en vaquillonas de reposición y toros sugiere la hipótesis de transmisión vertical.
- Se identificó la presencia del género *Neochlamydia* spp. como endosimbionte en un aislamiento de *Acanthamoeba* genotipo T5. Se destaca la importancia del agua como reservorio de agentes infecciosos descritos a nivel mundial, no estudiados en la región.

PRODUCCION CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

Presentaciones en Congresos.

Rojas MC; Costamagna SR; Rodriguez Fermepín M. 2014. Presencia de *Acanthamoeba* spp. en aguas de bebida para consumo ganadero. X Congreso Argentino de Protozoología y enfermedades parasitaria-Mar del Plata (Buenos Aires), del 16 al 18 noviembre de 2014.

Rojas MC, Fort M, Grajetzki Ch., Bettermann S; Costamagna SR, Rodriguez Fermepin M, Sachse K. 2015. Detección de *Chlamydophila abortus* en fetos bovinos abortados en La Pampa (Argentina). 38 Congreso Argentino de Producción Animal, Santa Rosa (La Pampa), del 23 al 25 septiembre 2015.

Rojas MC; Rodriguez Fermepín M; Costamagna SR. 2016. *Acanthamoeba* spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias - SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas, Santa Fe, del 26 al 28 de noviembre de 2016.

Costamagna SR; Gertiser L; Visciarelli E; Lucchi L; Basabe N; Randazzo V, **Rojas MC.** 2016. *Acanthamoeba*, un Protozoo sub-diagnosticado e ignorado. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias - SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas, Santa Fe, del 26 al 28 de noviembre de 2016.

Publicaciones.

Rojas M, Rodríguez Fermepín M, Gracia Martín F, Costamagna S. 2017. Presencia de *Acanthamoeba* spp., en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49 (3): 227-234.

Rojas M, Fort M, Bettermann S, Entrocassi C, Costamagna S, Sachse K, Rodríguez Fermepín M. 2018. Detección de *Chlamydia abortus* en pérdidas reproductivas de bovinos en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50 (3): 269-274.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abedkhojasteh H, Niyyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M (2013). First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. Iran J Parasitol. ; 8 (3):481-485.

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowse SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2013). The Revised Classification of Eukaryotes. J Eukaryot Microbiol.; 60 (3): 4296507.

Aitken I D. (2000). Chlamydial abortion. In: Diseases of Sheep, 3th ed. (Aitken I. D., Ed.). Blackwell Publishing. Oxford. pp. 81-86.

Aitken I, Longbottom D. (2007). Chlamydial abortion. In: Aitken, I.D. (Ed.), Diseases of Sheep. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 1056112.

Aksozek A, McClellan K, Howar K, Niededrekorn JY and Alizadeh H (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. J Parasitol. 88:621-623.

Alexander D. (2010) Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review of cases in clinical practice. Vet Clin North Am Food Anim Pract.; 26: 4876503.

Amann R, Springer N, Schönhuber W, Ludwig W, Schmid E, Müller K, Michel R (1997). Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoeba* related to *Chlamydia* spp. Appl Environ Microbiol.; 63:1156 121.

Anand CM, Skinner AR, Malic A, Kurtz JB (1983). Interaction of *Legionella pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J Hyg.; 91:167-178.

Anderson O (2000). Abundance of terrestrial gymnamoebae at a northeastern U.S. site: a four-year study, including the El Nino winter of 1997ó 1998. *J. Eukaryot. Microbiol.*; 47:148ó155.

Angelos J A, Spinks P Q, Ball L M, George L W. (2007). *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 57, 789ó795

Angelos J A. (2010). *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis: cause or coincidence? *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26, 73ó77

Arshi A, Doosti A, Sharifzadeh A (2011). PCR assay for detection of abortion rate caused by *Chlamydia psittaci* in Iranian cattle. International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (ICABPS'2011) Bangkok Dec., 2011

Avery S V, Harwood J L, Lloyd D (1995). Quantification and characterization of phagocytosis in the soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* ; 61:1124-1132.

Axelsson-Olsson D, Waldenstrom J, Broman T, Olsen B, Holmberg M (2005). Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* ; 71, 987-992.

Baena Del Valle J A, Ramos Moreno A J, Gómez Alegría C J, Gómez Camargo D E. (2013). Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR *Rev. Colomb. Biotecnol.*; 15 (1) 172-179.

Ball L, Griner LA, Carroll EJ (1964). The bovine seminal vesiculitis syndrome. *Am J Vet Res.*; 25: 291-302.

Baquero RA, Reyes-Batlle M, Nicola GG, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Guillermo Esteban J, Valladares B, Martínez-Carretero E, Piñero J, Lorenzo-Morales J. (2014). Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathog Glob Health.* 108:206-211.

Barati S, Moori-Bakhtiari N; Ghorbanpoor Najafabadi M, Momtaz H, Shokuhizadeh L. (2017). The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion. Iran J Microbiol.; 9(5): 2886294.

Barkallah M, Gharbi Y, Hassena A, Slima A, Mallek Z, Gautier M, Greub G, Gdoura R, Fendri I. (2014). Survey of Infectious Etiologies of Bovine Abortion during Mid-to Late Gestation in Dairy Herds. PLOS ONE 9 (3): 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0091549.

Barker J, Brown MR (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology. 140, 1253-1259.

Bazala E, Renda J. (1992). Latent *Chlamydia* infections as the cause of health disorders in swine, cattle and sheep breeders in Czechoslovakia 105.

Bedotti D, Fort M, Baldone V, Fuchs L, Giménez, Urquiza J. (2008). Descripción de un caso de aborto por *Chlamydia psittaci* en un establecimiento caprino ubicado en el departamento Puelén, provincia de La Pampa, Argentina. XVII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, del 29 al 31 de octubre, Santa Fe. Argentina.

Bedson SP, Bland JO (1932). A morphological study of psittacosis virus with the description of a developmental cycle. Br J Exp Pathol.; 13:461-466.

Berezki L, Kis G, Bagdi E, Krenacs L. (2007). Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. Pathol Oncol Res 13: 209-214.

Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P. (1999). *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. J. Clin. Microbiol. 37, 237862380.

Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ (1998). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.*; 64:279-286.

Biesenkamp-Uhe C, Li Y, Hehnen HR, Sachse K, Kaltenboeck B. (2007). Therapeutic *Chlamydomydia abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydomydia* infection. *Infect Immun.*; 75: 8706877.

Birtles R, Rowbotham T, Storey C, Marrie T, Raoult D (1997). *Chlamydia*-like obligate parasite of free-living amoebae. *Lancet*; 349:9256 926.

Blood D C, Henderson J A. (1986). *Medicina veterinaria*. Cuarta edición.pág.404-406

Blumer S, Greub G, Waldvogel A, Hässig M, Thoma R, Tschuor A, Pospischil A, Borel N. (2011). *Waddlia*, *Parachlamydia* and *Chlamydiaceae* in bovine abortion. *Vet Microbiol.*; 152 (3-4):385-393.

Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rose K, Timms P. (2002) Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydomydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst Appl Microbiol* 25, 1466152.

Bodetti TJ, Viggers K, Warren K, Swan R, Conaghty S, Sims C, Timms P. (2003). Wide range of *Chlamydiales* types detected in native Australian mammals. *Vet Microbiol* 96, 1776187.

Booton GC, Kelly D J, Chu YW, Seal DV, Houang E, Lam DSC, Byers TJ, Fuerst PA. (2002). 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol.*; 40:162161625.

Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. (2005). Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol.*; 43 (4): 168961693.

Borel N, Doherr MG, Vretou E, Psarrou E, Thoma R, Pospischil A. (2004), Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland. *Prev Vet Med.*; 65:205-216.

Borel N, Thoma R, Spaeni P, Weilenmann R, Teankum K, Brugnera E, Zimmermann DR, Vaughan L, Pospischil A (2006). Chlamydia-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Vet Pathol.*; 43: 702-708.

Borel N, Ruhl S, Casson N, Kaiser C, Pospischil A, Greub G. (2007). *Parachlamydia* spp. and related Chlamydia-like organisms and bovine abortion *Emerg. Infect. Dis.*; 13: 1904-1907.

Borel N, Kempf E, Hotzel H, Schubert E, Torgerson P, Slickers P, Ehrlich R, Tasara T, Pospischil A y Sachse K. (2008) Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay a validation study. *Mol Cell Probes.*; 22: 55-64.

Borel N, Polkinghorne A, Pospischil A. (2018). A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists. *Vet Pathol.*; 55(3):374-390

Bowers B, Korn ED (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.* 41:786-805.

Brown MW, Spiegel FW, Silberman JD (2007). Amoeba at attention: phylogenetic affinity of *Sappinia pedata*. *J. Eukaryot. Microbiol.*; 54: 511-519.

Buendía AJ, Cuello F, Del Rio L, Gallego MC, Caro MR, Salinas J. (2001). Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Vet. Microbiol.*, 78, 229-239.

Campana JJ, Machain M, Basabe N, Allende Dave V, Romano L, Visciarelli E, Randazzo V, Costamagna S R. (2017). Primer caso de meningoencefalitis amebiana

primaria (MAP) por *Naegleria fowleri*, en Argentina. *Parasitología Latinoamericana*, 66 (3): 252-253.

Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun* 27(5): 359-69.

Casero R D, Mongi F, Laconte L, Rivero F, Sastre D, Teheránc A, Herrera G, Ramírez J D. (2017). Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infect Genet Evol.*; 54: 1706175.

Cavirani S, Cabassi CS, Donofrio G, De Iaco B, Taddei S, Flammini CF (2001). Association between *Chlamydia psittaci* seropositivity and abortion in Italian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 50, 1456151.

Centeno M, Rivera F, Cerva L, Tsutsumi V, Gallegos E, Calderón A, Ortíz R, Bonilla P, Ramírez E, Suárez G. (1996). *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningo encephalitis and bronchopneumonia. *Arch Med Res.*; 27:579-586.

Cermeño JR, Hernandez I, Yasin HE; Tinedo R, Sanches R, Pérez G et al (2006). Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Eidemiological study in Anzoategui State, Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 39 (3): 264-268.

Collingro A, Toenshoff ER, Taylor MW, Fritsche TR, Wagner M, Horn M (2005). Candidatus *Protochlamydia amoebophila*, an endosymbiont of *Acanthamoeba* spp. *Int J Syst Evol Micr.*; 55:186361866.

Committee on Bovine Reproductive Nomenclature (1972). Recommendations for standardizing bovine reproductive nomenclature. *Cornell Veterinary Medicine* ; 62: 216-237.

Condon K y Oakey J (2007). Detection of *Chlamydiaceae* DNA in veterinary specimens using a family-specific PCR. *Lett Appl Microbiol.*;45(2):121-7.

Corsaro D, Greub G (2006). Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev.*; 19(2):283-297.

Corsaro D, Venditti D (2004). Emerging chlamydial infections. *Crit Rev Microbiol.*; 30, 75-106.

Costamagna SR, Gertiser M, Visciarelli, Basabe N, Felice V. (2010). *Acanthamoeba* spp.: ecoepidemiología, biología, ultraestructura, patogénesis y diagnóstico en el hombre. *Salud (i) Ciencia*, 17(8):821-826.

Creer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM (1991). PCR amplification from formalin-embedded tissues-effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 95:1176124.

Cuevas M, Smoje G, Jofré L, Ledermann W, Noemí I, Berwart F, Latorre L, González B. (2006). Meningoencefalitis granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect*; 23 (3): 234-9

Culbertson CG, Smith JW, Minner JR (1958). *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science* 127(3313):1506.

Culbertson CG, Smith JW, Cohen H K, Minner JR (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* 35(1): 185-197.

Culbertson CG, Smith JW, Cohen HK & Miner JR (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* 35: 1856197.

D'Alessandro LP, Rossetti SB. (2007). Queratitis por *Acanthamoeba* en un paciente usuario de solución multipropósito de limpieza de lentes de contacto: Primer Caso en Argentina 2007. *Oftalmol Clin Exp.*; 1: 29-31.

Daft B, Visvesvara G, Read D, Kinde H, Uzal F, Manzer M. (2005). Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. J Vet Diagn Invest.; 17: 605-609.

De Jonckheere J; van de Voorde H. (1976). Differences in destruction of Cysts of Pathogenic and Nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 31(2): 294-297.

De Jonckheere JF (1987). Epidemiology. In Amphizoic amebae: human pathology, E. G. Rondanelli Ed. Piccin Nuova Libreria. Padua. p. 127-147.

De Jonckheere JF (1998). Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacer, including 5.8S, of *Naegleria* spp. Protist.; 149:221-228.

De Jonckheere JF (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. Acta Protozool. 41, 309-342.

De Jonckheere JF. (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. Protist. ; 155:89-103.

De Jonckheere JF, Brown S (2005). The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. Protist 156, 896-96.

De Jonckheere JF. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? Exp Parasitol.; 145: 2-9.

DeGraves FJ, Stemke-Hale K, Huang J, Johnston SA, Sykes KF, Schlapp T, Hehnen H R, Kaltenboeck B. (2002). Vaccine identified by in vivo genomic screening enhances fertility in cattle during environmental challenge with *Chlamydia*, p. 265-268. In J. Schachter (ed.), *Chlamydial infections*. Proceedings of the 10th International Symposium on Human Chlamydial Infection. International Chlamydia Symposium, San Francisco, California

DeGraves FJ, Gao D, Hehnen HR, Schlapp T, Kaltenboeck B (2003). Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitive real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. J Clin Microbiol. 41, 172661729.

DeGraves FJ, Kim T, Jee J, Schlapp T, Hehnen HR, Kaltenboeck B (2004). Reinfection with *Chlamydia abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydia*. Infect Immun. ; 72:253862545.

Derdour SY, Hafsi F, Azzag N, Tennah S, Laamar A, China B, Ghalmi F. (2017). Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. J Vet Res 61, 337-343.

Deuchande R, Gidlow J, Caldow C, Baily J, Longbottom D, Wheelhouse N, Borel N, Greub G. (2010). *Parachlamydia* involvement in bovine abortions in a beef herd in Scotland. Vet. Rec., 166. 598-599.

Di Cave D1, Monno R, Bottalico P, Guerriero S, D'Amelio S, D'Orazi C, Berrilli F. (2009). *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.; 28 (6):607-612

Dilbeck PM, Evermann JF, Crawford TB, Ward AC, Leathers CW, Holland CJ, Mebus CA, Logan LL, Rurangirwa FR, McGuire TC (1990). Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus J. Clin. Microbiol.; 28: 8146816.

Domeika M, Ganusauskas A, Bassiri M, Fröman G, Mårdh PA. (1994). Comparison of polymerase chain reaction, direct immunofluorescence, cell culture and enzyme immunoassay for the detection of *Chlamydia psittaci* in bull semen. Vet Microbiol.; 42(4):273-280.

Doughri AM, Yong S, Storz J. (1974) Pathologic changes in intestinal chlamydial infection of newborn calves. Am J Vet Res.; 35: 9396944.

Drozanski W (1956). Fatal bacterial infection in soil amoebae. Acta Microbiol Pol.; 5:3156317.

Drozanski W, Drozanska D (1961). Dead bacteria as a food for Amoebae. *Acta Microbiol Pol.*; 10:379-387.

Dunnebacke TH, Schuster FL, Yagi S & Booton GC (2004). *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology* 150: 2837-2842.

Dyková I, Lom J, Schroeder-Diedrich J M, Gregory C, Booton G C, Byers TJ (1999). *Acanthamoeba* Strains Isolated from Organs of Freshwater Fishes. *J Parasitol.*; 85(6):1106-1113.

Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes.*; 20:60-3.

Essig A, Longbottom D. (2015). *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Curr Clin Micro Rpt.* 2015; 2:22634

Everett K, Andersen A (1999 a.). Identification of nine species of *Chlamydiaceae* using PCR-RFLP. *Int J Syst Bacteriol* 49, 803-813.

Everett KD, Bush RM, Andersen AA (1999 b). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.*; 49:415-440.

Everett KD (2000). *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet Microbiol.*; 75: 109-126.

Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. (2015). Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.*; 60:275-282.

Fieni F, Oseikria M, Laroucau K, Vorimore F, Tainturier D, Destrumelle S, Pellerin JL. (2015). Risk of *Chlamydia abortus* transmission via embryo transfer using in vitro early bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 28(2):186-186 <https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab111>

Fiorentino A, Peralta M, Odeón A, Malena R, Borden R, Paolicchi F. (2001). Lesiones oculares en terneros con queratoconjuntivitis infecciosa bovina infectados experimentalmente y en forma natural con *Moraxella bovis*. *Rev. Medicina Veterinaria.*; 82 (3): 166-170.

Fiorentino M, Brunello G, Castro M, Cabral Ortiz D, Aguirre N, Villagran E, Vera T. (2015). Serología positiva a *Chlamydia abortus* en cabras con antecedentes de abortos del departamento Chamental, provincia de La Rioja, Argentina. 9^{no} Seminario de la Fundación ðCharles Louis Davisö en Argentina. Patología de los pequeños rumiantes y camélidos Sudamericanos, del 23 al 24 de septiembre de 2015, Salta- Argentina.

Frank E; Llorens E, Cabral D. (1994). Productividad de los pastizales de la provincia de La Pampa. INTA, EEA Guillermo Covas (Ed). Anguil. 167 pag.

Friedman M G, Dvoskin B, Kahane S. (2003). Infections with the chlamydia-like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen. *Microbes Infect.*; 5: 1013-1021.

Friedman MG, Kahane S, Dvoskin B, Hartley JW (2006). Detection of *Simkania negevensis* by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK. *J Clin Pathol.*; 59 (3):331-333.

Fritsche TR, Gautom RK, Seyedirashi S, Bergeron DI, Linquist, TD. (1993). Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.*; 31: 1122-1126.

Fritsche TR, Horn M, Wagner M, Herwig RP, Schleifer K-H, Gautom RK (2000). Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts

recovered from clinical and environmental *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.*; 66(6):2613-9.

Fuentealba I, Wikse S, Read W (1992). Amebic meningoencephalitis in a sheep. *J Am Vet Med Assoc.*; 200 (3):3636365.

Fuerst P A, Booton G C, Crary M. (2015). Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.*; 62: 696 84.

Fukumoto T, Matsuo J, Okubo T y H Yamaguchi. (2016). *Acanthamoeba* containing endosymbiotic chlamydia isolated from hospital environments and its potential role in inflammatory exacerbation. *BMC Microbiol.*; 16 (1):292.

Fukushi H, Hirai K. (1992). Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol.*; 42:306-308.

Funk L, O'Connor A M, Maroney M, Engelken T, Cooper V L, Kinyon J, Plummer P. (2009). A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivis (IBK) in beef calves. *Vaccine* 27:458564590

Gast R J, Ledee D R, Fuerst PA, Byers TJ (1996). Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.*; 43: 498-504.

Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Bokowski J, Chaljub G, Nauta HW, Visvesvara GS (2001). Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA.*; 2 85 (19):2450-2541.

Gelman BB, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf SJ, Nauta HW, Visvesvara GS. (2003). Neuropathological and ultrastructural features of amoebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 62 (10):990-998.

Gertiser ML, Visciarelli E, Basabe N, Perez MJ, Costamagna SR. (2010) a. Aislamiento de *Acanthamoeba* spp. de piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44(4): 697-703. ISSN: 0325-2957

Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Lujan H, Occhionero M, Paniccia L, Visciarelli E, Costamagna SR. (2010) b. Queratitis por *Acanthamoeba* spp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular, en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol.*; 42:122-125.

Giannitti F, Anderson M, Miller M, Rowe J, Sverlow K, Vasquez M, Cantón G. (2016). *Chlamydia pecorum*: fetal and placental lesions in sporadic caprine abortion. *Journal of J Vet Diagn Invest.* ; 28(2) 1846189.

Godin AC, Björkman C, Englund S, Johansson KE, Niskanen R, Alenius S. (2008). Investigation of *Chlamydophila* spp. in dairy cows with reproductive disorders. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 39.

Gokce H I, Kacar C, Genc O, Sozmen M. (2007). Seroprevalance of *Chlamydophila abortus* in aborting ewes and dairy cattle in the north-east part of Turkey. *Veterinary Bulletin* 51, 9-13

Goodfellow LP, Belcher JH, Page FC (1974). A light- and electron-microscopical study of *Sappinia diploidea*, a sexual amoeba. *Protistologica* 2, 2076216.

Gould S, Dewell R, Tofflemire K, Whitley R.D, Millman S T, Opriessnig T, Rosenbusch R, Trujillo J, O'Connor A M. (2013). Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. *Vet Microbiol.*; 164,1086115.

Grayston JT, Kuo CC, Campbell L A, Wang SP. (1989). *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int J Syst Bacteriol.*; 39:88-90.

Greub G y Raoult D (2002). Crescent bodies of *Parachlamydia acanthamoeba* and its life cycle within *Acanthamoeba polyphaga*: an electron micrograph study. *Appl Environ Microbiol.*; 68:3076-3084.

Greub G, Raoult D (2003). Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae. *Infect Control Hosp Epidemiol.*; 24:784-786.

Greub G, Raoult D (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev.*; 17 (2): 413-433.

Gupta S, Chahota R, Bhardwaj B, Malik P, Verma S, Sharma M. (2015). Identification of Chlamydiae and *Mycoplasma* species in ruminants with ocular infections. *Lett Appl Microbiol.*; 60 (2): 135-139.

Halberstädter L, Prowazek S (1907). Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin* 26: 44-47.

Haralambieva I, Iankov I, Petrov D, Ivanova R, Kamarinchev B, Mitov I. (2001). Cross-reaction between the genus-specific lipopolysaccharide antigen of *Chlamydia* spp. and the lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli* O119 and *Salmonella newington*: implications for diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* ;41 (3):99-106.

Hartmann M, Nagler K, (1908). Copulation bei *Amoeba diploidea* n. sp. Mit Selbstandigbleiben der Gametenkerne während des ganzen Lebenszyklus. *Sitzungsbericht der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin* 5, 112-125.

Hatch TP (1999). Developmental biology. In *Chlamydia: Intracellular biology, pathogenesis, and immunity* (ed. Stephens RS), pp. 29-68 American Society for Microbiology, Washington, DC.

Henning K, Schares G, Granzow H, Polster U, Hartmann M, Hotzel H, Sachse K, Peters M, Rauser M (2002). *Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf. *Vet. Microbiol.*, 85: 2856292.

Hewinson R, Griffiths P, Bevan B, Kirwan S, Field M, Woodward M, Dawson M. (1997) Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 54, 1556167.

Hinton D, Shipley A, Galvin J, Harkin J, Brunton R. (1993). Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *AustVet J.*; 70: 1746176.

Holliman A, Daniel RG, Parr JG, Griffiths PC, Bevan BJ, Martin TC, Hewinson RG, Dawson M, Munro R (1994). Chlamydiosis and abortion in a dairy herd. *Vet Rec.*, 134:500-502.

Horigan M.W. (2009). 14th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD), 17-20 Jun 2009. Madrid, Spain: *Chlamydia abortus* ó An evaluation of three commercial ELISAs.

Horn M, Wagner M, Muller K-D, Schmid EN, Fritsche TR, Schleifer K-H, Michel R (2000). *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*. 146: 1231-1239.

Horn M, Wagner M. (2001). Evidence for additional genus-level diversity of *Chlamydiales* in the environment. *FEMS Microbiol Lett* 204: 71674.

Horn M, Collingro A, Schmitz-Esser S, Beier CL, Purkhold U, Fartmann B, Brandt P, Nyakatura GJ, Droege M, Frishman D, Rattei T, Mewes HW, Wagner M. (2004) Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science*; 30: 304(5671):728-30.

Horn M (2008). Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62: 1136131.

Hosie B D. (2000) Ocular diseases. In Diseases of Sheep ed. Martin, W.B. pp. 301ó 305. Hobokan: Blackwell Science.

Hugo ER, Stewart VJ, Gast RJ y Byers T J. (1992). Purification of amoeba mtDNA using the UNSET procedure, En: Lee JJ and Soldo AT, editors. Protocols in protozoology. Allen Press, Lawrence, Kansa, 1992, 7.1

Hunt H, Orbell G, Buckle KN, Ha HJ, Lawrence KE, Fairley RA, Munday JS (2016). First report and histological features of *Chlamydia pecorum* encephalitis in calves in New Zealand. N Z Vet J.; 64 (6): 364-368.

Idtse FS. (1984). *Chlamydia* and chlamydial diseases of cattle: a review of the literature. Veterina O, Medicine, April, 543-51.

Igayara-Souza CA, Genovez ME, Ferreira F, Paulin LM, Scarcelli E, Cardoso MV, Turilli C. (2004). Ocorrência de anticorpos anti-*Chlamydophila* em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos. Revta Bras Reprod Anim 2004; 28: 28-33.

Jacobson ER, Telford SR (1990). Chlamydial and poxvirus infections of circulating monocytes of a flap-necked chameleon (*Chamaeleo dilepis*). J. Wildl. Dis. 26, 572ó 577.

Jayasekera S, Sissons J, Tucker J, Rogers C, Nolder D, Warhurst D. et al (2004). Post mortem culture of *Balamuthia mandrillaris* from the brain and cerebrospinal fluid of a case of granulomatous amoebic meningoencephalitis, using human brain microvascular endothelial cells. J Med Microbiol., 53:1007-1012

Jee J, DeGraves FJ, Kim T, Kaltenboeck B. (2004). High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. J. Clin. Microbiol. 42, 5664-5672.

Jelocnik M, Forshaw D, Cotter J, Roberts D, Timms P, Polkinghorne A (2014). Molecular and pathological insights into *Chlamydia pecorum*-associated sporadic bovine encephalomyelitis (SBE) in Western Australia. BMC Vet Res.; 10:121.

John DT (1993). Opportunistically pathogenic free-living amoebae. In Parasitic Protozoa, J. P. Kreier y J. R. Baker (Eds.). Academic Press, Nueva York. p. 140-246. J Water Health.; 8:71-82.

Juma A, Cera I, Boci J, Haxha L, Kreizinger Z, Gyuranecz M, Koleci X. (2013). Serological investigation on *Chlamydophila abortus* infection in cattle from Albania. Albanian J. Agric. Sci.; 12 (1): 99-102.

Kahane S, Gonen R, Sayada C, Elion J, Friedman MG (1993). Description and partial characterization of a new Chlamydia-like microorganism. FEMS Microbiol Lett.; 109: 3296333.

Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J (1991). Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29, 196961975.

Kaltenboeck B, Heard D, DeGraves FJ, Schmeer N. (1997) a. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortogenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. Journal of Clinical Microbiology 35, 229362298.

Kaltenboeck B, Schmeer N, Schneider R. (1997) b. Evidence for numerous omp1 alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR. J Clin Microbiol 35, 183561841.

Kaltenboeck B, Hehnen H-R, Vaglenov A. (2005). Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? Vet Res Comm., 29:1-15

Kahane S, Greenberg D, Friedman MG, Haikin H, Dagan R (1998). High prevalence of Simkania Z, a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis. J. Infect. Dis. 177, 142561429.

Kampinga G A, Schroder F P, Visser I J, Anderson J M, Buxton D, Moller A V. 2000. Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*; 144: 250062504

Karaku M, Töz S, Ertabaklar H, Pa a S, Atasoy A, Arserim S, Ölgen M, Alkan M, Durrant C, Özbel Y. (2016). Evaluation of conjunctival swab sampling in the diagnosis of canine leishmaniasis: A two-year follow-up study in Çukurova Plain, Turkey. *Vet Parasitol* 164: 23-26.

Kauffold J, Henning K, Bachmann R, Hotzel H, Melzer F. (2007). The prevalence of chlamydiae in bulls from six bull studs in Germany. *Anim Reprod Sci*, 102:111-121.

Kemble S, Lynfield R, DeVries A, Drehner D, Pomputius W, Beach M, Visvesvara G, da Silva A, Hill V, Yoder J, Xiao L, Smith K, Danila R (2012). Fatal *Naegleria fowleri* infection acquired in Minnesota: possible expanded range of deadly thermophilic organism. *Clin Infect Dis.*; 54 (6): 805-809.

Kemmerling K, Müller U, Mielenz M, Sauerwein H (2009) *Chlamydomonas* species in dairy farms: Polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany. *J Dairy Sci* 92: 43476-4354.

Khan NA (2001). Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.*; 43:391-395.

Khan NA (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.*; 30, 564-595.

Khan NA (2015). *Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis* (2nd edition). Caister Academic Pres., 334 pag.

Kilvington S, Mann PG, Warhurst DC (1991). Pathogenic *Naegleria amoebae* in the waters of Bath, a fatality and its consequences. In *Hot Springs of Bath*, G. A. Kellaway (ed.). Bath City Council, Reino Unido. p. 89-96.

Kinde H, Visvesvara G, Barr B (1998). Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* (leptomyxid amoeba) in a horse. *J Vet Diagn Invest.*; 10 (4):3786381.

Kingston D y Warhurst DC (1969). Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol.*; 2:27-36.

Kuo CC, Stephens RS, Bavoil PM, Kaltenboeck B. Genus I. *Chlamydia*. Jones, Rake and Stearns 1945, 55AL. In: Krieg N, Staley J, Brown D, Hedlund B, Paster B, Ward W, et al. editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. vol 4. New York, USA: Springer-Verlag; 2011. pp. 8466865.

Laboratorio de Diagnóstico Veterinario Azul. Diagnóstico de Síndromes. Hoja de resultados. Disponible en: http://laboratorioazul.com.ar/images/01labazul/pdf/HOJA_DE_RESULTADOS_Manual_de_SINDROMES_actualizada_al_31-12-2013.pdf

Lagkouvardos I, Shen J, Horn M. (2014). Improved axenization method reveals complexity of symbiotic associations between bacteria and *Acanthamoebae*. *Environ Microbiol Rep.*; 6(4):383-388.

Lares-Jiménez LF, Booton GC, Lares-Villa F, Velázquez-Contreras CA, Fuerst PA. (2014). Genetic analysis among environmental strains of *Balamuthia mandrillaris* recovered from an artificial lagoon and from soil in Sonora, Mexico, *Experimental Parasitology*, 145:57-61. ISSN 0014-4894. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.007>.

Laroucau K, Souriau A, Rodolakis A (2001) Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using omp genes. *Vet Microbiol* 82, 1556164.

Levine N (1961). *Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man*. Burgess, 436 pag.

Livingstone M, Longbottom D (2006). What is the prevalence and economic impact of chlamydial infections in cattle? The need to validate and harmonise existing methods of detection. *Vet J* 172: 365.

Liu QY, Xu MJ, Fu JH, He XH, Shi DS, Cui KQ, Guan SS, Wang YN. (2013). Seroprevalence of *Chlamydia* infection in dairy cattle in subtropical southern China. *Afr. J. Microbiol. Res.*; 7 (19): 2010-2013.

Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR, Russell AD (2001). Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J Eukaryot Microbiol* 48: 11616.

Longbottom D, Psarrou E., Livingstone M, Vretou E. (2001). Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 195, 1576161.

Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. (2002). Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 423564243.

Longbottom D, Coulter LJ. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol.* ; 128, 217-244.

Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B. (2007). Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res.*; 102(1):167-169.

Lorda H, Roberto Z, Bellini Saibene Y, Sipowicz A, Belmonte ML. (2008). Descripción de zonas y subzonas agroecológicas. RIAP. Área de influencia de la EEA Anguil. Disponibles en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-dt_96_zonas_riap.pdf

Lorenzo-Morales J, Marciano-Cabral F, Lindo JF, Visvesvara GS, MacIver SK (2010). Pathogenicity of amoebae. *Exp Parasitol.*; 126:2-3.

Lozano-Alarcon F, Bradley G, Houser B, Visvesvara G. (1997). Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in a South American tapir. *Vet Pathol.*; 34:2396244.

Ly T, Müller H (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol.*; 33:51654.

Macedo M F S, Macedo C A, Ewald M P, Martins G F, Zulpo D L, Cunha I A, Taroda A, Cardim S T, Su C, Garcia J L. (2012). Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal* 21 (1): 74-77.

Magliano AC, da Silva FM, Teixeira MM, Alfieri SC (2009). Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* spp. isolated from tap water in Brazil. *Exp. Parasitol.* 123 (3), 2316-235.

Marciano-Cabral F y Cabral G (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev.* 16 (2): 2736307.

Martinez AJ y Visvesvara GS (2001). *Balamuthia mandrillaris* infection (editorial). *J Med Microbiol* 50: 2056207.

Marsilio F, Di Martino B, Di Francesco C E, Meridiani I. (2005). Diagnosis of chlamydial abortions by PCR-RFLP performed on vaginal swabs. *Vet. Res. Commun.*; 29(1):99-106

Maurer P, Lücker E, Riehn K. (2016). Slaughter of pregnant cattle in German abattoirs: current situation and prevalence: a cross-sectional study. *BMC Veterinary Research.*; 12:91. doi:10.1186/s12917-016-0719-3.

McNutt SH, Waller EF (1940). Sporadic bovine encephalomyelitis. *Cornell Vet.*; 30: 437-448.

Menghi C, Caride MC, Gatta C. (2012). *Acanthamoeba* sp.: un caso de queratitis no relacionada con el uso de lentes de contacto. *Rev Argent Microbiol.*; 44: 275-277

Messmer T, Skelton S, Moroney J, Daugharty H, Fields B. (1997) Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 35, 2043-2046.

Michel R, Müller KD, Hauröder B, Zöller L (2006). Isolation of *Saccamoeba limax* simultaneously harboring both a Chlamydia-like endoparasite and a rod-shaped bacterium as endosymbionts. *Endocytobiosis Cell Res.*; 17 (2): 171-179.

Morales J, Chaves A, Visvesvara G, Dubey J (2006). *Naegleria fowleri* associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Vet Parasitol.* ; 139: 221-223.

Moulder JW (1991.). Interaction of Chlamydiae and Host Cells In Vitro. *Microbiol Rev.* 5 (1): 143-190.

Moulder JW. *Chlamydiales*. In: Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. Krieg NR, Holt JG, Eds. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1984.

Nabeya M, Kaneko K, Ogino H, Nakabayashi D, Watanabe T, Murayama J, Hayashi K, Fukushi H, Yamaguchi T, Hirai K, Inaba Y, Matumoto M. (1991). Abortion in Japanese cows caused by *Chlamydia psittaci*. *Vet Microbiol.*, 29:261-265.

Nägler K (1909). Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amöben. *Archiv für Protistenkunde* 15, 1653. Publishing Co., Minneapolis, MN.

Niemczuk K. (2005). Prevalence of antibodies against *Chlamydia psittaci* and *Chlamydophila abortus* in cattle in Poland. A preliminary report. *Bull Vet Inst Pulawy.*, 49: 293-297.

Odeón A, Paolicchi F, Cambessies G, Margueritte J. (2006). Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/ojo/83-queratoconjuntivitis.pdf (Consulta: 25/04/2017).

Ohtani A, Kubo M, Shimoda H, Ohya K, Iribe T, Ohishi D, Endoh D, Omatsu T, Mizutani T, Fukushi H, Maeda K. (2015). Genetic and antigenic analysis of *Chlamydia pecorum* strains isolated from calves with diarrhea. J Vet Med Sci.; 77(7):777-782.

Ortega N, Navarro JA, Nicolás L, Buendía AJ, Caro MR, Del Río L, Martínez CM, Cuello F, Salinas J, Gallego MC. (2007). Evaluation of Chlamydomydia abortus DNA extraction protocols for polymerase chain reaction diagnosis in paraffin-embedded tissues. J Vet Diagn Invest.; 19(4):421-425.

Osman K M, Ali H A, ElJakee J A, Galal H M. (2014). Prevalence of *Chlamydomydia psittaci* infections in the eyes of cattle, buffaloes, sheep and goats in contact with a human population. Transbound Emerg Dis.;60 (3):245-251.

Otter A, Twomey DF, Rowe NS, Tipp JW, McElligott WS, Griffiths PC, O'Neill P. (2003). Suspected chlamydial keratoconjunctivitis in British cattle. Vet Rec 152:7876-788.

Otaño C. (2002). Mercado de la Carne Vacuna en Argentina. INTA. Revista IDIA XXI: N°2 Julio. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/carne/carnem03.pdf>

Otter A, Twomey D, Rowe N, Tipp J, McElligott W, Griffiths P, O'Neill P. (2003). Suspected chlamydial keratoconjunctivitis in British cattle. Veterinary Record 152: 7876-788.

Page LA (1966). Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydomydia* Jones, Rahe and Stearns 1945. Int. J. Syst. Bacteriol.; 16: 223-252.

Page FC (1967). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J. Protozool. 14, 709-724.

Page LA (1968). Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns 1945. Int. J. Syst. Bacteriol.; 18: 51666.

Page FC. (1976). An illustrated key to freshwater and soil amoebae: with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association, Publisher, 155 pag.

Page FC (1988). A New key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK.

Perez-Martinez J A. (1985). Las más importantes enfermedades genitales de los bovinos (profilaxis, tratamiento, higiene de la recogida del esperma). Rev Sci Tech.; 4 (1): 89-109.

Perez-Martinez JA, Storz J. (1985). Chlamydial infections in cattle Part 1, Part 2. Mod Vet Pract 66 5176522, 6036608.

Perez-Martinez JA, Schmeer N, Storz J. (1986). Bovine chlamydial abortion: serodiagnosis by modified complement-fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay. American Journal of Veterinary Research, 47: 1501-1506.

Petit T, Spersger J, Aurich J, Rosengarten R (2008). Prevalence of *Chlamydiaceae* and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. Veterinary Microbiology 127, 3256333.

Polkinghorne A, Borel N, Becker A, Lu ZH, Zimmermann D R, Brugnera E, Pospischil A Vaughan L. (2009). Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. Vet Microbiol., 135; 1426146.

Pospischil A, Thoma R, von Bomhard W, Reitt K, Cantieni J, Zimmermann D, Polkinghorne A. (2002). Abortion in cattle caused by *Chlamydia psittaci*. Schweiz Arch Tierheilkd.; 144(9):467-472.

Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Gebbers J O. (2002). Abortion in women caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). Swiss Med. Wkly.; 132:64666.

Pospischil A, Borel N, Andersen A A. (2010). *Chlamydia*, pp 575-587. Gyles, C. L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C.O. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Fourth Edition. Wiley -Blackwell. A. John Wiley and Sons, Inc., Publication

Poudel A, Elsasser TH, RahmanKhS, Chowdhury EU, Kaltenboeck B. (2012) Asymptomatic endemic *Chlamydia pecorum* infections reduce growth rates in calves by up to 48 percent. PLoSOne.; 7(9):e44961.

Pourquier P, Rodalakis A, Mohamad KY. (2007). Preliminary validation of a new commercial ELISA kit for the detection of antibodies directed against *C. abortus*. WAVLD Conference, Melbourne, Australia

Praga-Ayala A R, Montes de Oca-Jiménez R, Ortega-Santana C, Salem AZ, Cubillos-Godoy V, Fernández-Rosas P, Monroy-Salazar HG. (2014). Low seroprevalence of *Chlamydia abortus* in dairy cows of hot environment in southern of Mexico. Life Science Journal; 11(11): 790-793.

Proca-Ciobanu M (1975). Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. Int J Parasitol.; 5:49656.

Pushkarew BM (1913). Über die Verbreitung der Süßwasser protozoen durch die Luft. Arch Protistent 23: 3236362.

Pussard M (1966). Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931(Hartmannellidae-Amoebida). Protistologica 2: 71693.

Putt S, Shaw A, Woods A, Tyler L, James A. (1988). Veterinary epidemiology and economics in Africa. A manual for use in the design and appraisal of livestock health policy. Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit, Department of Agriculture, University of Reading, Reading, Berkshire, England. Second Ed. ISBN 92-9053-076-6. 154 p.

Randazzo V V, Lucchi L, Costamagna, S. (2017). *Naegleria fowleri*, un emergente en Argentina. Parasitología Latinoamericana, 66 (3): 432-433.

Reed KD, Ruth GR, Meyer JA, Shukla SK. (2000). *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). Emerg Infect Dis.; 6(2):196-199.

Reggiardo C, Fuhrmann TJ, Meerdink GL, Bicknell EJ. (1989). Diagnostic features of chlamydia infection in dairy calves. J Vet Diagn Invest.; 1: 305-308.

Reinhold P, Jaeger J, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Bachmann R, Schubert E, Melzer F, Elschner M, Sachse K. (2008). Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. Vet J.;175(2):202-11.

Reinhold P, Sachse K, Kaltenboeck B (2011). *Chlamydiaceae* in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? Vet J.; 189: 257-267.

Regoudis E y Pelandakis M. (2016). Detection of the free living amoeba *Naegleria fowleri* by using conventional and real-time PCR based on a single copy DNA sequence. Exp Parasitol.; 161: 35-39.

Reitt K, Hilbe M, Voegtlin A, Corboz L, Haessig M, Pospischil A. (2007). Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995--a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.; 54(1):15-22.

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

Rodríguez Fermepín M, Ranea FG, Samartino L, Decristofano MA, Mestre M, Pereira J, Planes N, De Torres RA (1995). Evidencia serológica de la infección por *Chlamydia* spp. En bovinos y porcinos de la provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet (B Aires)*; 79 (2): 97-100.

Rodríguez Fermepín M, Entrocassi AC. *Chlamydiales*. En: Basualdo JA, Coto CE, de Torres RA, editores. *Microbiología Biomédica*, 2da. Edición. Buenos Aires, Argentina, Atlante, 2006, p. 509-527.

Rodríguez-Domínguez M, Sanbonmatsu S, Salinas J, Alonso R, Gutiérrez J, Galán JC (2014). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 32(6):380-385.

Rodríguez-Zaragoza S (1994). Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol.* 20: 225-241.

Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M (1998). Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol.*; 64:182261824.

Rojas M, Perez L, Esaín F, Fort M. Principales agentes infecciosos involucrados en las pérdidas reproductivas del ganado bovino en la región semiárida Pampeana. Casuística 2004-2011 en Avances en investigación en Salud Pública Veterinaria en la Provincia de la Pampa; EEA Anguil òIng. Agr. Guillermo Covasö Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2014; Anguil, La Pampa. Argentina. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_pt97_salud_publica_veterinaria.pdf (Consultado: 27/03/2017).

Rosenbusch R F. (1983). Influence on mycoplasma preinfection on the expression of *Moraxella bovis* pathogenicity. *Am J Vet Res* 44: 162161624.

Rowbotham TJ (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.*; 33: 1179-1183.

Rowbotham TJ (1986). Current views on the relationships between amoebae, Legionellae and man. *Isr J Med Sci.*; 22:678-689.

Ruhl S, Casson N, Kaiser C, Thoma R , Pospischil A, Greub G, Borel N. (2009). Evidence for *Parachlamydia* in bovine abortion. *Veterinary Microbiology* 135, 169-174.

Rurangirwa FR, Dilbeck PM, Crawford TB, McGuire TC, McElwain TF (1999). Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 8661044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*; 49: 577-581.

Sachse K y Hotzel H (2003). Detection and differentiation of chlamydiae by nested PCR. *Methods in Molecular Biology* 216, 123-136. In K. Sachse and J. Joachim (ed.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 216: PCR Detection of Microbial Pathogens. ISBN: 1-58829-049-2, Humana Press, Totowa, NJ, USA

Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (Review). *Veterinary Microbiology* 135, 262-1.

Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy HH, Weidmann M, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruettger A, Bavoil PM, Hufert FT, Rosselló-Móra R, Marz M (2014). Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.*; 37(2):79-88.

Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens RS, Kuo C-C, Rosselló-Móra R, Horn M (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: Proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst. Appl. Microbiol.*; 38: 99-103.

Sachse K, Shamsur Rahman K, Schnee C, Müller E, Peisker M, Schumacher T, Schubert E, Ruettinger A, Kaltenboeck B Ehrlich R. (2018). A novel synthetic peptide microarray assay detects *Chlamydia* species-specific antibodies in animal and human sera. *Sci Rep.*; 8(1):4701. doi: 10.1038/s41598-018-23118-7.

Saldias ME; Lecocq C; Quezada M; Avila C, Segovia MJ. (2014). Aborto enzoótico ovino (AEO) en Chile. Implementación de técnicas de laboratorio. *Boletín Veterinario Oficial*, BVO N° 17, 2014 (número inédito). Disponible en: http://www.sag.cl/sites/default/files/aborto_enzootico_ovino_saldias_et_al-web2016.pdf

SaltiósMontesanto V, Tsoli E, Papavassiliou P, Psarrou E, Markey BM, Jones GE, Vretou E. (1997). Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, 58, 2286-235.

Sanden G, Morrill W, Fields B, Breiman R, Barbaree J (1992). Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl Environ Microbiol.* ; 58:2001-2004.

Scaglia M (1997). Human pathology caused by free-living amoebae. *Ann Ist Super Sanita.* ; 33 (4): 551-566.

Schachter J (1989). Why we need a program for the control of *Chlamydia trachomatis*. *N Engl J Med.*; 320(12):802-804.

Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ (2001). Use of subgenus 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 39: 1903-1911.

Schuster F L (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*; 15, 342-354.

Schuster F L, Dunnebacke T H, Booton G C, Yagi S, Kohlmeier C K, Glaser C, Vugia D, Bakardjiev A, Azimi P, Maddux-González M, Martínez A J, Visvesvara G S (2003). Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. J Clin Microbiol; 41:3175-80.

Schuster FL, Visvesvara GS (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of human and animals. Int J Parasitol.; 34:1-27.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria (SENASA) (2018). Cadena Animal. Estadística Nacional. Disponible <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas> (Consultado: 22/04/2019).

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria (SENASA) (2002). Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina. Resol. 150/2002.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria (SENASA) (2008). Programa de control y erradicación de enfermedades venereas en bovinos de la provincia de La Pampa. Resol. 358/2008.

Shewen P. (1980). Chlamydial Infection in Animals: A Review. Can Vet J.; 21(1): 26-31.

Siddiqui R, Khan NA (2015). *Balamuthia mandrillaris*: Morphology, biology, and virulence. Trop Parasitol.; 5:15-22. Disponible en: <http://www.tropicalparasitology.org/text.asp?2015/5/1/15/149888>.

Singh BN. (1950). Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. Phil Trans R Soc Lond [Biol] ss236: 4056461.

Stamp J T, McEwen A D, Watt J A, Nisbet, D. (1950). Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. Vet. Rec., 62, 251-254

Steinert M, Birkness K, White E, Fields B, Quinn F (1998). *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.*; 64:2256-2261.

Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, KoononEV, Davis RV (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*; 282:638-639.

Storz J, Smart RA, Marriott ME, Davis RV. (1966). Polyarthrititis of calves: isolation of psittacosis agents from affected joints. *Am J of Vet Res.*; 27: 633-641.

Storz J, Carroll EJ, Ball L, Faulkner LC. (1968). Isolation of a psittacosis agent (*Chlamydia*) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. *Am J Vet Res.*; 29(3):549-555.

Storz J, Page L A. (1971). Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia* family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales* ord. nov. *Int J Syst Bacteriol.*; 21:332-334.

Storz J, Carroll EJ, Stephenson EH, Ball L, Eugster AK (1976). Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of bulls and rams with chlamydiae. *Am J Vet Res.*, 37:517-520.

Stuen S, Longbottom D. (2011). Treatment and control of chlamydial and rickettsial infections in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*;27 (1):213-233.

Szyma ska-Czerwi ska M, Niemczuk K, Gali ska E M. (2013). Serological and nested PCR survey to determine the occurrence of chlamydia infections in the Polish cattle population. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20 (4): 682-686.

Talafha AQ, Ababneh MM, Ababneh MM, Al-Majali AM. (2012). Prevalence and risk factors associated with *Chlamydophila abortus* infection in dairy herds in Jordan. Trop Anim Health Prod.; 44: 184161846.

Tang FF, Huang YT, Chang HL, Wong KC (1957). Isolation of trachoma virus in chick embryo. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.; 1: 109-120.

Taylor-Brown A, Vaughan L, Greub Gilbert, Timms P, Polkinghorne A (2015). Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. Pathog Dis.; 73: 1615.

Teankum K, Pospischil A, Janett F, Brugnera E, Hoelzle LE, Hoelzle K, Weilenmann R, Zimmermann DR, Gerber A, Polkinghorne A, Borel N. (2007). Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. Theriogenology 67, 3036310.

Terzolo HR, Argento E, Catena MC, Cipolla AH, Tejada G, Villa C. (1992). Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Campylobacteriosis y Tricomoniosis Genital Bovina. Documento de la Comisión Científica Permanente de Enfermedades Venéreas de los Bovinos. Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina.

Thomas V, Casson N, Greub G. (2006). *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine riverwater using amoebal co-culture. Environ Microbiol.; 8: 212562135.

Thomsen JL. (1974). Body length, head circumference and weight of bovine fetuses: prediction of gestational age. J Dairy Sci.; 58:137061373.

Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. Pathol Biol (Paris). 2012; 60 (6):399-405.

Trávnicek M, Balascák J, Balatý B, Dravecký T. (1980). Isolation of *Chlamydia psittaci* from bull ejaculate. *Vet Med (Praha)*; 25(11):669-673.

Travnicek M, Kovacova D, Bhide MR, Zubricky P, Cislakova L. (2002). Detection of IgG antibodies against *Chlamydia abortus* in sheep with reproductive disorders. *Acta Veterinaria*, 73, 95-99.

Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology* (3rd ed). Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. 2005; 238-240.

Turner NA, Russell AD, Furr JR, Lloyd D (2000). Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chem* 46: 27634.

Twomey DF, Griffiths PC, Hignett BC, Martin TP. (2003). Suspected chlamydial polyarthritis in a calf in the UK. *Vet Rec.*; 152 (11): 340.

Valladares M, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Dorta-Gorrín A, Wagner C, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J. (2015). Molecular characterization of *Acanthamoeba* strains isolated from domestic dogs in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Arch Microbiol.*; 197 (5):639-643.

Vázquez P, Ádema E, Fernandez B. (2013). Dinámica de la fenología de la vegetación a partir de series temporales de NDVI de largo plazo en la provincia de La Pampa. *Ecología Austral* 23:77-86.

Vázquez P, Fort M, Otermin H, Goyeneche P, Sago J, Baldone V, Fuchs L, Rojas M, Campero C. (2012). Enfermedades de transmisión sexual en La Pampa, Argentina: impacto del plan de control provincial. *Vet. Arg.* 29 (292). Disponible en: <http://www.veterinariargentina.com/revista/2012/08/enfermedades-de-trasmision-sexual-en-la-pampa-argentina-impacto-del-plan-de-control-provincial/>

Venzano AJ, Morris WE, Craig MI, Blanco Viera FJ, Lagomarsino A, Rodríguez Fermepín M, Funes DV. (2008). Mortalidad perinatal en terneros por *Chlamydiaceae*. V Taller Internacional de Infecciones por *Chlamydia* en Humanos y Animales, del 27 al 29 de noviembre del 2008, Buenos Aires (Argentina).

V zník Z, Svecová D, Pospíšil L, Diblíková I. (1996). Detection of chlamydiae in animal and human semen using direct immunofluorescence. *Vet Med (Praha)*; 41(7):201-206.

Visvesvara GS, Martínez AJ, Schuster FL, Leitch G, Wallace SV, Sawyer TK. (1990). Leptomyxid amoeba: new agent of amebic meningoencephalitis in human and animals *J Clin Microbiol*, 28: 2750-2756.

Visvesvara GS, Schuster FL & Martinez AJ. (1993). *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* 40: 5046514.

Visvesvara G, de Jonckheere J, Sriram R, Daft B (2005). Isolation and molecular typing of *Naegleria fowleri* from the brain of a cow that died of primary amebic meningoencephalitis. *J Clin Microbiol.*; 43: 420364204.

Visvesvara G, Moura H, Schuster F (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* ; 50(1):1626.

Visvesvara G, Schuster F (2008). Opportunistic free-living amoebae, Part II. *Clin Microbiol Newsletter.*; 30(21):159-166.

Visvesvara G, Yoder J, Beach M. (2012). Primary Amebic Meningoencephalitis-73. *Netter's Infectious Diseases*: 4426447.

Vlahovic K, Dovc A, Zupancic Z, Pavlak M, Jercic J. (2001) Comparison of serological procedures for diagnosis of infection with *Chlamydia* sp. in bovines. *Veterinarski. arhiv.*; 71: 367-380.

Volkonsky M (1931). *Hartmanella castellanii* classification des hartmannelles. *Arch Zool Exp Gen* 72:3176339.

Vorimore F, Hsia RC, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A, Sachse K, Bavoil P, Myers G, Laroucau K. (2013). Isolation of a new *Chlamydia* species from the feral sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. PLoS One. 20;8(9): e74823.

Walder G., Hotzel H, Brezinka C, Gritsch W, Tauber R, Würzner R, Ploner F. (2005). An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydophila abortus*. Obstet. Gynecol.; 106: 121561217.

Walker E, Lee E, Timms P, Polkinghorne A. (2015). *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: a common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. Vet J 206 (3): 252-260.

Walker E, Moore C, Shearer P, Jelocnik M, Bommana S, Timms P, Polkinghorne A (2016). Clinical, diagnostic and pathologic features of presumptive cases of *Chlamydia pecorum*-associated arthritis in Australian sheep flocks. BMC Vet Res.; 12: 193.

Walochnik J, Wylezich C, Michel R (2010). The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. Exp Parasitol.; 126(1):4-13.

Walochnik J, Scheikla U, Haller-Schoberb EM. (2015). Twenty Years of Acanthamoeba Diagnostics in Austria. J Eukaryot Microbiol, 62: 3611

Wang FI, Shieh H, Liao YK. (2001). Prevalence of *Chlamydophila abortus* infection in domesticated ruminants in Taiwan. J Vet Med Sci 63, 121561220.

Weekers P H, Gast, R J, Fuerst P A, Byers T J (1994) Sequence variations in small-subunit ribosomal RNAs of *Hartmannella vermiformis* and their phylogenetic implications. Mol Biol Evol.; 11:684-690.

Wehrend A, Failing K, Hauser B, Jäger C, Bostedt H (2005). Production, reproductive, and metabolic factors associated with chlamydial seropositivity and reproductive tract antigens in dairy herds with fertility disorders. Theriogenology; 63(3):923-930.

Wheelhouse N, Katzer F, Wright F, Longbottom D (2010). Novel chlamydia like organisms as cause of bovine abortions, UK. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (8):1323-1324

Wheelhouse N; Sait M, Gidlow J , Deuchande R, Borel N Baily J, Caldow G, Longbottom D. (2011). Molecular detection of Chlamydia-like organisms in cattle drinking water. *Vet Microbiol.*; 152: 1966199.

Wheelhouse N, Howie F, Gidlow J, Greub G, Dagleish M, Longbottom D. (2012). Implicación de Parachlamydia en abortos bovinos en Escocia. *Vet J.*; 193 (2): 586-588.

Wheelhouse N, Longbottom D, Willoughby K. (2013). Chlamydia in cases of cattle pneumonia in Scotland. *Vet Rec.*; 172 (4): 110.

Wheelhouse N, Mearns R, Willoughby K, Wright E, Turnbull D, Longbottom D. (2015). Evidence of members of the *Chlamydiales* in bovine abortions in England and Wales. *Veterinary Record*. doi: 10.1136/vr.103075.

Wheelhouse N, Flockhart A, Aitchison K, Livingstone M, Finlayson J, Flachon V, Sellal E, Dagleish MP, Longbottom D. (2016). Experimental challenge of pregnant cattle with the putative abortifacient *Waddlia chondrophila*. *Sci Rep.*; 6, 37150. <http://doi.org/10.1038/srep37150>.

Wilson MR, Thomson RG (1968). *Chlamydia pneumonia* of calves. *Research in Veterinary Science* 9: 4676473.

Wilson K, Sammin D, Harmeyer S, Nath M, Livingstone M, Longbottom D. (2012). Seroprevalence of chlamydial infection in cattle in Ireland. *Vet J.*; 193 (2):583-585.

Winiiecka-Krusnell J, Linder E (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol.*; 152:613-619.

Winters LM, Green WW, Comstock RE. (1942). Prenatal development of the bovine. In: Minnesota technical bulletin 151. Agricultural Experiment Station, University of Minnesota, 1942:1643.

Wittenbrink M M, Schoon HA, Bisping W, Binder A. (1993). a. Infection of the bovine female genital tract with *Chlamydia psittaci* as a possible cause of infertility. *Reprod Dom Anim.*; 28: 1296136.

Wittenbrink MM, Schoon HA, Schoon D, Mansfeld R, Bisping W (1993). b. Endometritis in cattle experimentally induced by *Chlamydia psittaci*. *Journal of Veterinary Medicine B* 40, 4376450.

Wittenbrink MM. (2002). Chlamydien bei Rindern und Schweinen und ihr zoonotisches Potential. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*; 109: 4526453.

World Health Organization. Biorisk management, Laboratory biosecurity guidance. (2006). Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2006_6.pdf (Consultado: 25/04/2017)

Wu L, Ge G, Zhu G, Gong S, Li S, Wan J. (2012). Diversity and composition of the bacterial community of Poyang Lake (China) as determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *World J Microbiol Biotechnol*, 28 (1):2336244.

Wylezich C, Walochnik J, Creer D, Michel R, Kudryavtsev A (2015). Electron Microscopical Investigations of a New Species of the Genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* sp. Nov., Reveal a Dictyosome in this Genus. *Acta Protozool.* 54: 45651.

Wylezich C, Walochnik J, Michel R (2009). High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations. *Parasitol. Res.* 105: 8696873.

Yamaguchi T, Yamazaki T, Inoue M, Mashida C, Kawagoe K, Ogawa M, Shiga S, Nakagawa Y, Kishimoto T, Kurane I, Ouchi K, Ohzeki T. (2005), Prevalence of antibodies against *Simkania negevensis* in a healthy Japanese population determined by the microimmunofluorescence test. *FEMS Immunol Med Microbiol.*; 43: 21627.

Yin L, Schautteet K, Kalmar ID, Bertels G, Van Driessche E, Czaplicki G, Borel N, Longbottom D, Frélin D, Dispas M, Vanrompay D. (2014). Prevalence of *Chlamydia abortus* in Belgian ruminants. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, 83: 164-170.

Zhou DH, Zhao FR, Xia HY, Xu MJ, Huang SY, Song HQ, Zhu XQ. (2013). Seroprevalence of chlamydial infection in dairy cattle in Guangzhou, southern China. *Irish Veterinary Journal*, 66(1), 2. <http://doi.org/10.1186/2046-0481-66-2>.

Zielinski G, Piscietelli G. (1997). Sanidad en invernada: Parasitosis gastrointestinal, queratoconjuntivitis infecciosa, enfermedades virales, plan sanitario. Córdoba, Agro cap. 6:141-164.

ANEXO I**SECUENCIAS**

Genotipos de *Acanthamoeba* spp. Hallados mediante secuenciación del gen ADNr 18S

T4

>IRU

NNNTTTGGCAGCGCGAGGAGTACGGCCCTGAAAAGTAGGGATAGTTGGGGGCA
TTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCCTTGTATTTATGAAAGATTAACCCCG
CGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATC
GAAGACGATCAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCAACAGCGAT
TAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCCTCGGCGCGGTCGTCTTGGCGTGC
GGCTTCTCGGCGGCNNNNN

>OF

NNNNNAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCTATTTTCA
GTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGG
CATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCCTTGGATTTATGAAAGATTAACCTC
TGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGA
TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCG
ATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTCGTCCCTGGCTCG
TCGTCTACGACGGCGGGCGGGGGCGGTTTAGCCCGATGGCACCGGTGAATGAC
TCCCCTANNN

>LV

NNNNNATTTTCTGCCCCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTG
TCCTCTATTTTCAAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAG
GGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCCTTGGATTTATG
AAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAAC
GAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACG
ATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGT
CGTCCNTGGN

>HLP

NNNTTCTGCCCCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGNCCTCC
TATTTTCAAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATA
GTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATCCTTGGATTTATGAAAGA
TTAACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAG
TTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCC
GACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTCGTCC
TTGGCGTCTCGGTCTTACGGGGCCGGGGCGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGG
CACCGGTGAATGACTCCCCTANNNNNNNNGGGGANA

>CV_INTA

NNNNGTGAGAGCAGCTTGTGAGAAGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTTTTA
TTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTT
GGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGATTA
TTCCCGCAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTA
GGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGAC
CAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTTCGTCCCTG
GCTCGTCGTCTCACGACGGCGGGCGGGGGCGGTTTAGCCCGATGGCACCGGTGA
ATGACTCCCCTAGCAGCTTGTGAGAATTTTTANNN

T5

>LP DG

NNNNTTTTCCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGA
CCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTGTTTATACAGCGAGGTTTCATCAGGGTAATGATT
AATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGA
TTTATGAAAGATTAACCTCTGCGAAAGCGTTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCA
AGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT
AACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCCTGTTAGT
TCTCTTCGGGGACTAATAGTTGGTGAATGACTCCCCTAGCACTTTGTGAGAANN
NNNNN

T15

>MZ_INTA

NNNNNACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTGCGTG
TTGGTTTTTCGAGGACCGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATAT
TTAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGATTGACTTCTGCGAAAGC
ATCTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACG
ATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGA
CGTTGAATACAAAACACCACCGTCGGGTGCGCCGTCTTGGCCATCTCGTGCGC
CGCGAGGCGTGCGCGGTGGCGAGGGCGGTGTCTGCCCGACGGCCCGGTGAATG
ACTCCCCTAGCAGNNTGTGAGAAANNNN

Endosimbiontes del orden *Chlamydiales* hallados en *Acanthamoeba* spp.

Neochlamydia sp.

>endosimbionte_Acanthamoeba_LaPampa

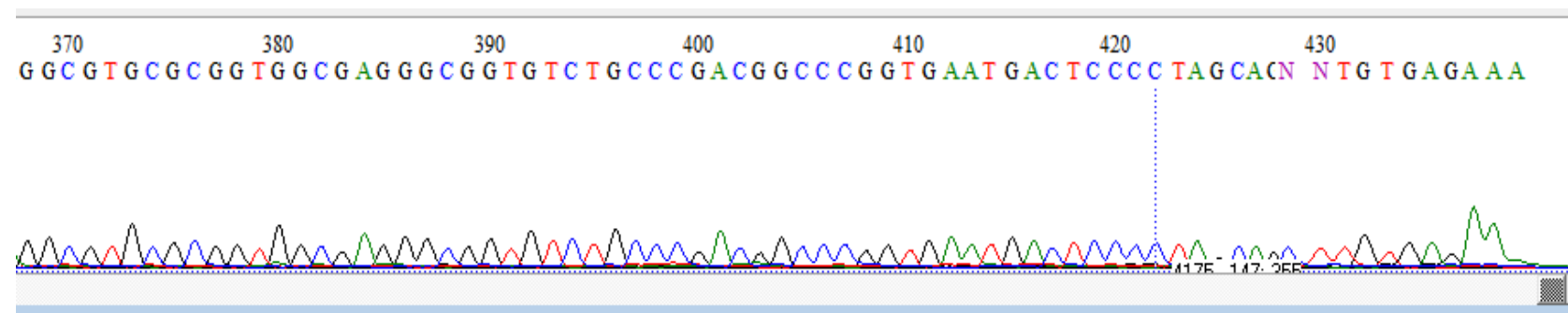
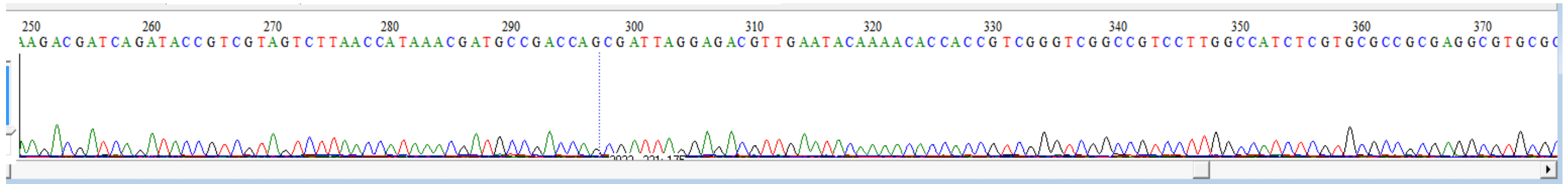
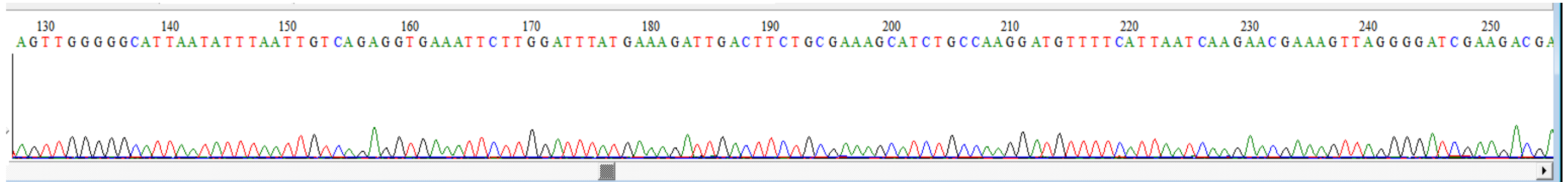
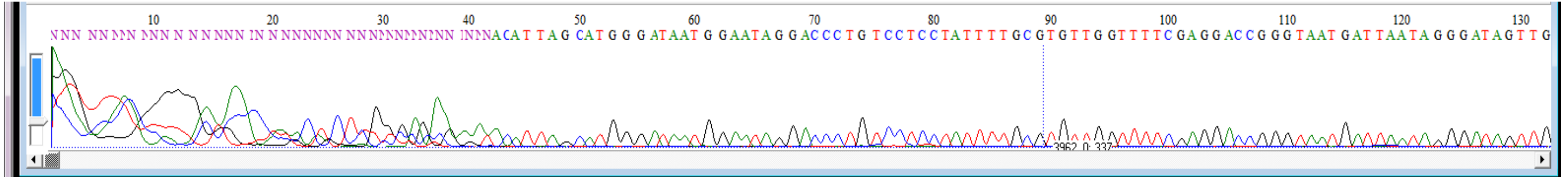
AACATACATTTAGTGGCGGAGGGTTAGTAATACATGGGTAACTTACCATTA
 TGGGAATAACGATTGGAAACGATCGCTAATACCGAATGTGGTGATAACAAGGCA
 TCTTGAAATCATTAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCGCGGTTAAAGAGAGGCC
 ATGGGATATCAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCTAAGACGTCTAG
 GCGGATTGAGAGATTGACCGCCAACACTGGGACTGAANN

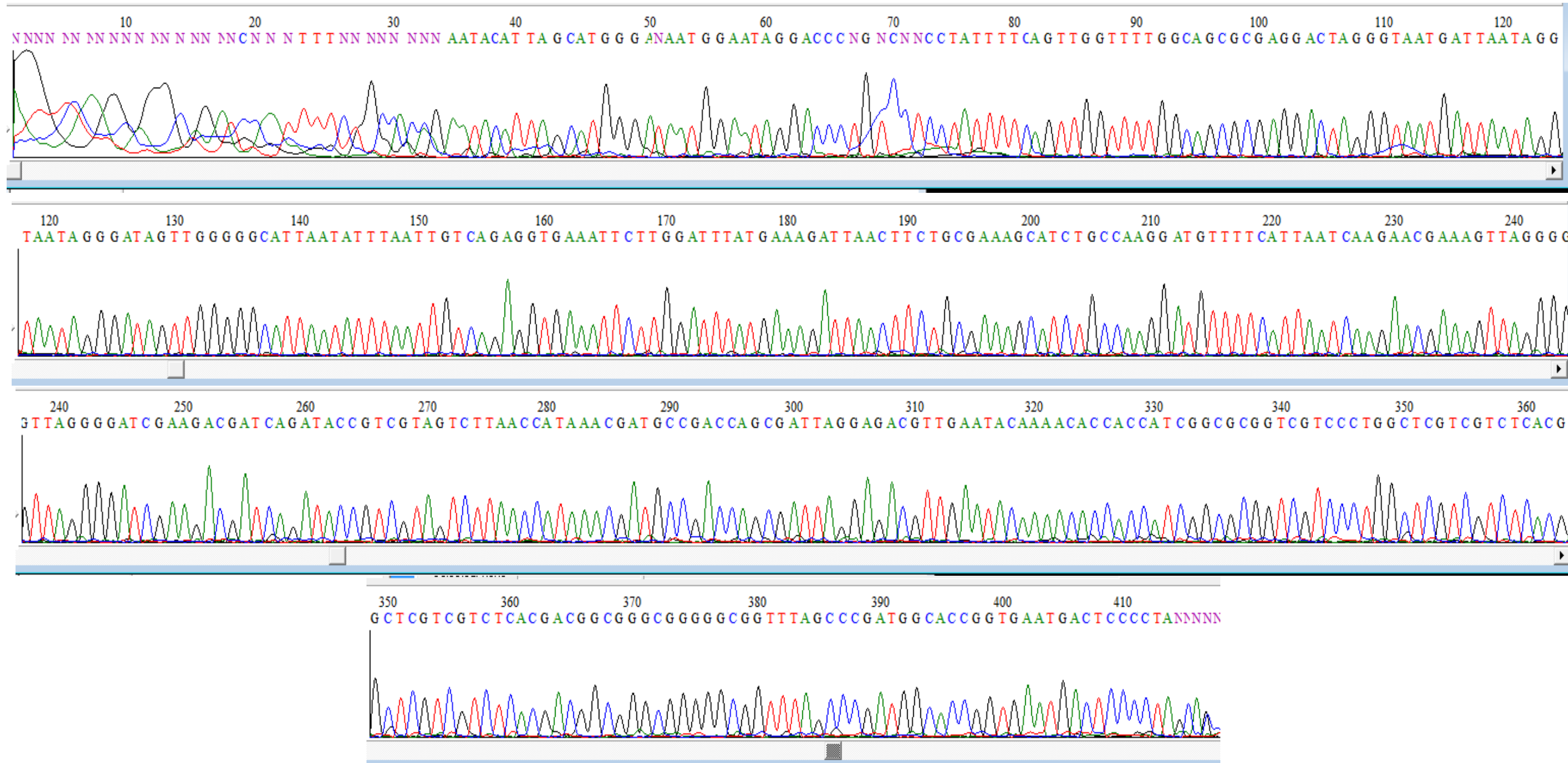
Clamidia no clasificada aún de muestra ocular

Uncultured Chlamydiales

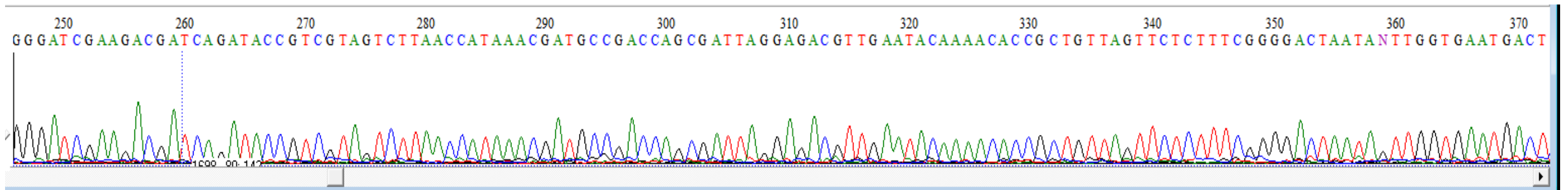
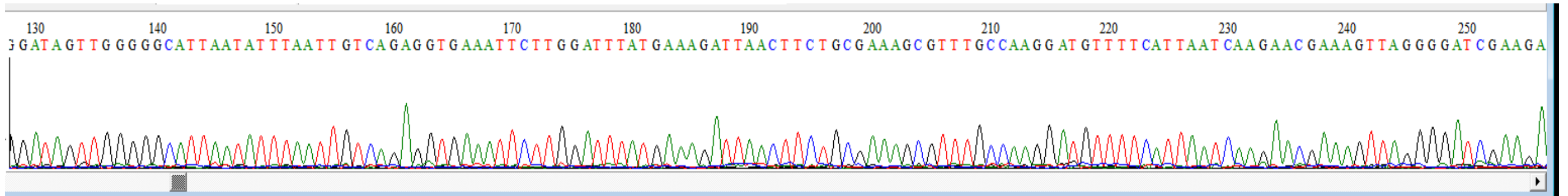
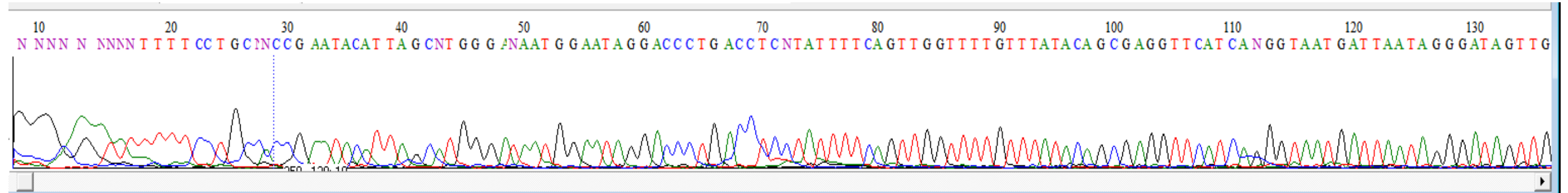
AAGTAGTGGCGGAGGGTTAGTAATACNTAAACNACCTGCCTTTAACCT
 GGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCGAATGAGGTGTCGAGGG
 CGANTGCTCATGGCATCAAAGTAGGGGATCTTGAAAGGGACCTTGCGGT
 TAGAGAGGGGTTTATGGGATATCAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCAC
 CAAGGCTAAGACGTCTAGGCGGATTGAGAGATTGACCGCCAACANTGGG
 ACTGAA

CROMATOGRAMAS

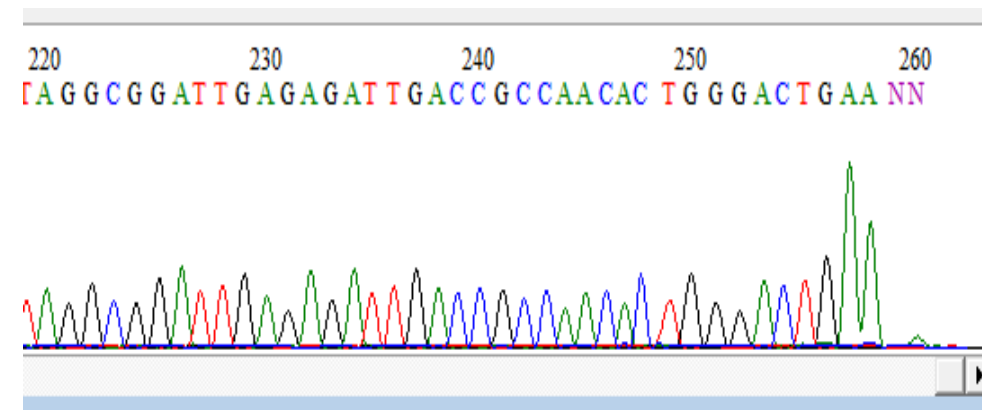
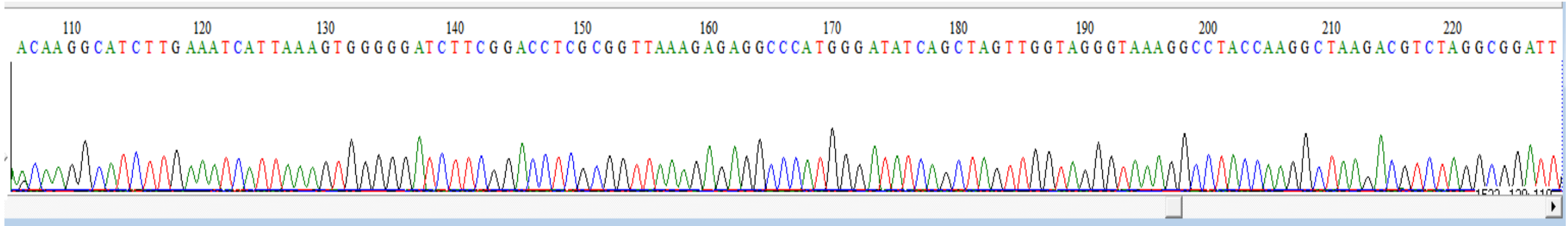
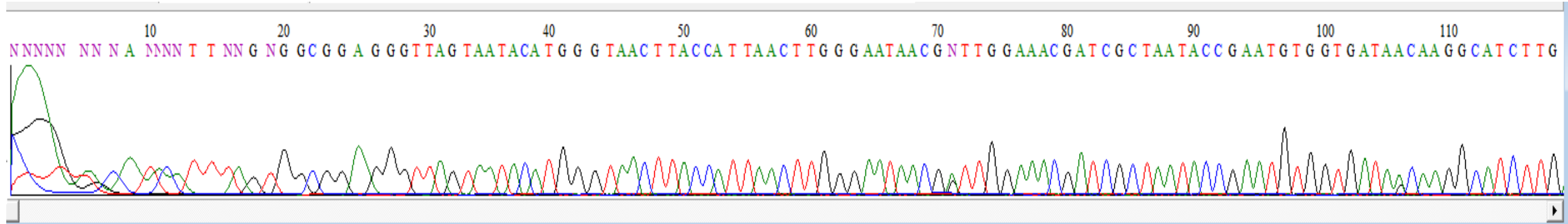
Acanthamoeba spp. (genotipo T15)

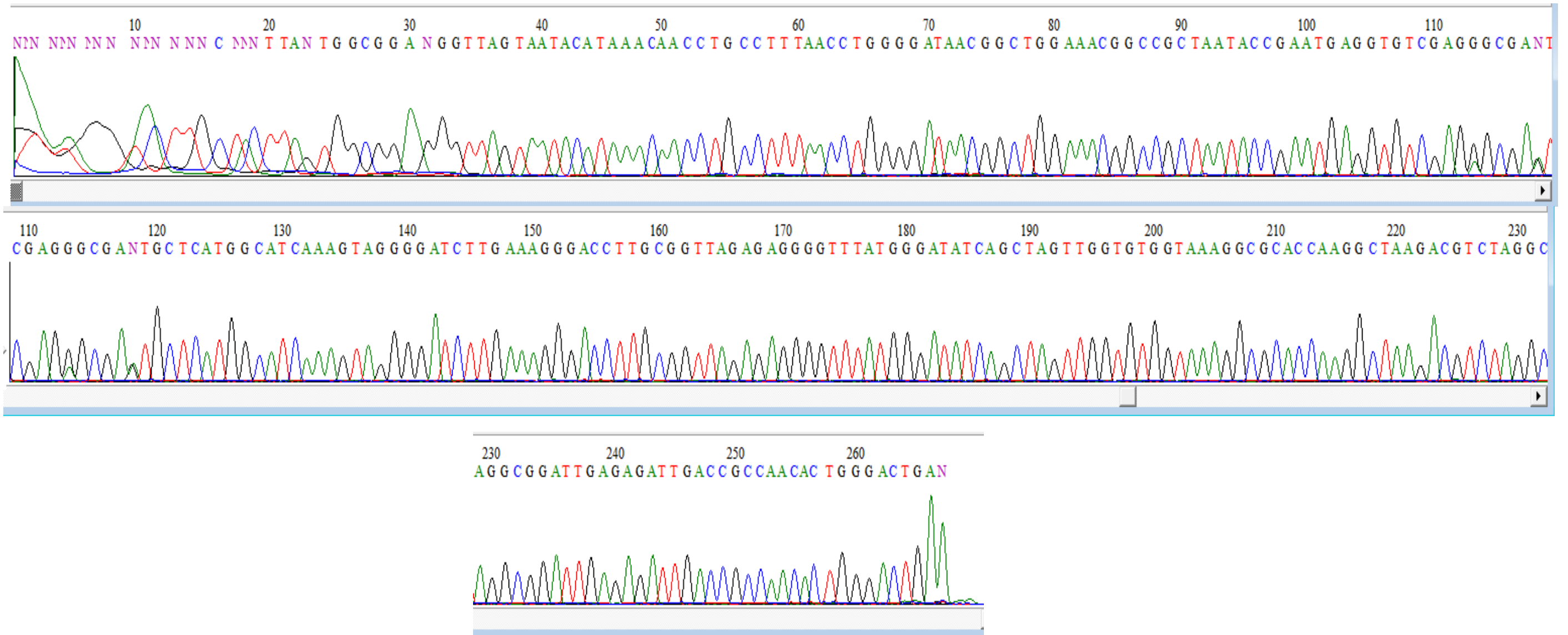
Acanthamoeba spp (T4)

Acanthamoeba spp. (genotipo T5)

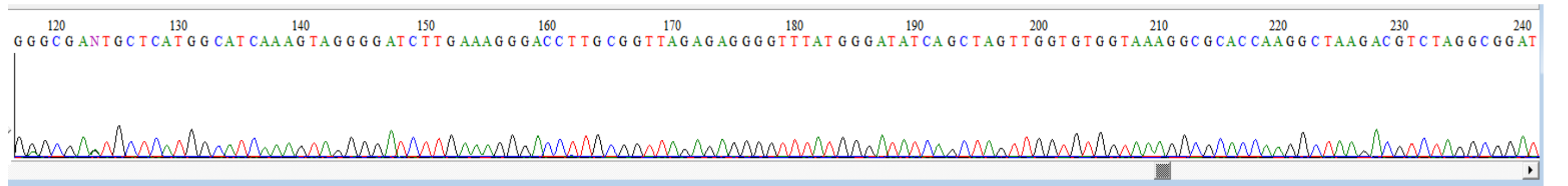
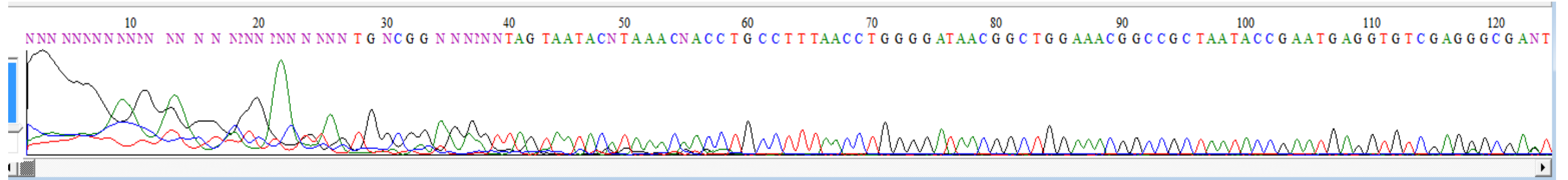


Neochlamydia spp.



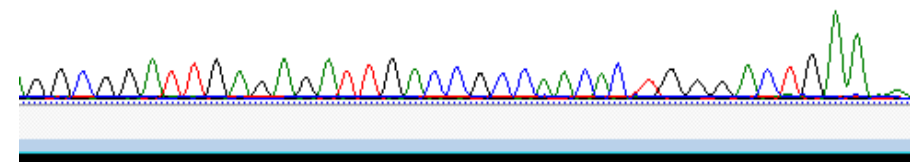
Muestra ocular (1) *Uncultured Chlamydiales*

Muestra ocular (2)

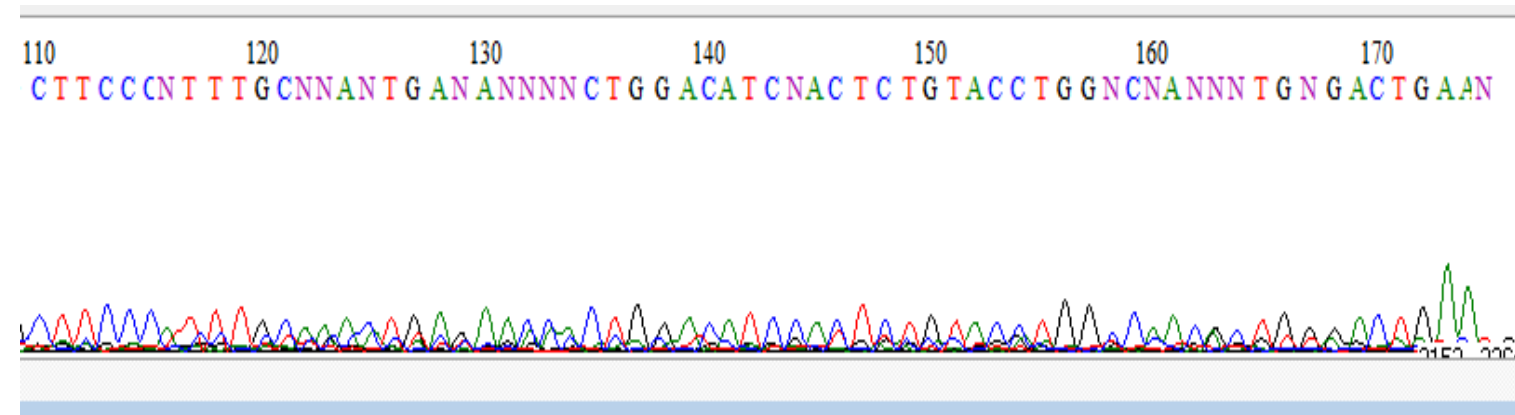
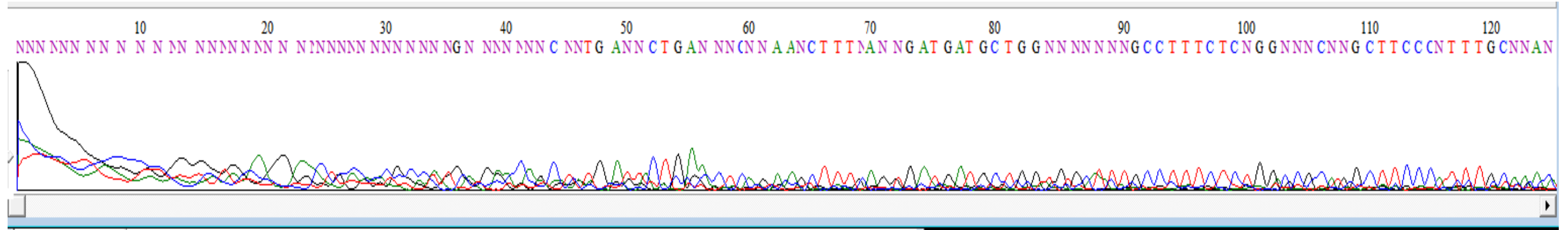


240 250 260 270

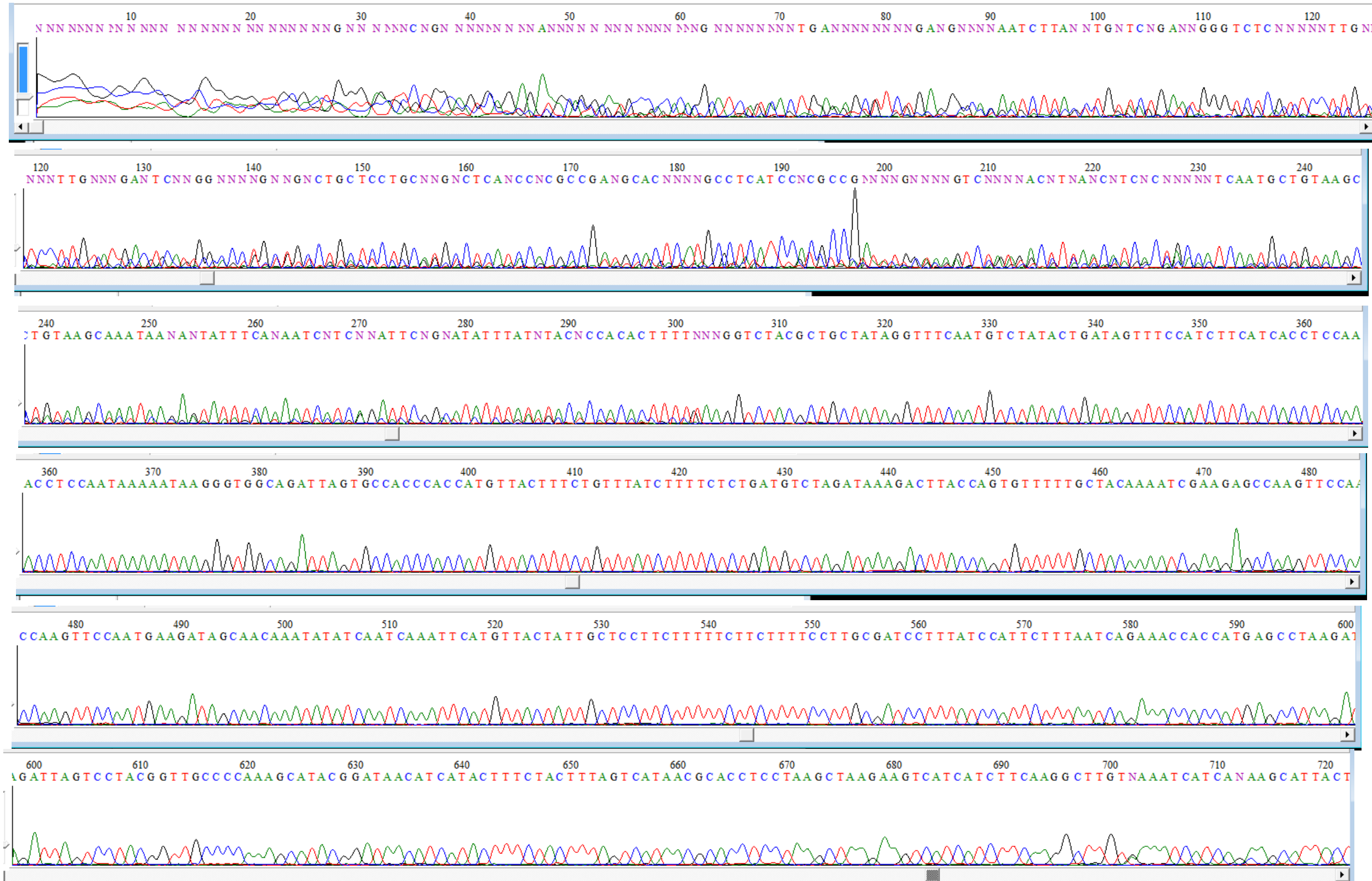
.GGCGGATTGAGAGATTGACCGCCAACAN TGGGACTGAN



Muestra de cérvix (2)



Esmegma prepuial (1)



Esmegma preucial (2)

