



ORIGINAL

Detección de *Chlamydia abortus* en pérdidas reproductivas de bovinos en la provincia de La Pampa, Argentina



María del C. Rojas^a, Marcelo Fort^a, Simone Bettermann^b, Carolina Entrocassi^c, Sixto R. Costamagna^d, Konrad Sachse^{e,1} y Marcelo Rodríguez Fermepin^{c,*}

^a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Anguil, Anguil, La Pampa, Argentina

^b Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Institute of Molecular Pathogenesis, Jena, Alemania

^c Cátedra de Microbiología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^d Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina

^e Department RNA Bioinformatics and High-Throughput Analysis, Faculty of Mathematics and Computer Science, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Alemania

Recibido el 7 de mayo de 2017; aceptado el 15 de octubre de 2017

Disponible en Internet el 17 de enero de 2018

PALABRAS CLAVE

Pérdida reproductiva;
Ganado bovino;
Chlamydia abortus;
Chlamydiaceae

Resumen Las pérdidas reproductivas constituyen una causa importante de pérdida económica en el ganado bovino, aunque en más del 50% de los casos la etiología es desconocida. Las especies de la familia *Chlamydiaceae* han sido asociadas con abortos en bovinos y otras especies animales, pero no existen datos al respecto en la República Argentina. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Chlamydia* spp. y de *Chlamydia abortus* en pérdidas reproductivas de ganado bovino en La Pampa, Argentina. Se estudiaron 251 muestras provenientes de abortos y mortinatos. Se realizó PCR en tiempo real para la detección de la familia *Chlamydiaceae* y ArrayTube para la identificación de las especies presentes. Se detectó ADN de la familia *Chlamydiaceae* en 12 muestras (4,78%); el 83,33% (10/12) correspondió a abortos y el 16,66% (2/12) a mortinatos. El análisis por ArrayTube detectó *C. abortus* en 5 muestras (1,99% del total, 41,67% de las muestras con detección de *Chlamydiaceae*). Este trabajo presenta la primera confirmación de la presencia de ADN de diversas especies de *Chlamydiaceae* (incluida *C. abortus*) en muestras de pérdidas reproductivas de ganado bovino en Argentina. El valor de prevalencia hallado (4,78%) debe ser tomado como un valor basal, debido al tipo de muestras estudiadas. Se halló material genético de *Chlamydiaceae* que no coincidió con ninguna de las especies conocidas; esto podría deberse a variantes intraespecie o a especies autóctonas aún no

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mrfchlam@ffyb.uba.ar (M. Rodríguez Fermepin).

¹ Cuando se realizó el estudio el lugar de trabajo era Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Institute of Molecular Pathogenesis, Jena, Alemania.

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.002>

0325-7541/© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Reproductive loss;
Bovine;
Chlamydia abortus;
Chlamydiaceae

descriptas. Es necesario avanzar en el estudio de la infección por estas bacterias en el ganado bovino de Argentina para conocer su dimensión y analizar su impacto económico y zoonótico, y también para planear medidas de prevención y control.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Detection of *Chlamydia abortus* in bovine reproductive losses in the province of La Pampa, Argentina

Abstract Reproductive losses linked to an infectious etiology in bovine cattle are a major economic concern worldwide. In Argentina, more than 50% of abortion cases have unknown causes. Species belonging to *Chlamydiaceae* family are frequent etiologic agents of abortion around the world; however, there is yet no information on their prevalence in Argentina. The objective of this work was to identify *Chlamydia* spp., and particularly *C. abortus* in reproductive losses from bovine cattle in La Pampa, Argentina. Real time PCR targeting *Chlamydiaceae*-specific DNA fragments was performed on 251 samples obtained from bovine abortions and stillborns, and ArrayTube was used for species identification on positive samples. *Chlamydiaceae* DNA was detected in 12 samples of aborted fetuses (4.78%), 83.33% (10/12) accounting for abortions and 16.66% (2/12) for stillborns. *C. abortus* was detected by ArrayTube in 5 cases (1.99% of all samples, and 41.67% of *Chlamydiaceae* positive samples). This study shows the first detection of *Chlamydiaceae* and *C. abortus* DNA on reproductive losses of bovine cattle in Argentina, and the described prevalence value (4.78%) should be taken as baseline value due to the type of samples analyzed. Detection of genetic material from *Chlamydiaceae* not matching any of the studied species could be due to intraspecies variants or local species not yet described. Further research on *Chlamydia* infections in bovine cattle in Argentina is imperative to describe their range, to analyze their economic and zoonotic implications and to make recommendations about prevention and control measures.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La ganadería bovina como fuente de producción de carne y leche es una de las principales actividades económicas de la República Argentina, donde se cuenta con un stock de 52 millones de cabezas³⁴. Las pérdidas reproductivas representan una causa sustancial de perjuicio económico. Se estima que las enfermedades infecciosas reproductivas reducen en alrededor del 10% la tasa anual de destete¹⁸.

En la provincia de La Pampa, la cría de bovinos es de tipo extensiva. Esta provincia cuenta con un stock ganadero de 3 millones de cabezas y las razas que predominan en la región que comprendió este estudio son Aberdeen Angus, Hereford y Holando Argentino. La eficiencia del rodeo en esta región (relación ternero/vaca) es menor que el promedio nacional³⁴.

La proporción de pérdidas reproductivas atribuidas a un agente específico varía según la región, la condición climática, el tipo de producción, las prácticas de manejo y los programas de vacunación y de control. El éxito del diagnóstico etiológico se sustenta en el tipo y la calidad de la muestra analizada. Entre los agentes más frecuentemente asociados a abortos bovinos en la Argentina se encuentran virus (herpesvirus bovino y el virus de la diarrea viral bovina), bacterias (*Brucella abortus*, *Campylobacter*

fetus, *Lesptospira* spp.) y protozoos (*Tritrichomonas foetus* y *Neospora caninum*); sin embargo, el 50-60% de los abortos estudiados son de etiología indeterminada^{6,10,12,21}.

Recientemente se han publicado estudios locales sobre la situación epidemiológica de agentes infecciosos específicos^{1,13,20} y de los principales agentes infecciosos involucrados en pérdidas reproductivas del ganado²⁸; sin embargo, no existen datos fehacientes con respecto a la participación local de bacterias de la familia *Chlamydiaceae* en animales enfermos o en abortos.

Todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae* son bacterias de vida intracelular obligada, presentan un genoma muy pequeño (1,04-1,23 Mb), son capaces de infectar una amplia variedad de organismos^{8,19} y pueden causar enfermedades, tanto en animales como en humanos³⁶.

Las técnicas de amplificación de ADN han permitido reclasificar el orden *Chlamydiales* varias veces en las últimas décadas. La revisión más reciente ha llevado a la reunificación de todas las especies de la familia *Chlamydiaceae* conocidas en un solo género: *Chlamydia*^{29,35}. Actualmente son reconocidas 11 especies: *Chlamydia abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum* y las recientes *C. avium* y *C. gallinacea*³².

Los datos epidemiológicos indican que la infección de rumiantes por *Chlamydia* spp. ocurre con frecuencia en todas partes del mundo²⁶, en la mayoría de los casos sin síntomas clínicos registrados, pero con perjuicio de rendimiento²⁴.

Las especies que pueden infectar el ganado bovino son *C. pecorum* (infecciones intestinales, articulares y oculares), *C. abortus* (infecciones genitales, ocasionalmente con abortos) y *C. psittaci* (infecciones respiratorias)^{8,18,22,24,26,36}.

El único trabajo publicado sobre la infección por clamidias en bovinos en la Argentina indicó que el 23% de los animales estudiados presentaba anticuerpos específicos²⁷. Estos resultados demuestran que esta infección está subdiagnosticada y que el efecto de estas bacterias sobre la producción animal es desconocido.

El diagnóstico de la infección por *Chlamydia* spp. requiere de técnicas sensibles y específicas^{9,33}. Actualmente, las técnicas de amplificación de ADN son las más útiles para el diagnóstico de la infección. El uso de PCR, PCR en tiempo real y *microarray* permite la detección y la tipificación de las especies involucradas^{4,30,31}.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Chlamydia* spp. y de *C. abortus* en particular en pérdidas reproductivas del ganado bovino en la provincia de La Pampa, Argentina.

Materiales y métodos

Criterios utilizados

Para definir las pérdidas reproductivas se tomaron los criterios del Comité de Nomenclatura de Reproducción Bovina⁷. Se consideró «aborto» la expulsión de un feto entre los 42 y 260 días de gestación. Se clasificó como «parto prematuro» la eliminación de fetos cuya edad varía desde el día 260 de preñez hasta el final de la misma. Se consideraron «mortinatos» los nacimientos de terneros a término (280 días) muertos. Como «pérdidas neonatales» se consideró al recién nacido hasta los primeros 28 días de vida.

Muestras

Se incorporaron al estudio las muestras de órganos provenientes de 251 pérdidas reproductivas ocurridas en la provincia de La Pampa, Argentina, que ingresaron durante el período 2004-2011 a la Estación Experimental Agropecuaria Anguil del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, para la realización del diagnóstico histológico e infectológico habitual. Los órganos seleccionados fueron cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón; estos estaban fijados en formol al 10% e incluidos en bloques de parafina.

Extracción de ADN

Las muestras se procesaron como lo describieron Borel et al.⁴. Por cada animal se preparó una única muestra con partes proporcionales de cada uno de los 5 órganos. Del bloque parafinado correspondiente a cada órgano, se cortaron secciones de 30 a 60 μm y se colocaron agrupadas en

un tubo cónico estéril. La parafina se removió con 1,2 ml de xileno. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. El xileno residual se eliminó por doble extracción con 1,2 ml de etanol. El etanol se retiró cuidadosamente luego de centrifugar las muestras 2 veces a 10.000 g durante 5 min.

El ADN para PCR se extrajo a partir del sedimento del tejido utilizando un kit comercial (DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR en tiempo real para la detección de *Chlamydiaceae*

Todas las muestras fueron examinadas en un equipo PCR Real-Time ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Singapur, Singapur), usando un protocolo validado por el laboratorio de referencia de la Oficina Internacional de Epizootias para clamidiosis¹¹. Se utilizaron cebadores específicos para la familia *Chlamydiaceae* dirigidos al gen 23S del ARNr, para obtener un producto de 111 pb específico de los miembros de la mencionada familia¹¹: cebador 1 (5'-CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T-3') y cebador 2 (5'-ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC-3'); la sonda empleada fue la siguiente: 5'-FAM/CT CAT CAT GC AAA AGG CAC GCC G/BHQ-3'. Se adicionaron 2,5 μl del extracto de ADN a una solución madre comercial (TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), con una concentración final de 5 pmol/ μl de cada *primer* y de la sonda (Microsynth, Balgach, Suiza), y 12,5 μl de solución tampón 2x para llegar a un volumen final de 25 μl . La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguida de 45 ciclos de 94°C por 15 s y 60°C por 60 s¹¹. Como control positivo se utilizó la cepa de *C. abortus* 09DC76 y como control negativo, agua bidestilada estéril.

Todas las muestras se procesaron por duplicado. Se consideraron positivas aquellas que presentaron un ciclo umbral menor o igual a 42, de acuerdo con el protocolo utilizado en el Friedrich-Loeffler-Institut. La presencia de inhibidores se evaluó mediante la amplificación de un control interno.

ArrayTube para la identificación especies del género *Chlamydia*

Se utilizó el sistema de *microarrays* en tubo ArrayTube (Alere Technologies GmbH, Jena, Alemania).

El chip de ADN incluía sondas para la identificación de las 11 especies reconocidas. Para *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. suis* y *C. psittaci* se utilizaron 4 sondas para cada especie; 3 sondas para *C. avium*, *C. muridarum* y *C. caviae*, y 2 sondas para *C. abortus*, *C. felis* y *C. gallinacea*. El chip contó con 4 controles positivos (sondas consenso) y un control interno (marcador de biotina). El procedimiento se realizó como describieron Borel et al.⁴. Brevemente, se realizó una PCR de un fragmento del gen 23S del ARNr utilizando los cebadores biotinilados U23F-19 (5'-ATTGAMAGGCGAWGAAGGA-3') y 23R-22 (5'-biotin-GCYTACTAAGATGTTTCAGTTC-3'). Los productos de la reacción fueron transferidos a un tubo cónico de 1,5 ml, de base plana. Se incubaron dichos productos con el chip de

Tabla 1 Detección de *Chlamydiaceae* y de *C. abortus* en muestras de pérdidas reproductivas bovinas de La Pampa, período 2004-2011

Año	Total de muestras	Detección de <i>Chlamydiaceae</i> , n (%)		Detección de <i>C. abortus</i> , n (%)	
2004	22	2	(9,09)	0	-
2005	55	0	-	0	-
2006	34	1	(2,94)	0	-
2007	38	4	(10,53)	2	(5,26)
2008	28	5	(17,86)	3	(10,71)
2009	18	0	-	0	-
2010	22	0	-	0	-
2011	39	0	-	0	-
Total	251	12	(4,78)	5	(1,99)

Todas las muestras analizadas provinieron de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Anguil, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

ADN que contiene las sondas específicas y que se encuentra en la base plana del tubo. El resultado de la hibridización se reveló con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. El resultado fue leído por un equipo específico (ATR-01 ArrayTube Reader) y analizado por el *software* correspondiente (Iconoclust Software, versión 2.3).

Histología

Se realizó nuevamente una evaluación histológica de las lesiones presentes mediante la tinción con hematoxilina-eosina de secciones de todos los órganos, para cada uno de los casos con detección de *Chlamydia* spp.

Resultados

Ninguna muestra presentó inhibidores. Se detectó ADN de la familia *Chlamydiaceae* en 12 muestras del total analizadas a lo largo de todo el período estudiado (4,78%); en la [tabla 1](#) se muestra la frecuencia de detección por año. Los valores del ciclo umbral fueron de 31,9 a 42. El 83,33% (10/12) correspondió a abortos y el 16,66% (2/12) a mortinatos. En la [tabla 2](#) se presentan los 12 casos detectados, con los meses de gestación, el año del suceso, los resultados del ArrayTube y las enfermedades asociadas. El caso 7 reveló lesiones inflamatorias localizadas en pulmón e hígado y en el caso 5 se detectó neuritis. En el caso 11 se encontraron lesiones compatibles con *N. caninum*; este patógeno fue confirmado por serología. En el caso 3 se detectaron anticuerpos específicos contra *B. abortus* y en el caso 9 contra *Leptospira* spp. En el caso 6 se detectó *Campylobacter* spp. mediante inmunofluorescencia directa (datos previos no mostrados). En las otras 6 muestras (50%) no se encontró ninguna lesión o diagnóstico de enfermedad asociada (casos 1, 2, 4, 9, 10 y 12).

El análisis por ArrayTube detectó *C. abortus* en 5 muestras (1,99% del total analizado y 41,67% de las muestras con detección de *Chlamydiaceae*). Los valores del ciclo umbral se ubicaron entre 32 y 38. Las muestras 4 y 6 pertenecieron a casos del año 2007 y las muestras 8, 9 y 11 a casos del año 2008. La infección por *C. abortus* se detectó en 3 abortos y 2 mortinatos (casos 4 y 8).

Discusión

La pérdida reproductiva de etiología desconocida en el ganado bovino representa un problema económico importante y de difícil estimación.

A pesar de que el rol patogénico de las especies del género *Chlamydia* y su capacidad para producir infecciones en distintas especies animales es conocido, la búsqueda de estos microorganismos no es realizada habitualmente.

Aunque las clamidias no son consideradas como una amenaza para la industria ganadera, ya que los abortos son esporádicos y las tormentas de abortos son eventos pocos frecuentes, podrían afectar al 20% de las vacas preñadas²⁵. Por otra parte, se debe considerar el efecto subclínico de las infecciones clamidiales, las cuales tienen repercusiones notables en términos económicos²⁶.

En rodeos con un alto porcentaje de portadores de clamidias se ha observado una disminución de la ganancia diaria de peso²⁶, la obstrucción de las vías respiratorias¹⁶, la presencia de clamidias en semen¹⁷ y la reducción del rendimiento de leche³.

Este trabajo presenta la primera confirmación de la presencia de ADN de *Chlamydiaceae* y de *C. abortus* en muestras de pérdidas reproductivas de ganado bovino en la provincia de La Pampa, Argentina.

El valor de prevalencia de infección por *Chlamydia* spp. (4,78%) debe ser tomado como un valor basal, ya que este trabajo se realizó de manera retrospectiva sobre muestras previamente fijadas en formol, parafinadas y luego desparafinadas, procesos agresivos que pudieron haber dañado el ADN y, por lo tanto, disminuido la sensibilidad de la detección.

Por otra parte, no pudieron ser analizadas las placentas, material considerado de elección para el diagnóstico de aborto por clamidias, debido a que, al tratarse de un sistema de cría extensiva, estas fueron consumidas por animales carroñeros^{5,15,23}.

Los datos publicados en las últimas décadas proponen una elevada prevalencia de infección por clamidias en bovinos, que oscilaría entre el 45 y el 100%²⁶. Si bien *C. abortus* es endémica en rumiantes menores de todo el mundo, también se ha documentado su presencia en bovinos y ha sido asociada con abortos⁵.

Tabla 2 Descripción de los casos correspondientes a las muestras con detección de *Chlamydiaceae*

Caso	Producto	Gestación (meses)	Mes y año	Ciclo umbral	Especie (ArrayTube)	Histología y coinfecciones
1	Aborto	4	Mayo 2004	33,7	Negativo	Negativo
2	Aborto	3	Noviembre 2004	32,2	Negativo	Negativo
3	Aborto	7	Diciembre 2006	38,0	Negativo	<i>Brucella abortus</i>
4	Mortinato	A término	Agosto 2007	34,1	<i>C. abortus</i>	Negativo
5	Aborto	7	Agosto 2007	41,0	Negativo	Neuritis
6	Aborto	6	Septiembre 2007	38,0	<i>C. abortus</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
7	Aborto	7	Septiembre 2007	42,0	Negativo	Lesiones inflamatorias
8	Mortinato	A término	Abril 2008	31,9	<i>C. abortus</i>	Negativo
9	Aborto	6	Mayo 2008	39,0	Negativo	<i>Leptospira</i> spp.
10	Aborto	7	Julio 2008	33,6	<i>C. abortus</i>	Negativo
11	Aborto	8	Julio 2008	36,0	<i>C. abortus</i>	<i>Neospora caninum</i>
12	Aborto	6	Agosto 2008	35,1	Negativo	Negativo

El valor de prevalencia de infección por *C. abortus* (1,99%) también debe ser tomado como mínimo por los motivos antes citados. De acuerdo con la bibliografía^{25,26}, el aborto causado por *C. abortus* en el ganado bovino ocurre entre el sexto y octavo mes de gestación, dato que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, la detección de ADN de *C. abortus* en 2 mortinatos a término, sin otra enfermedad asociada, podría manifestar alguna diferencia en cepas autóctonas.

La detección de *C. abortus* en una muestra con diagnóstico de infección por *N. caninum* y en otra muestra infectada por *Campylobacter* spp., así como la presencia de *B. abortus* y de *Leptospira* spp. en muestras con hallazgo de miembros de la familia *Chlamydiaceae*, refleja una situación que es frecuente⁴. Por este motivo, la etiología de la pérdida reproductiva debería analizarse dentro del estudio de otras coinfecciones presentes.

La presencia en ciertos casos de material genético de *Chlamydiaceae* que no coincidió con ninguna de las especies conocidas podría deberse a variantes intraespecie o a especies autóctonas, aún no descriptas.

Por otra parte, los valores de ciclo umbral altos (mayores de 38) podrían no ser conclusivos y la cantidad de ADN podría ser demasiado escasa como para poder determinar la especie involucrada mediante la metodología de *microarray*.

La infección zoonótica por *C. abortus* es considerada de riesgo ocupacional^{2,14,37}. Por lo tanto, la demostración de la circulación de *C. abortus* refuerza la necesidad de extremar las condiciones de bioseguridad y protección de los veterinarios y del personal de campo involucrados en las actividades de parto y en la manipulación de materiales productos del aborto.

Este trabajo demuestra por primera vez la presencia de miembros de la familia *Chlamydiaceae* y la posible participación de estos, y de *C. abortus* en particular, en pérdidas reproductivas en la provincia de La Pampa.

Es necesario avanzar en estudios prospectivos, clínicos y microbiológicos para poder determinar la dimensión de la infección por *Chlamydiaceae* y las especies involucradas, a fin de analizar la relevancia económica y zoonótica de este problema y planear medidas de prevención y control.

Financiación

Fuentes de financiación: INTA, Universidad Nacional del Sur (SECYT) y Universidad de Buenos Aires (UBACyT).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Agradecimientos

A la técnica Christine Grajetzki, por procesamiento de muestras. A la Dra. María Lucía Gallo Vaulet, por la lectura crítica del manuscrito.

Bibliografía

1. Aznar M, Linares F, Cosentino B, Sago A, La Sala L, León E, Duffy S, Perez A. Prevalence and spatial distribution of bovine brucellosis in San Luis and La Pampa, Argentina. *BMC Vet Res.* 2015;11:209.
2. Bazala E, Renda J. Latent *Chlamydia* infections as the cause of health disorders in swine, cattle and sheep breeders in Czechoslovakia [German]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1992;105.
3. Biesenkamp-Uhe C, Li Y, Hehnen HR, Sachse K, Kaltenboeck B. Therapeutic *Chlamydomphila abortus/pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydomphila* infection. *Infect Immun.* 2007;75:870-7.
4. Borel N, Kempf E, Hotzel H, Schubert E, Torgerson P, Slickers P, Ehrlich R, Tasara T, Pospischil A, Sachse K. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay-A validation study. *Mol Cell Probes.* 2008;22:55-64.
5. Borel N, Thoma R, Spaeni P, Weilenmann R, Teankum K, Brugnera E, Zimmermann D, Vaughan L, Pospischil K. *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Vet Pathol.* 2006;43:702-8.
6. Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun.* 2003;27:359-69.
7. Committee on Bovine Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.* 1972;62:216-37.

8. Corsaro D, Venditti D. Emerging chlamydial infection. *Crit Rev Microbiol.* 2004;30:75–106.
9. DeGraves F, Gao D, Hehnen H, Schlapp T, Kaltenboeck B. Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1726–9.
10. Draghi M, Soni C, Beckwith B, Zurbriggen M, Homse A, Rochinotti D, Rizzi C, Alcaraz E, Caspe S, Ramírez J, Pereira M, Biotti G, Ramírez L, Sosa G. Estudio de las principales causas de mortalidad perinatal en bovinos en el nordeste argentino. Serie técnica 40. Corrientes: Estación Experimental Agropecuaria Mercedes, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2007.
11. Ehrlich R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes.* 2006;20:60–3.
12. Fernández M, Campero C, Morrell E, Cantón G, Moore D, Cano A, Malena R, Odeón A, Paolicchi F, Odriozola E. Pérdidas reproductivas en bovinos causadas por abortos, muertes prematuras, mortinatos y neonatos: casuística del período 2006-2007. *Rev Med Vet.* 2007;88:246–54.
13. Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. Seroepidemiological study of *Neosporacanium* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.* 2015;60:275–82.
14. Hinton D, Shipley A, Galvin J, Harkin J, Brunton R. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Aust Vet J.* 1993;70:174–6.
15. Idtse F. *Chlamydia* and chlamydial diseases of cattle: A review of the literature. *Vet Med.* 1984;4:543–50.
16. Jaeger J, Liebler-Tenorio E, Kirschvink N, Sachse K, Reinhold P. A clinically silent respiratory infection with *Chlamydia* spp. in calves is associated with airway obstruction and pulmonary inflammation. *Vet Res.* 2007;38:711–28.
17. Kauffold J, Henning K, Bachmann R, Hotzel H, Melzer F. The prevalence of chlamydiae in bulls from six bull studs in Germany. *Anim Reprod Sci.* 2007;102:111–21.
18. Kemmerling K, Muller U, Mielenz M, Sauerwein H. *Chlamydia* 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.* 2009;92:4347–54.
19. Longbottom D, Coulter L. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol.* 2003;128:217–44.
20. Molina L, Perea J, Meglia G, Angón E, García A. Spatial and temporal epidemiology of bovine trichomoniasis and bovine genital campylobacteriosis in La Pampa province (Argentina). *Prev Vet Med.* 2013;110:388–94.
21. Morrell E, Moore D, Odeón A, Poso M, Odriozola E, Cantón G, Paolicchi F, Malena R, Leunda M, Morsella C, Campero C. Retrospective study of bovine neonatal mortality: Cases reported from INTA Balcarce, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2008;40:151–7.
22. Nabeya M, Kaneko M, Ogino K, Nakabayashi H, Watanabe D, Murayama T, Hayashi J, Fukushi K, Yamaguchi H, Hiral T, Inaba K, Matumoto M. Abortion in Japanese cows caused by *Chlamydia psittaci*. *Vet Microbiol.* 1991;29:261–5.
23. Perez-Martinez J, Storz J. Chlamydial infections in cattle—Part 1, Part 2. *Mod Vet Pract.* 1985;66:517–22, 603–8.
24. Poudel A, Elsasser TH, Rahman KS, Chowdhury EU, Kaltenboeck B. Asymptomatic endemic *Chlamydia pecorum* infections reduce growth rates in calves by up to 48 percent. *PLoS One.* 2012;7:e44961.
25. Reinhold P, Jaeger J, Liebler-Tenorio E, Berndt A, Bachmann R, Schubert E, Melzer F, Elschner E, Sachse K. Impact of latent infections with *Chlamydia* species in young cattle. *Vet J.* 2008;175:202–11.
26. Reinhold P, Sachse K, Kaltenboeck B. *Chlamydiaceae* in cattle: Commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet J.* 2011;189:257–67.
27. Rodríguez Fermepin M, Ranea F, Samartino L, Decristofano M, Mestre M, Pereira J, Planes N, de Torres R. Evidencia serológica de la infección por *Chlamydia* spp. en bovinos y porcinos de la provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet (B Aires).* 1995;79:97–100.
28. 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: Miranda AO, editor. Avances en investigación en Salud Pública Veterinaria en la Provincia de la Pampa. Anguil, La Pampa, Argentina: EEA Anguil Ing. Agr. Guillermo Covas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2014 [consultado 28 Nov 2016]. Disponible en: https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta_pt97_salud_publica_veterinaria.pdf
29. Sachse K, Bavoil P, Kaltenboeck B, Stephens R, Kuo C, Rosselló-Móra R, Horn M. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: Proposal of a single genus *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol.* 2015;38:99–103.
30. Sachse K, Hotzel H. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR. *Methods Mol Biol.* 2003;216:123–36.
31. Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydia* spp. *Mol Cell Probes.* 2005;19:41–50.
32. 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. Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 2014;37:79–88.
33. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol.* 2009;135:2–21.
34. Distribución de existencias bovinas por categoría – Abril 2016. Servicio Nacional y Calidad Agrolimentaria (SENASA), 2017 [consultado 15 Ene 2017]. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>
35. Stephens R, Myers G, Eppinger M, Bavoil P. Divergence without difference: Phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;55:115–9.
36. Storz J, Kaltenboeck B. Diversity of *Chlamydia*-induced diseases. En: Woldehiwet Z, Ristic M, editores. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Oxford (UK): Pergamon Press; 1993. p. 363–93.
37. Wittenbrink MM. Chlamydien bei Rindern und Schweinen und ihr zoonotisches Potenzial. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2002;109:452–3.