

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

ANÁLISIS MOLECULAR DE *CHLAMYDIALES* EN TORTUGA MORA (*TESTUDO GRAECA*): IMPLICACIONES EN SALUD ANIMAL Y RIESGO ZONÓTICO BAJO EL ENFOQUE “*ONE HEALTH*”

Autor: **Nuria Vives San Julián**

Villaviciosa de Odón, **23 de Mayo de 2025**

ANEXO IX

Título del Trabajo: Análisis molecular de *Chlamydiales* en tortuga mora (*Testudo graeca*): implicaciones en salud animal y riesgo zoonótico bajo el enfoque "One Health".

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Investigación de Salud Global, en las instalaciones de los laboratorios del Hospital Clínico Veterinario localizado en la Universidad Europea de Madrid.

Tutor/es: Claudia Marcela Parra Giraldo y Bárbara Martín-Maldonado.

INFORMACIÓN DEL CENTRO

La realización del TFG se ha llevado a cabo en el Hospital Clínico Veterinario en la Universidad Europea de Madrid, un espacio donde se ofrece atención veterinaria de primer nivel. Cuenta con un grupo de profesionales con gran reconocimiento nacional e internacional, diplomados por el Colegio Europeo o acreditados por la Asociación de Veterinarios Españoles en Pequeños Animales (AVEPA), bajo la dirección del Dr. Nacho Calvo. Utilizan la tecnología más avanzada, incluyendo quirófanos inteligentes, resonancia magnética nuclear (RMN) de 1.5 Tesla y un equipo de Tomografía Axial Computarizada (TAC) de alta precisión.

El hospital atiende a animales de compañía, caballos y animales exóticos (Conoce El Hospital Clínico Veterinario de La Universidad Europea de Madrid, Con Servicio de Urgencias 24 Horas Los 365 Días Del Año – Mascotas, n.d.).

Por otro lado, cuenta con tres laboratorios: laboratorio de Microbiología, el laboratorio de Biología Molecular, y el laboratorio de Biopatología Clínica. En ellos se han llevado a cabo los análisis de las muestras de animales procedentes de pacientes del hospital y el desarrollo de distintas ramas de investigación, la mayoría del Grupo de Investigación en Salud Global (Hospital Clínico Veterinario UE – Hospital Veterinario Madrid 24 Horas, n.d.).

Grupo de Investigación en Salud Global - Universidad Europea de Madrid

El Grupo de Investigación en Salud Global de la Universidad Europea de Madrid es un equipo multidisciplinar de investigadores dedicado al abordaje de las enfermedades infecciosas mediante el enfoque “*One Health*”, unificando los enfoques de salud humana, animal y ambiental. El grupo está formado por el Dr. Fernando Esperón Fajardo, la Dra. Bárbara Martín-Maldonado y la Dra. Claudia Marcela Parra Giraldo, que aportan una amplia experiencia en este ámbito veterinario, incluyendo la vigilancia de patógenos zoonóticos, la resistencia a los antimicrobianos y la epidemiología de la fauna silvestre. Tanto el Dr. Fernando Esperón como la Dra. Claudia Marcela Parra, son investigadores senior con más de 70 publicaciones revisadas por pares cada uno y una amplia experiencia de liderazgo en proyectos de investigación multiinstitucionales a nivel nacional e internacional.

CONTENIDO

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. OBJETIVOS	8
4. MARCO TEÓRICO.....	9
a. CHLAMYDIALES	9
i. Características biológicas	9
ii. Mecanismos de patogenicidad.....	10
iii. Tratamiento y diagnóstico.....	11
b. PATOGENIA EN HUMANOS POR BACTERIAS DEL ORDEN CHLAMYDIALES.....	13
c. CHLAMYDIALES EN OTRAS ESPECIES ANIMALES.....	14
d. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL URTD EN REPTILES	16
e. DESAFÍOS Y VACÍOS EN EL CONOCIMIENTO EN EL ABORDAJE ONE HEALTH DE LAS BACTERIAS DEL ORDEN CHLAMYDIALES	16
5. METODOLOGÍA.....	17
5.1. EXTRACCIÓN DE ADN	17
5.2. PCR.....	18
5.3. ANÁLISIS IN SÍLICO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA PATOGENESIS	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	29
8. BIBLIOGRAFÍA	31

1. RESUMEN

El análisis de infecciones por *Chlamydia* spp. en tortugas mora (*Testudo graeca*) es importante, especialmente cuando pensamos en la conservación y vigilancia de la salud, ya que implica entender la interacción entre la fauna silvestre, los humanos y el ambiente. El principal objetivo del estudio fue identificar la presencia de este patógeno mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), herramienta conocida por su gran sensibilidad y especificidad en detectar bacterias intracelulares obligadas, como es el caso de *Chlamydia*.

Desde un enfoque que integra diferentes aspectos, basado en el concepto de “*One Health*”, el estudio no solo buscó confirmar si las tortugas de hábitats naturales y zonas con influencia humana estaban infectadas, sino también investigar si las cepas detectadas en los reptiles tenían alguna relación con las que afectan a los seres humanos. Para ello, se realizó un análisis *in silico*, utilizando secuencias proteicas de *Chlamydia* aisladas de reptiles y comparándolas, mediante herramientas como BLAST, con proteínas homólogas de cepas humanas (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, entre otras). Se prestó especial atención a aquellas proteínas asociadas a procesos de patogenicidad, como OmpA, Pmp e IncA.

La combinación de técnicas moleculares y análisis comparativos no sólo facilitó la detección del microorganismo en las muestras que fueron analizadas, sino que también aportó información relevante sobre su comportamiento evolutivo y posible implicación en la transmisión interespecífica.

2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del orden Chlamydiales representan un grupo diverso de microorganismos intracelulares obligados, gramnegativos, que se distribuyen ampliamente en el reino animal y ciertos protistas. Entre sus hospedadores se encuentran mamíferos, aves, reptiles, tanto domésticos como silvestres, y también humanos, lo que les confiere un notable potencial zoonótico y una gran relevancia desde la perspectiva *One Health* (Everett, 2000) (Elwell et al., 2016).

La familia mejor estudiada de este grupo es Chlamydiaceae, donde destacan especies como *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*, reconocidas por sus capacidades patógenas y zoonóticas. *C. psittaci*, por ejemplo, es transmitida por aves y puede provocar psitacosis en humanos. En paralelo, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* causan enfermedades humanas como infecciones genitales, neumonías atípicas, y enfermedades crónicas como aterosclerosis (Elwell et al., 2016).

En reptiles, particularmente en tortugas, se ha documentado la presencia de Chlamydiales, siendo posible que actúen como reservorios naturales de cepas zoonóticas. En centros de rescate y reservas donde se alberga a la tortuga mora (*Testudo graeca*), especie terrestre actualmente clasificada como vulnerable según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN por sus siglas en inglés) (IUCN, 2025), y nativa del Mediterráneo, se han observado signos clínicos como rinitis, que podrían estar vinculados a infecciones por *Chlamydia*. Estas tortugas, a menudo mantenidas en cautiverio ya sea por motivos de conservación o como mascotas, han estado en mayor contacto con las personas, lo que puede ser un riesgo potencial para la salud pública (Gil-Sánchez et al., 2022).

La rinitis en reptiles, sin embargo, puede tener múltiples orígenes. Se deben considerar infecciones por *Mycoplasma* spp., herpesvirus, hongos (como *Aspergillus* spp.), y causas ambientales como deficiencias en humedad, temperatura o ventilación. Por ello, el uso de pruebas moleculares específicas como la PCR es crucial para determinar con precisión el agente causal (Brown et al., 1994) (Okoh et al., 2021).

En este contexto, se propone también un análisis *in silico* de genes relacionados con la virulencia en *Chlamydia* spp., con el fin de comparar la homología entre proteínas de

cepas aisladas de reptiles y aquellas patógenas para humanos. Esta comparación ayudará a entender qué tan bien se conservan las proteínas importantes durante la infección y, por tanto, evaluar el riesgo zoonótico.

Entre las proteínas asociadas al proceso patogénico que serán objeto de análisis se destacan:

- Proteínas de membrana externa (Omp, por sus siglas en inglés): como OmpA, esenciales para adhesión, estructura y evasión inmune (Confer & Ayalew, 2013).
- Sistema de secreción tipo III (T3SS, por sus siglas en inglés): engloba proteínas como CopB, CdsF, IncA–N, fundamentales para modificar la célula huésped desde el interior (Betts-Hampikian & Fields, 2010).
- Proteínas de membrana polimórficas (Pmp, por sus siglas en inglés): como PmpH, involucradas en adhesión y variación antigénica (Favaroni et al., 2021).
- Proteínas de la membrana de inclusión (Inc, por sus siglas en inglés): como IncA o CT228, que manipulan el tráfico vesicular del hospedador (Moore & Ouellette, 2014).

Estas proteínas son candidatas ideales para análisis bioinformáticos mediante herramientas como BLAST, alineamientos múltiples y construcción de árboles filogenéticos. Su estudio permitirá evaluar similitudes estructurales y funcionales entre cepas de diferentes hospedadores, lo cual podría sugerir posibles rutas evolutivas de transmisión zoonótica, especialmente en especies como *C. psittaci*.

Dado el limitado número de investigaciones en reptiles y el creciente contacto entre humanos y fauna silvestre, este trabajo busca generar conocimiento útil para la vigilancia proactiva de patógenos emergentes, el desarrollo de estrategias de control efectivas, y el fortalecimiento del enfoque *One Health* en escenarios de conservación y salud pública.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Este estudio busca detectar la presencia de bacterias del orden Chlamydiales en tortugas mora que se encuentran en cautiverio, usando técnicas de análisis molecular como PCR y herramientas bioinformáticas (*in silico*), con el objetivo de caracterizar su potencial como reservorios zoonóticos y ampliar el conocimiento sobre su patogenicidad, todo dentro del enfoque integral de *One Health*.

Objetivos Específicos

1. Detectar la presencia de bacterias del orden Chlamydiales en tortugas mora mediante PCR, en ejemplares provenientes de centros de rescate y reservas.
2. Realizar un análisis *in silico* comparativo de genes que codifican proteínas asociadas al proceso patogénico entre cepas de Chlamydia aisladas de reptiles y cepas zoonóticas humanas (como *C. psittaci*, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*), enfocándose en proteínas clave como OmpA, Pmp e IncA, con el fin de evaluar su homología estructural y funcional.

4. MARCO TEÓRICO

a. CHLAMYDIALES

i. Características biológicas

Las bacterias del orden Chlamydiales son microorganismos intracelulares obligados, gramnegativos, que incluyen más de una decena de familias, como Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Simkaniaceae, Waddliaceae y Criblamydiaceae, que agrupan a más de 30 especies descritas hasta la fecha. Entre ellas, el género *Chlamydia* incluye algunas especies que son importantes tanto en la salud humana como en la veterinaria, como *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. abortus* y *C. pecorum*. Estas bacterias son agentes patógenos en humanos, mamíferos, aves y reptiles, causando enfermedades que van desde infecciones respiratorias, oculares y urogenitales hasta abortos y enfermedades sistémicas graves. Además, se han identificado nuevas especies en hospedadores no tradicionales como anfibios, peces y reptiles, lo que amplía su relevancia ecológica y epidemiológica. Su presencia cada vez más frecuente en animales silvestres y su potencial zoonótico hacen que este grupo sea considerado como patógenos emergentes de interés en salud pública, especialmente desde la perspectiva de *One Health* (Horn, 2008). Su ciclo de vida es bifásico ya que incluye dos formas morfológicas: el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticulado (CR) (Figura 1).

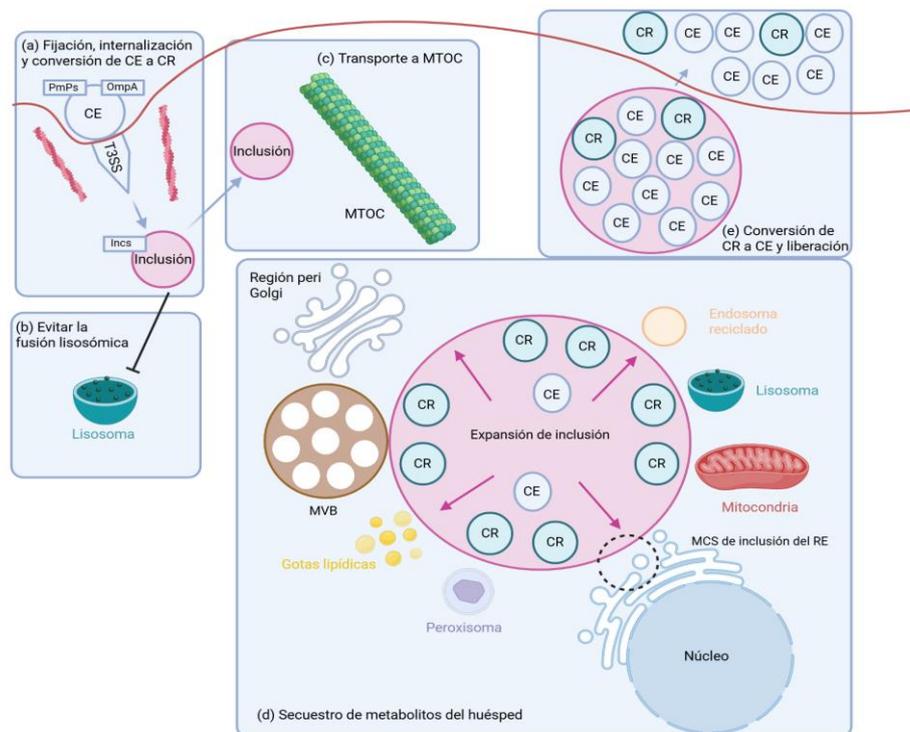


Figura 1: Etapas de la infección y replicación de Chlamydia, modificado con BioRender® de (Gitsels et al., 2019).

ii. Mecanismos de patogenicidad

La patogenicidad de *Chlamydia* se basa en un ciclo de vida intracelular altamente especializado y dependiente de la célula hospedadora. Este ciclo bifásico incluye dos estructuras morfológicas: el cuerpo elemental (CE), forma extracelular e infecciosa, y el cuerpo reticulado (CR), forma intracelular replicativa.

Varias proteínas especializadas contribuyen a la patogenicidad de la bacteria:

- Proteínas OmpA: es una proteína porina, relacionada genéticamente, termo modificable y de superficie expuesta. Presenta un gran número de copias en la membrana externa de bacterias gramnegativas en su mayoría, siendo la proteína de membrana externa más abundante en *Chlamydia*. Desempeña importantes funciones patogénicas, como la adhesión bacteriana, la invasión o la supervivencia intracelular, y la evasión de las defensas del hospedador o la estimulación de la producción de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, puede actuar como dianas del sistema inmunitario, con inmunogenicidad relacionada con las asas de la molécula expuestas superficialmente. Estas proteínas están siendo estudiadas como posibles candidatas para vacunas contra *Chlamydia* (Confer & Ayalew, 2013).
- Sistema T3SS: es un sistema de secreción asociado con la administración de efectores desde el citosol de la bacteria a la célula diana. Estas proteínas alteran las funciones de las células hospedadoras, ayudando a que puedan mantenerse vivas y funcionar dentro de ellas. Los patógenos intracelulares obligados, como los que pertenecen a la familia Chlamydiaceae, presentan un T3SS no flagelar, muy conservado evolutivamente, necesario para su viabilidad y diseminación dentro del hospedador. Un séptimo de su genoma está dedicado a genes asociados con el aparato del T3SS, chaperonas y efectores (Rucks, 2023).
- Proteínas Pmp: es la familia de proteínas más grande (con hasta 21 miembros) exclusiva de Chlamydiaceae. Estas proteínas son inmunorreactivas en diferentes especies de *Chlamydia*, y se considera que las Pmp están asociadas con el tropismo tisular y la patogenicidad (Favaroni et al., 2021).
- Proteínas Inc: intervienen en la adquisición de nutrientes, el control del ciclo celular y la evasión inmune, como la inhibición de la presentación de antígenos,

la apoptosis celular y la modulación de la respuesta inflamatoria, lo que le permite persistir dentro de las células durante largos períodos, contribuyendo a la cronicidad de las infecciones y su difícil erradicación (Elwell et al., 2016).

Gracias a la acción de estas proteínas, *Chlamydia* consigue establecer un ambiente intracelular protegido y funcional para iniciar la infección. Para que los CE desnudos puedan entrar en la célula hospedadora, primero deben atravesar su membrana plasmática. Esta interacción se da por medio de ligandos bacterianos y receptores celulares, y la inyección de proteínas efectoras a través del sistema T3SS pre-empaquetados dentro del citosol de la célula colonizada que permiten la invasión. Esto permite su entrada mediante endocitosis, seguido de su internalización en una vacuola denominada inclusión, que puede ser dependiente de actina (Gitsels et al., 2019). Este sistema es fundamental para que la bacteria ingrese, sobreviva y se replique dentro de las células. De hecho, representa hasta una séptima parte de su material genético.

Al inyectarse las proteínas del T3SS, se produce la reorganización de la actina y la captación de los CR. En este entorno de inclusión, los CE se transforman en CR, que crecen y se dividen por fisión binaria. Los CR modifican la membrana de inclusión para protegerse de la degradación lisosomal y facilitar su transporte hacia el centro organizador de microtúbulos (MTOC), región rica en nutrientes esenciales, que provocan su expansión y crecimiento. Los CR manipulan el tráfico vesicular de la célula hospedadora, obteniendo también nutrientes esenciales desde el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, mitocondrias, gotas lipídicas, lisosomas, peroxisomas, endosomas de reciclaje y cuerpos multivesiculares (MVB).

Al concluir su ciclo vital, los CR se transforman en CE, que abandonan la célula para iniciar nuevas infecciones (Gitsels et al., 2019).

iii. Tratamiento y diagnóstico

El diagnóstico de *Chlamydia* siempre ha sido un desafío, ya que su cultivo presenta limitaciones técnicas y baja sensibilidad (Pace et al., 2022). Anteriormente, los métodos tradicionales se basaban en el cultivo en saco vitelino de huevos embrionarios o en líneas celulares, técnicas laboriosas y de baja sensibilidad (Everett, 2000). Los avances tecnológicos en el diagnóstico de infecciones por Chlamydiales han permitido una

detección más rápida y específica. En la actualidad, se recomienda la inmunohistoquímica por su fiabilidad y rapidez, pero las técnicas de biología molecular, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han convertido en herramientas fundamentales para identificar estas bacterias, por su excelente sensibilidad y especificidad, superior al cultivo y los métodos inmunológicos (Everett, 2000) (Pace et al., 2022) (Jordá et al., 2018). La PCR permite detectar secuencias altamente conservadas, en genes ribosomales (16S rRNA, 23S rRNA) y en genes estructurales como el gen *ompA* que codifica para la proteína OmpA, diferenciando incluso entre especies estrechamente relacionadas dentro del orden (Jordá, et al., 2018). Estos métodos han facilitado el descubrimiento de nuevas especies y han mejorado la comprensión de su distribución y evolución (Everett, 2000).

El objetivo del tratamiento de una infección por *Chlamydia* en humanos suele tratarse de forma paliativa, es decir, aliviando los síntomas y complicaciones. En el caso de *C. trachomatis* es importante disminuir el riesgo de transmisión sexual con métodos preventivos, además del uso de azitromicina o levofloxacino para la infección urogenital (Campbell et al., 2023). La administración de claritromicina se considera un tratamiento adecuado para la mejora de las infecciones de las vías respiratorias inferiores en bebés y niños causadas por *C. pneumoniae* (Numazaki et al., 2000). Por otro lado, se realizó un estudio en adultos que presentaban asma crónica a causa de este patógeno. Los trataron durante 4 semanas con doxiciclina, azitromicina o eritromicina. Esta terapia pareció curar o mejorar el asma en la mayoría de los pacientes tratados, y el patrón de respuesta fue consistente con la patogénesis por este microorganismo (Hahn, 1995).

Sin embargo, diagnosticar una infección de *Chlamydia* en reptiles puede ser complicado porque muchas veces no muestran síntomas clínicos y la infección puede durar mucho tiempo sin ser detectada. Para su diagnóstico se utilizan tanto cultivos bacterianos como la PCR, aunque la sensibilidad y especificidad de estas pruebas aún no se han optimizado para su uso en reptiles (Rodríguez-Domínguez et al., 2014). La falta de un conocimiento profundo sobre los mecanismos patogénicos y el ciclo de vida de *Chlamydia* en reptiles subraya la necesidad de más investigaciones, particularmente para comprender cómo estas infecciones afectan a las especies en la naturaleza y cómo prevenir la transmisión a humanos (Inchuai et al., 202) (Staub et al., 2018).

b. PATOGENIA EN HUMANOS POR BACTERIAS DEL ORDEN CHLAMYDIALES

La bacteria *C. pneumoniae* suele infectar principalmente las células del revestimiento del tracto respiratorio humano. Sin embargo, a diferencia de otras especies de *Chlamydia*, muestra un tropismo particular hacia los tejidos ateroscleróticos. Un estudio demostró que las inclusiones de *C. pneumoniae* se encuentran acompañadas de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Esta interacción interfiere con el transporte de la enzima desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática en las células endoteliales aórticas humanas primarias, lo que inhibe significativamente la liberación de óxido nítrico (NO) en las células infectadas, lo que lleva al deterioro de la función endotelial, promoviendo un estado proinflamatorio y proaterogénico. Esto favorece la inflamación crónica, facilita la acumulación de lípidos, y mayor riesgo de formación de placas ateroscleróticas (Mueller & Wolf, 2015).

Durante su fase infecciosa (CE), el patógeno se adhiere a las células del revestimiento mucoso respiratorio mediante endocitosis. Dentro del fagosoma, *C. pneumoniae* se replica formando microcolonias, que a las 36 horas de la infección pueden estar compuestas por cientos de bacterias. Durante este proceso de replicación, los antígenos de *Chlamydia* se liberan a la superficie de la célula hospedadora, lo que induce una respuesta inmunológica que, sin embargo, no perdura ni es completamente protectora. Aunque la transmisión de *C. pneumoniae* sigue siendo un tema de debate, se considera que se produce principalmente por aerosoles de gotitas respiratorias o a través de fómites. Se han documentado focos de infecciones por *Chlamydia* en ambientes cerrados, como residencias de ancianos, cuarteles militares y cárceles. Aunque la infección aguda no está asociada a un período estacional específico, su prevalencia varía con la edad y la zona geográfica. Es menos común en niños en edad escolar, pero aumenta significativamente en la edad adulta, con más del 80% de los individuos adultos mostrando evidencia de exposición. La mayoría de los casos son leves o asintomáticos, pero el espectro de la infección puede ser más amplio y abarcar enfermedades crónicas que inicialmente no se consideraban infecciosas, tales como asma, artritis, aterosclerosis y esclerosis múltiple (Quiles Machado et al., 2018).

c. CHLAMYDIALES EN OTRAS ESPECIES ANIMALES

Las especies de *Chlamydia* no solo afectan a los humanos, sino que también son importantes patógenos de animales, algunos incluso con carácter zoonótico. Estos últimos pueden transmitirse entre animales y humanos, especialmente en el caso de especies como *C. psittaci* y *C. abortus*. La infección por *C. psittaci*, conocida como psitacosis, es particularmente relevante en la transmisión desde aves infectadas a los humanos, causando principalmente infecciones respiratorias agudas. Esta transmisión suele ocurrir a través de la inhalación de aerosoles contaminados con secreciones de aves infectadas o por contacto directo con excrementos o plumas infectadas. La psitacosis se ha reportado principalmente en trabajadores de aves, veterinarios y personas que tienen contacto frecuente con aves de jaula (Rohde et al., 2010).

Por otro lado, *C. abortus* es un agente causante de abortos en ganado, especialmente en ovinos y cabras, y ocasionalmente en ganado vacuno. La transmisión al ser humano ocurre por contacto directo con animales infectados, a través de fluidos abortivos o tejidos fetales. Las mujeres embarazadas deben tener cuidado, ya que se han reportado casos en los que han ocurrido abortos espontáneos e infecciones graves en ellas después de estar en contacto con ovejas o cabras infectadas. Esta especie es responsable de la fiebre de Q, una infección zoonótica que puede producir síntomas similares a los de la gripe, pero que en casos graves puede evolucionar hacia infecciones sistémicas (Rohde et al., 2010).

En mascotas, como gatos y perros, se han observado infecciones por *C. felis* y *C. abortus*. Los gatos pueden ser infectados por *C. felis*, que afecta principalmente sus ojos, causando conjuntivitis, y se ha descrito que la transmisión a humanos podría ocurrir a través del contacto cercano con los ojos o secreciones nasales de los animales infectados. En perros, aunque menos frecuente, se han reportado casos de infecciones respiratorias leves asociadas con *C. pneumoniae* (Ulbert et al., 2024).

Además, diversas especies de *Chlamydia* han sido reportadas en animales silvestres. En particular, *C. psittaci* ha sido identificada en aves silvestres, como loros, y en mamíferos como koalas. La presencia de *Chlamydia* en estos animales silvestres destaca el papel potencial de estos como reservorios de la infección y su capacidad para actuar como fuentes de transmisión zoonótica hacia los humanos (Rohde et al., 2010).

Las infecciones por Chlamydiales en reptiles no se han estudiado tanto en comparación con otros grupos de animales, pero cada vez se reconocen más, ya que tienen importancia para la salud de animales y de humanos, y pueden afectar a los reptiles en cautiverio y en

la naturaleza. Especies de *Chlamydia*, como *C. psittaci* y *C. pneumoniae*, han sido detectadas en diversas especies de reptiles, incluidos tortugas, serpientes, cocodrilos y lagartos. En particular, se ha reportado la presencia de *C. psittaci* en tortugas terrestres y acuáticas, lo que ha suscitado preocupaciones sobre la transmisión de estas bacterias tanto en ambientes naturales como en zoológicos y establecimientos que albergan reptiles como mascotas (Inchuai et al., 2021).

Se han documentado infecciones en especies como la tortuga mora, tortuga verde (*Chelonia mydas*) y galápago de Florida (*Trachemys scripta*), entre otras. Estas infecciones pueden ser asintomáticas o manifestarse en forma de problemas respiratorios, cardíacos, hepatitis o conjuntivitis (Inchuai et al., 2021). Las tortugas en cautiverio son especialmente vulnerables debido a las condiciones de estrés, manejo inadecuado y hacinamiento, que pueden predisponerlas a infecciones bacterianas crónicas. Además, *C. psittaci* en tortugas ha sido vinculada a infecciones del tracto respiratorio provocando rinitis, y reproductivas que pueden afectar la viabilidad de poblaciones en cautiverio y en hábitats naturales (Pace et al., 2022).

Actualmente el síndrome más grave que producen en reptiles, y especialmente en tortugas, es el conocido síndrome de las vías altas (URTD por sus siglas en inglés), caracterizado por rinitis crónica y debilitante, altamente contagioso, y que puede llegar a ser mortal (Homer et al., 1994) (Bellinati et al., 2022) (Laroucau et al., 2020).

La transmisión de *Chlamydia* en tortugas generalmente ocurre por el contacto directo con otros animales infectados o a través de fómites contaminados. En algunos casos, la bacteria puede permanecer latente en los animales sin mostrar signos evidentes de enfermedad, lo que dificulta el diagnóstico temprano. La infección crónica puede afectar la salud general de las tortugas y aumentar la susceptibilidad a otras enfermedades, lo que representa un desafío para su manejo en conservación y en establecimientos de fauna silvestre. En reptiles en la naturaleza, el papel de estos animales como reservorios zoonóticos sigue siendo un área de investigación activa, con informes ocasionales de transmisión a humanos, especialmente entre personas que manejan reptiles en zoológicos o que mantienen reptiles como mascotas (Mitura et al., 2017).

La detección de especies de *Chlamydia* en reservorios animales, tanto domésticos como silvestres, refuerza la importancia de la vigilancia en salud pública, especialmente en el contexto del enfoque *One Health*, que reconoce la unión entre la salud humana, animal y ambiental.

d. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL URTD EN REPTILES

Los problemas respiratorios en reptiles, como la rinitis, pueden ser causados por diversos agentes biológicos como bacterias, virus y hongos. Entre los patógenos bacterianos más comunes destacan *Chlamydia* spp. y *Mycoplasma* spp., cada vez más importantes en tortugas. En concreto, *C. pneumoniae* y *C. poikilotherma*, pueden provocar secreción nasal, conjuntivitis y letargia (Mitura et al., 2017). Por otro lado, *M. agassizii* y *M. testudineum* son bacterias sin pared celular y oportunistas, que pese a formar parte de la microbiota respiratoria, pueden mostrar signos clínicos bajo estrés o inmunosupresión. Sin embargo, ambos agentes pueden encontrarse en casos asintomáticos, dificultando el diagnóstico clínico (Brown et al., 1994) (Pace et al., 2022). Además, el hecho de observar tortugas con síntomas, pero negativas a estos dos patógenos sugiere la presencia de otros microorganismos, especialmente virus. Entre estos se incluyen herpesvirus, iridovirus y nidovirus relacionados con brotes severos de neumonía tanto en tortugas terrestres como acuáticas (Marschang et al., 2021). También se han detectado picornavirus en tortugas como la tortuga selvática (*Indotestudo forsteni*), aunque su papel en el sistema respiratorio aún necesita más estudios (Ng et al., 2015).

Las infecciones fúngicas son menos, pero también hay casos, siendo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Candida* spp., los más frecuentes. Suelen afectar a especímenes inmunodeprimidos o sometidos a condiciones ambientales desfavorables (Orós et al., 2004). Por otro lado, hay bacterias oportunistas como *Pasteurella testudinis* y *Pseudomonas* spp que pueden contribuir a estos síntomas (Snipes et al., 1995).

En esta situación, el diagnóstico diferencial requiere de pruebas como la PCR, utilizando como muestras hisopos o lavados nasofaríngeos, ya que los signos clínicos no permiten diferenciar bien los agentes y muchos de ellos son de cultivo fastidioso. También es fundamental detectar coinfecciones, ya que pueden agravar la enfermedad.

e. DESAFÍOS Y VACÍOS EN EL CONOCIMIENTO EN EL ABORDAJE ONE HEALTH DE LAS BACTERIAS DEL ORDEN CHLAMYDIALES

El abordaje *One Health* en el estudio y manejo de las infecciones por bacterias del orden Chlamydiales enfrenta varios desafíos y vacíos en el conocimiento que dificultan una comprensión integral y efectiva de su impacto en la salud humana, animal y ambiental.

Uno de los principales retos es la identificación de reservorios animales, particularmente en especies silvestres, que pueden actuar como fuentes de transmisión zoonótica hacia los humanos. Aunque se ha documentado la presencia de *Chlamydia* en diversas especies animales, la dinámica de transmisión entre animales silvestres, domésticos y humanos aún no está esclarecida. Además, la variedad genética y la capacidad de adaptación de las especies de *Chlamydia* hacen que sea más difícil crear estrategias de prevención y control eficaces en todo el mundo. Esto se debe a que los patrones de infección y los factores de riesgo pueden cambiar mucho dependiendo de la región o el ecosistema donde se encuentren (Abdelsamed et al., 2013). Otro gran reto es que todavía no se entiende por completo cómo *Chlamydia* causa enfermedades crónicas, como la aterosclerosis y la esclerosis múltiple. Estas enfermedades van más allá de las infecciones respiratorias o genitales tradicionales (Contini et al., 2010). Además, a pesar de los avances en las técnicas de diagnóstico, la disponibilidad y la efectividad de las pruebas serológicas y moleculares, siguen siendo limitadas, lo que afecta la detección temprana y el monitoreo de brotes zoonóticos (Bommana et al., 2019).

Finalmente, la falta de datos sobre la prevalencia en poblaciones animales silvestres y el acceso limitado a estudios de campo en ciertas regiones remotas subrayan la necesidad de mejorar la vigilancia y la investigación multidisciplinaria en salud pública y veterinaria bajo el enfoque *One Health*.

5. METODOLOGÍA

5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la realización de este estudio, se analizaron 87 muestras de hisopos nasofaríngeos recogidos por investigadores del grupo Salud Global de tortugas mora mantenidas en cautividad en la fundación para la Investigación en Etología y Biodiversidad (FIEB). Durante el manejo de los animales se respetó siempre la ley de bienestar animal.

Un aspecto a tener en cuenta para el análisis de los datos es que la recolección de las muestras se realizó en tortugas halladas en cautiverio y distribuidas en distintas instalaciones, pudiendo influir en la interpretación de los resultados, ya que la distancia entre ellas puede interferir en la transmisión del patógeno.

En el laboratorio, la extracción de ADN se realizó utilizando el kit QuickGene DNA tissue kit S (Fujifilm®), siguiendo un protocolo modificado. Se prepararon los eppendorfs con 300 µL de la muestra diluida a 1:5 en PBS o agua estéril, 20 µL de reactivo EDT (Proteinasa K o tampón de elución), 180 µL de reactivo MDT (tampón de digestión celular/tisular), y se pasó por el vórtex durante 15 segundos. Posteriormente, se añadieron 250 µL del reactivo LDT (tampón de lisis) y se vortexearon nuevamente 10 segundos. Para extraer además RNA, en este punto se añadieron 3µL de RNA carrier. Este procedimiento incluyó una incubación de 70°C por 10 minutos y 95°C por 2 minutos, seguido de un lavado con 350 µL de etanol absoluto.

Se pasó el contenido de los eppendorfs a las columnas de Fujifilm® para posteriormente presurizar. Tras esto, se realizaron un total de 3 lavados con 750 µL de WDT (tampón de lavado) cada uno. Por último, se tiró el contenido de los tubos colectores y se pusieron las columnas sobre eppendorfs estériles, para añadir 50 µL de CDT (buffer de lisis celular), y tras incubar 1 minuto a temperatura ambiente, se presurizó de nuevo para obtener el material genético, que se almacenó a -70°C.

5.2. PCR

Una vez extraído el material genético, se llevó a cabo la PCR en tiempo real para detectar Chlamydiales. Se utilizaron unos cebadores específicos para la región 23S del RNA ribosomal de Chlamydiales:

- Ch23S-F: 5'-CTGAAACAGAGGTATTAAAGGGGT-3'
- Ch23S-R: 5'-ACCTCGCGGTTTAACTTAACTCC-3'
- Sonda: Ch23S-p, marcada con el fluoróforo 6-FAM y el quencher BHQ1.

El protocolo de PCR incluyó la preparación de un mix para cada reacción, con 10 µL de 2x Quantiprobos Master Mix, 0,3 µL de cada cebador (Ch23S-F y Ch23S-R, 20 µM), 0,5 µL de la sonda Ch23S-p (10 µM), y 5,4 µL de agua de PCR. A este mix se le añadieron 3,5 µL de la muestra de material genético extraído, alcanzando un volumen final de 20 µL por reacción.

Las condiciones de amplificación fueron:

- Desnaturalización inicial: 5 minutos a 95°C.

- 40 ciclos de:
 - Desnaturalización: 10 segundos a 95°C.
 - Hibridación y extensión: 30 segundos a 64°C.

Los resultados se registraron en tiempo real mediante la medición de la fluorescencia (Ehnricht et al., 2006).

5.3. ANÁLISIS *IN SILICO* DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA PATOGÉNESIS

Para evaluar la homología y la relación funcional entre las proteínas asociadas al proceso patogénico de cepas de *Chlamydia*, se realizaron análisis *in silico*. Para ello, se recopilaron las secuencias de estas proteínas relacionadas con especies del género *Chlamydia*, incluyendo cepas aisladas de reptiles (*C. pecorum*, *C. psittaci*, etc) y cepas humanas zoonóticas como *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Las secuencias de interés correspondieron a las proteínas OmpA, Pmp e IncA, analizadas de manera independiente.

La obtención de las secuencias se realizó mediante búsquedas en la base de datos NCBI utilizando la herramienta BLASTp o BLASTn en el caso de OmpA.

Primero se realizó un alineamiento múltiple de secuencias. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante herramientas de alineamiento múltiple y por pares, empleando el software ClustalW®, para comparar la homología entre proteínas de distintas especies.

A continuación, se realizó un análisis filogenético para evaluar las relaciones evolutivas y similitudes entre las cepas en relación a estas proteínas. Se construyeron árboles filogenéticos utilizando el software MEGA® v.12. Los árboles se generaron aplicando el método estadístico Neighbor-Joining con el test de filogenia de bootstrap con 500 réplicas para evaluar la robustez de las agrupaciones.

Los árboles presentan ramas con especies externas como *Pasteurella multocida*, *P. trehalosi*, *Starmarella bombicola*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter hormaechei*, para relativizar las distancias, permitiendo observar la divergencia evolutiva de *Chlamydia* respecto a otros microorganismos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se procesaron 87 muestras, de las cuales el 47,1% (41/87) fueron positivas y 52,9% (46/87) negativas a *Chlamydia*. El porcentaje de positividad en este estudio (47,1%), es significativo, pero puede considerarse inferior al reportado en otros estudios similares. Por ejemplo, en un estudio realizado en tortugas mora que presentaban signos respiratorios se detectó una positividad del 98,3% (57/58) mediante PCR en tiempo real. No obstante, se debe tener en cuenta que dicho estudio se centró exclusivamente en animales con sintomatología clínica evidente, mientras que en el presente análisis también se incluyeron muestras sin síntomas aparentes (Laroucau et al., 2020).

A continuación, se muestran los resultados teniendo en cuenta el alojamiento de las tortugas en los diferentes sectores:

- Sector 1. De las 17 tortugas, el 41,2% (7/17) resultaron positivas para *Chlamydia*, presentando síntomas el 85,7% (6/7). Entre las tortugas negativas (58,8%, 10/17), sólo una presentó signos clínicos (10%, 1/10), y el resto (90%, 9/10) fueron asintomáticas.
- Sector 2. De este grupo se evaluaron 34 tortugas, EL 38,2% (13/34) fueron positivas para *Chlamydia*, de las cuales el 15,4% (2/13) presentaron síntomas, mientras que el 84,6% (11/13) fueron asintomáticas. Se registraron un 61,8% (21/34) de casos negativos, de los cuales, un 28,6% (6/21) presentaron síntomas y un 71,4% (15/21) no.
- Sector 3. En este grupo se incluyeron 8 especímenes; un 25% (2/8) resultaron positivos y ambos presentaban síntomas, y un 75% (6/8) fueron negativos, de los cuales, un 33,3% (2/6) fueron sintomáticos y un 66,6% (4/6) asintomáticos.
- Sector 4. En total se analizaron 12 tortugas. Un 50% (6/12) dieron positivo, de las cuales un 83,3% (5/6) presentaban secreción nasal y un 16,6% (1/6) no. El 50% (6/12) de las muestras restantes resultaron negativas para esta bacteria, siendo un 66,6% (4/6) sintomáticas y un 33,3% (2/6) asintomáticas.
- Sector 5. Este grupo comprendía 16 muestras, un 81,3% (13/16) fueron positivas, siendo el 38,5% (5/13) sintomáticas y el 61,5% (8/13) asintomáticas. El 18,8% (3/16) restante resultaron ser negativas, de las cuales el 66,6% (2/3) tenían síntomas y el 33,3% (1/3) no presentaron síntomas.

Como se puede observar, la relación entre la infección por *Chlamydia* y los síntomas, no son uniformes entre los sectores. En el sector 1, hay gran correlación entre positivos y sintomáticos, y negativos asintomáticos. La mayor proporción de positivos asintomáticos (84,6%) se encontró en el sector 2, ya que estos microorganismos podrían estar actuando como patógenos oportunistas subrayando a las tortugas como posibles portadoras, necesiéndose una mayor vigilancia ya que dificultan el control sanitario. En el sector 3 todos los positivos fueron sintomáticos, por tanto, en esta zona parece que la bacteria sí está asociada a los signos clínicos. Sin embargo, en el sector 4, tanto en casos positivos como negativos hubo una alta proporción de asintomáticos, pudiendo haber otros agentes etiológicos involucrados que no sean *Chlamydia* o factores no infecciosos (estrés, condiciones ambientales, etc) (Pace et al., 2022). El sector 5 presenta la mayor tasa de positividad (81,3%), aunque muchos de ellos fueron asintomáticos, lo que puede deberse a una posible tolerancia local o inmunidad parcial. La elevada carga bacteriana en espacios donde las tortugas conviven estrechamente, sugiere una alta probabilidad de contagio por contacto directo entre los individuos, así como a través de secreciones respiratorias o fómites (Mitura et al., 2017).

Con el fin de descubrir la posible relación entre la presencia de síntomas clínicos y la infección por *Chlamydia*, se clasificaron las muestras en cuatro categorías: positivos sintomáticos, positivos asintomáticos, negativos sintomáticos y negativos asintomáticos (Figura 2). Observando la distribución de los casos, un 40,2% (35/87) de individuos presentaron síntomas, siendo un 57,1% (20/35) muestras positivas a *Chlamydia*, mientras que el 42,8% (15/35) restante fueron negativas. Por otro lado, el 59,8% (52/87) de los ejemplares no mostraron síntomas, siendo un 40,4% (21/52) positivos y un 59,6% (31/52) negativos. Estos datos sugieren una alta proporción de resultados positivos entre individuos sintomáticos. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por (Laroucau et al., 2020), quienes detectaron una positividad del 98,3% (57/58) en tortugas mora que presentaban signos de rinitis. En el estudio también se observa una alta proporción de casos negativos y asintomáticos, posiblemente porque no estuvieron en contacto directo con tortugas infectadas o porque tuviesen un gran sistema inmunitario.

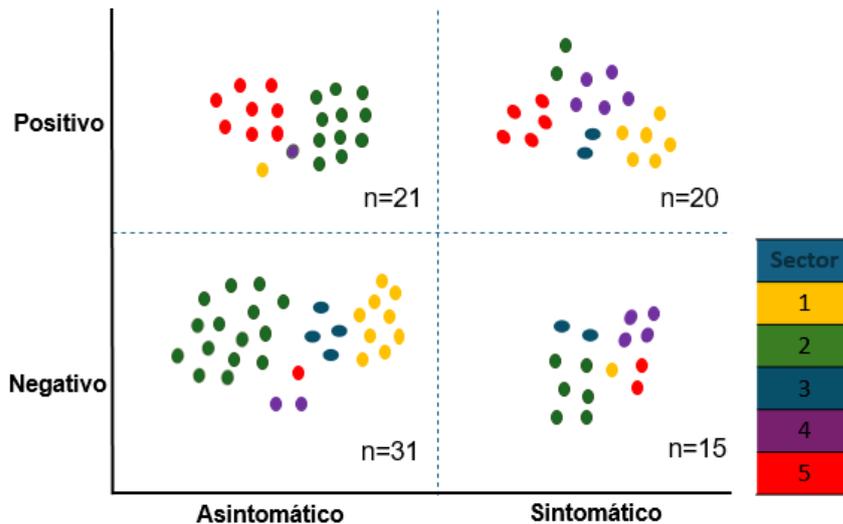


Figura 2. Gráfico de dispersión de las muestras analizadas según su estado clínico (sintomático/asintomático) y el resultado de la PCR para *Chlamydia* (positivo/negativo). Cada punto representa un individuo, y los colores indican de qué sector viene cada muestra.

El análisis de esta distribución se calculó por el odds ratio (OR), dando un valor de 1,97. Este dato indicó que la probabilidad de presentar síntomas estando infectado por *Chlamydia* era casi el doble que siendo asintomático. Esto refleja una posible asociación entre la presencia de signos clínicos y la infección.

Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan la posible implicación de *Chlamydia*, especialmente *C. psittaci* y *C. trachomatis*, como agentes patógenos importantes en la causa de rinitis en tortugas, ya que gran parte de las muestras resultaron positivas, aunque sólo la mitad tuviesen síntomas. Sin embargo, el hecho de que algunas muestras positivas fuesen asintomáticas, sugiere que no solo la presencia del patógeno se correlaciona con la aparición de la enfermedad. Esto podría deberse al carácter oportunista de *Chlamydia*, pudiendo formar parte de la microbiota normal sin causar patología, a menos que se vean favorecidas por condiciones externas. Es probable que factores ambientales, inmunológicos, así como variaciones individuales entre los animales, influyan en la activación del patógeno y en la severidad del cuadro clínico (Rohde et al., 2010). Además, la detección de individuos sintomáticos que resultaron negativos para *Chlamydia*, sugiere que otros agentes biológicos también podrían estar involucrados en la patogenia del síndrome respiratorio en reptiles, como por ejemplo *Mycoplasma spp.*

Análisis *in silico* de genes y proteínas en *Chlamydia*

La búsqueda de genes y proteínas en secuencias de cepas de *Chlamydia*, en concreto del gen *ompA*, la proteína OmpA, Pmp e IncA, presentan gran relevancia en la patogenicidad del patógeno.

Desde una perspectiva molecular, el análisis *in silico* de las secuencias de proteínas OmpA, Pmp e IncA reveló importantes aspectos evolutivos. En particular, se evidenció una falta considerable de información sobre cepas adaptadas a reptiles como hospedadores, limitando el conocimiento actual de sus mecanismos de patogenicidad. A pesar de ello, los árboles filogenéticos generados con secuencias de proteínas permiten observar cómo diferentes especies de *Chlamydia* se agrupan en función de la similitud estructural y funcional de estas proteínas, posiblemente reflejando presiones evolutivas asociadas al hospedador y al tejido diana.

El árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína OmpA muestra la diversidad evolutiva de diferentes cepas de *Chlamydia*. Esta proteína se mantiene bastante conservada a lo largo del tiempo, aunque presenta algunas regiones variables que pueden estar asociadas a su función inmunogénica, ya que actúa como proteína de superficie implicada en la interacción con el sistema inmune del hospedador (Figura 3) (Confer & Ayalew 2013). Para la estimación de la fiabilidad se usó el método bootstrap, donde los valores superiores al 70% indican una alta fiabilidad estadística en la agrupación de las secuencias.

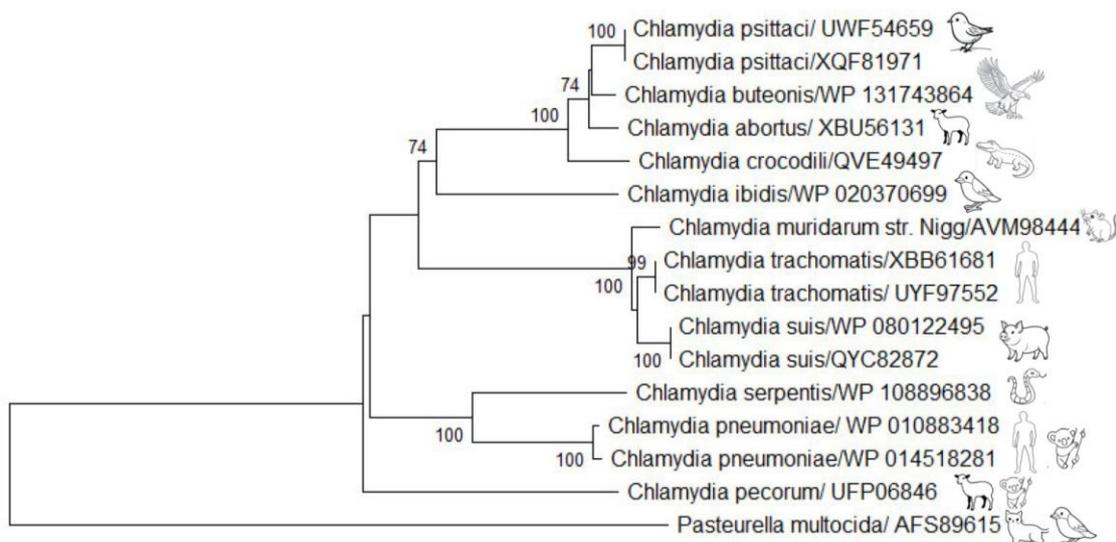


Figura 3. Árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína OmpA de diferentes especies del género *Chlamydia*. Los valores de bootstrap indican el soporte estadístico de cada nodo.

Las cepas *C. abortus*, *C. buteonis*, *C. crocodili* y *C. ibidis* aparecen más cercanas entre sí, reflejando un posible ancestro común en estos hospedadores no humanos. De manera similar ocurre con *C. trachomatis*, *C. muridarum* y *C. suis*, ya que presentan una fuerte agrupación con un bootstrap de 99-100, siendo las tres cepas hospedadoras de mamíferos. Presentan un linaje común que se ha mantenido evolutivamente estable, seguramente por las similitudes en los receptores celulares y ambientes fisiológicos del hospedador (Mitchell et al., 2010). Estos resultados se complementan con el análisis del genoma completo de *C. trachomatis*, que revela características de la biología de estas bacterias. A pesar de depender de su hospedador, conserva funciones clave en el metabolismo y posee genes con similitud eucariota, lo que refuerza el valor evolutivo conservado de la proteína OmpA dentro del género (Stephens et al., 2009). Por otra parte, el uso de *Pasteurella multocida* como grupo externo muestra una clara separación filogenética respecto a *Chlamydia*, ya que se aleja de manera significativa del resto de microorganismos, confirmando que pertenece a un grupo bacteriano diferente (Piorunek et al., 2023).

En conjunto, este árbol basado en la proteína OmpA, muestra una clara separación de grupos correspondientes a especies adaptadas a humanos (*C. trachomatis* y *C. pneumoniae*), aves (*C. psittaci*, *C. avium*), mamíferos (*C. felis*, *C. suis*, *C. pecorum*) y reptiles (*C. poikilotherma*, *C. crocodili*), lo que parece indicar una adaptación evolutiva que ha sido influenciada por el tipo de hospedador en el que viven. Estas diferencias en las secuencias de OmpA podrían estar relacionadas con la necesidad de interactuar con receptores celulares específicos de cada especie, lo que afecta directamente a su tropismo tisular y capacidad infectiva (Confer & Ayalew, 2013).

A continuación, se realizó un árbol basado en la secuencia nucleotídica del gen *ompA* de diferentes especies del género *Chlamydia* (Figura 4). Este gen es muy utilizado en filogenia por su gran variabilidad en regiones específicas, permitiendo distinguir entre especies y cepas. Al estar basado en el DNA y no en proteínas, se reflejan relaciones evolutivas más basales, permitiendo detectar incluso variaciones en zonas silenciosas o no traducidas, proporcionando una resolución más fina en la historia evolutiva del género (Lysén et al., 2004). Especies como *C. psittaci* (aves), *C. abortus* (rumiantes), *C. felis* (gatos) y *C. caviae* (cobayas) presentan un alto soporte bootstrap (100), indicando un origen evolutivo entre ellas que podría reflejar no solo similitudes genéticas sino también su capacidad zoonótica (Knittler & Sachse, 2014). Por otro lado, *C. pecorum* (koalas y

rumiantes), *C. serpentis* (reptiles) y *C. ibidis* (aves) podrían presentar una adaptación cruzada a hospedadores muy diversos, pudiendo ser por eventos de transferencia o adaptación, tal como se ha presentado en otros estudios que destacan la plasticidad genética de *Chlamydia* para colonizar distintos nichos ecológicos (Elwell et al., 2016). *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* aparecen agrupadas como sinónimos, reflejando una reorganización taxonómica, siendo cercanas a *C. trachomatis* que se separa de especies animales, afectando a humanos también. A su vez, *C. suis* y *C. muridarum*, ambas especies hospedadores de mamíferos (roedores y cerdos), presentan cercanía con *C. trachomatis*, sugiriendo un ancestro común. Como grupo externo se usó *Pasteurella trehalosi*, determinando una distinta dirección evolutiva.

En conclusión, el árbol filogenético basado en este gen no solo confirma relaciones evolutivas ya conocidas, sino que también sugiere la presencia de procesos de adaptación cruzada y reorganización taxonómica esenciales para entender la diversidad y evolución de *Chlamydia*. Futuros estudios podrían explorar en mayor profundidad los mecanismos moleculares de esta adaptación y su impacto en la zoonosis y la epidemiología.

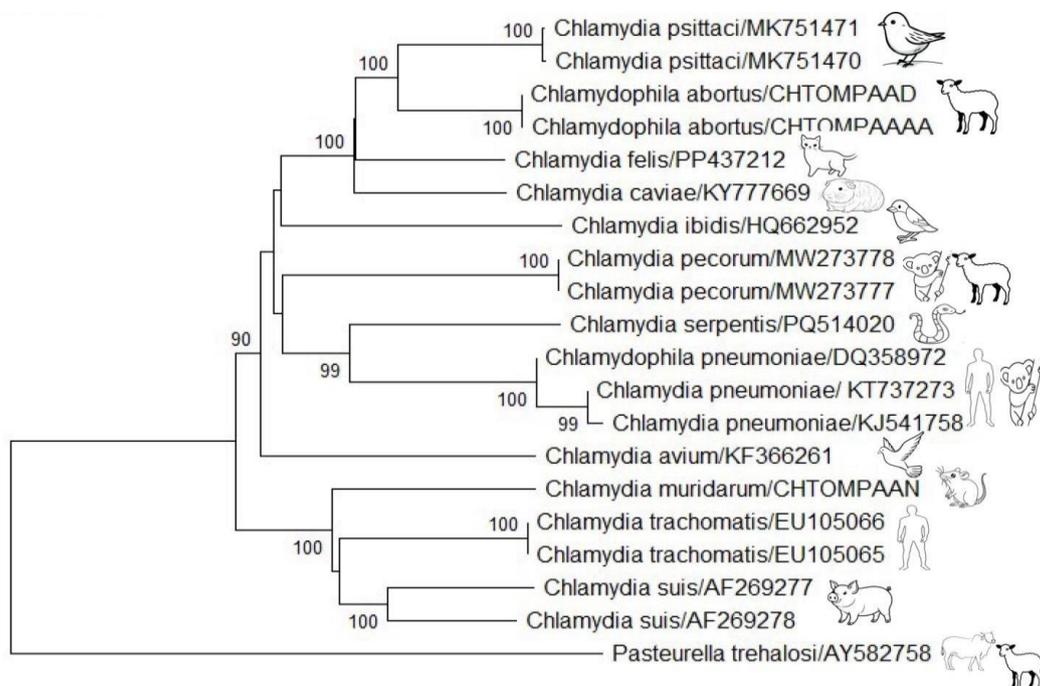


Figura 4. Árbol filogenético basado en las secuencias nucleotídicas del gen *ompA* de distintas especies de *Chlamydia*. Presenta gran fuerza entre las agrupaciones, ya que los bootstrap son 99-100.

Por otro lado, el árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína Pmp de diferentes cepas de *Chlamydia* revela patrones evolutivos significativos (Figura 5). Esta proteína pertenece a una familia de proteínas de superficie específicas de *Chlamydia*, asociadas con funciones de adhesión celular y de evasión del sistema inmune del hospedador (Mölleken et al., 2010). Entre las cepas analizadas, *C. caviae*, *C. poikilotherma*, *C. buteonis* y *C. gallinacea* presentan cierta relación (bootstrap 99-100), infectando a animales exóticos o no convencionales, incluyendo reptiles y aves, lo que sugiere una adaptación evolutiva a estos hospedadores. Por otro lado, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* especies relevantes en la salud humana, y *C. pecorum* frecuente en rumiantes y koalas, presentan una alta proximidad evolutiva, reflejando una posible conservación de funciones estructurales de la proteína Pmp. Las demás cepas, aunque tienen un soporte alto, muestran una gran diversidad de hospedadores. La presencia de cepas como *C. poikilotherma*, *C. crocodili* y *C. serpentis*, asociadas a reptiles, pueden sugerirse como posibles patógenos para las tortugas. La cepa usada como *outgroup* fue *Starmerella bombicola*, que es una levadura no relacionada con *Chlamydia*.

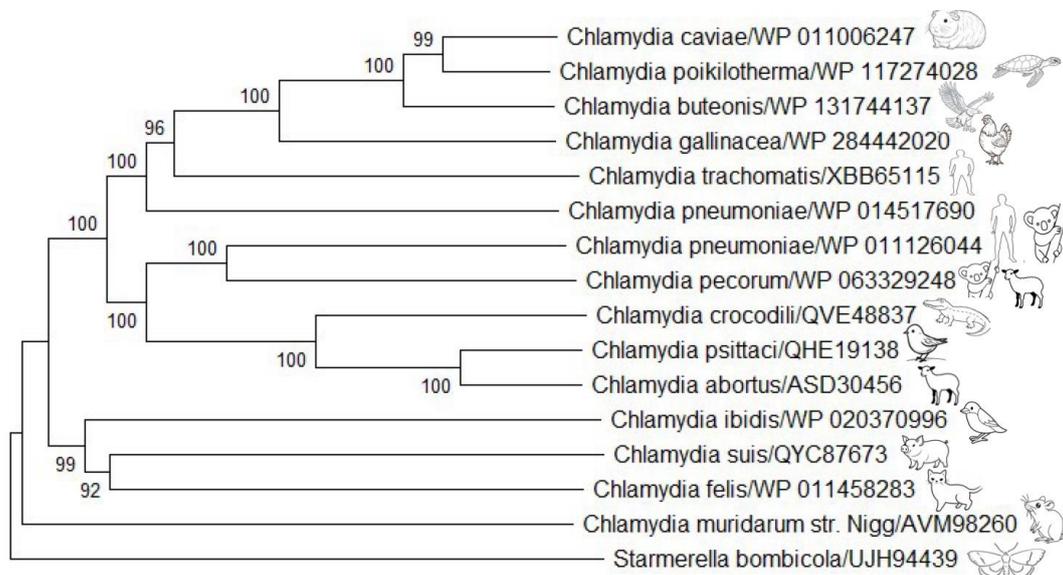


Figura 5. Árbol filogenético formado a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína Pmp de diferentes cepas de *Chlamydia*. Los valores altos de bootstrap muestran robustez en las agrupaciones.

Este análisis evidencia una diversificación funcional entre especies, con grupos con gran soporte (bootstrap >90) entre especies adaptadas a un mismo grupo de hospedadores, lo que sugiere que la evolución de estas proteínas ha sido impulsada por la necesidad de adaptarse a contextos fisiológicos y celulares particulares. Estos hallazgos coinciden con

estudios previos donde se analizaron genes *pmp* en serovares de *C. trachomatis* y observaron que muchos de esos genes se agrupaban según el tropismo tisular, reforzando la hipótesis de que las proteínas Pmp están implicadas en la selección del tipo celular hospedador y la evasión inmunitaria (Gomes et al., 2006).

Por último, el análisis filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína IncA revela agrupaciones significativas entre especies de *Chlamydia* (Figura 6). *C. trachomatis* (humano), *C. suis* (cerdo), *C. caviae* (cobaya), *C. gallinacea* (aves), y *C. avium* (aves) presentan una agrupación potente con un bootstrap 99, sugiriendo una relación entre hospedadores de mamíferos y aves. Otro grupo aparte se encuentra formado por *C. psittaci*, *C. felis*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*, todos ellos con capacidad zoonótica y que pueden infectar animales como aves, felinos, humanos y rumiantes. Es especialmente relevante el grupo formado por *C. poikilotherma*, *C. crocodili* y *C. buteonis*, con hospedadores como reptiles y aves rapaces, en el que también se encuentran cepas como *C. abortus* y *C. caviae*. Esto puede indicar una posible adaptación de estas especies de *Chlamydia* a hospedadores de sangre fría, siendo de interés en la tortuga mora. Estas observaciones coinciden con estudios previos que destacan la importancia de las proteínas de la membrana de inclusión (Inc) en la interacción patógeno-hospedador y en la manipulación del entorno intracelular. En el estudio de (Moore & Ouellette, 2014) propusieron que la inclusión de *Chlamydia* actúa como un orgánulo parasitario especificado por el patógeno, donde las proteínas Inc desempeñan un papel esencial en la evasión de las defensas inmunitarias del hospedador y en la adquisición de nutrientes, adaptándose a diferentes etapas del ciclo de desarrollo de *Chlamydia*.

mayor profundidad sus mecanismos de virulencia y el papel que juegan en patologías como el URTD en tortuga mora.

Finalmente, este estudio ayuda a alcanzar varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), como el ODS 3 (Salud y bienestar, enfocándose en enfermedades zoonóticas emergentes), el ODS 13 (Acción por el clima, considerando el impacto ambiental en los reptiles), el ODS 15 (Vida en los ecosistemas terrestres, mediante la conservación de la tortuga mora; y el ODS 17 (Alianzas para lograr objetivos, promoviendo el enfoque interdisciplinario entre salud humana, animal y ambiental).

7. CONCLUSIONES

La detección mediante la técnica de PCR de *Chlamydia* en tortugas mora ha permitido sustentar la hipótesis de que ciertas especies del orden Chlamydiales, como *C. psittaci*, *C. trachomatis* o *C. poikilotherma*, podrían desempeñar un papel importante en la causa del URTD en esta especie vulnerable. Esta idea se ve fortalecida por la detección de una alta proporción de ejemplares sintomáticos. No obstante, la presencia de casos positivos sin síntomas sugiere que factores externos, como condiciones ambientales, el estado inmunológico o las interacciones entre individuos, podrían estar influyendo en la expresión clínica de la infección.

De la misma manera, la aparición de tortugas sintomáticas pero con PCR negativas a *Chlamydia*, plantea la posible implicación de otros agentes patógenos. En este contexto no se ha determinado si la coinfección con otras bacterias intracelulares como *Mycoplasma spp.*, podría influir en la gravedad y progresión de la enfermedad.

Por otro lado, el análisis *in silico* de proteínas clave como OmpA, Pmp e IncA demostró la escasa disponibilidad de secuencias específicas pertenecientes a cepas de reptiles, limitando así el conocimiento sobre los factores de patogenicidad de *Chlamydia* en estos hospedadores. A pesar de ello, los árboles filogenéticos generados ofrecen una visión útil sobre las relaciones evolutivas entre distintas especies del género, y sugieren que la adaptación de *Chlamydia* a hospedadores poiquilotermos como las tortugas, ha ido acompañada de divergencias funcionales en genes implicados en la infección intracelular. Por último, este estudio subraya la falta de información sobre los mecanismos moleculares y evolutivos que sustentan la patogenicidad de *Chlamydia* en reptiles, y surge

la necesidad de avanzar en la caracterización genómica y funcional de estos patógenos. Además, destaca la importancia de adoptar un enfoque multidisciplinar para el estudio de enfermedades infecciosas en fauna silvestre, especialmente en especies amenazadas como la tortuga mora, donde la salud animal y su conservación son objetivos principales.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelsamed, H., Peters, J., & Byrne, G. I. (2013). Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: Impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiology*, 8(9), 1129–1146. <https://doi.org/10.2217/FMB.13.80>
- Betts-Hampikian, H. J., & Fields, K. A. (2010). The Chlamydial Type III Secretion Mechanism: Revealing Cracks in a Tough Nut. *Frontiers in Microbiology*, 1(OCT), 114. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2010.00114>
- Bellinati, L., Pesaro, S., Marcer, F., Danesi, P., Natale, A., & Ceglie, L. (2022). Detection of a Novel *Chlamydia* Species in Invasive Turtles. *Animals*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/ANI12060784>
- Bommana, S., Jelocnik, M., Borel, N., Marsh, I., Carver, S., & Polkinghorne, A. (2019). The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock. *Journal of Medical Microbiology*, 68(4), 627–632. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000951>
- Brown, M. B., Schumacher, I. M., Klein, P. A., Harris, K., Correll, T., & Jacobson, E. R. (1994). *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. *Infection and Immunity*, 62(10), 4580–4586. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.10.4580-4586.1994>
- Campbell, L. A., Marrazzo, J. M., Stamm, W. E., & Kuo, C. C. (2023). *Chlamydia*. *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections*, 795–822. https://doi.org/10.5005/jp/books/12637_40
- Confer, A. W., & Ayalew, S. (2013). The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology*, 163(3–4), 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.019>
- Contini, C., Seraceni, S., Cultrera, R., Castellazzi, M., Granieri, E., & Fainardi, E. (2010). *Chlamydia pneumoniae* infection and its role in neurological disorders. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/273573>
- Ehricht 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: 60-63. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
- Elwell, C., Mirrashidi, K., & Engel, J. (2016). *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(6), 385. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2016.30>
- Everett, K. D. E. (2000). *Chlamydia* and *Chlamydiales*: More than meets the eye. *Veterinary Microbiology*, 75(2), 109–126. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00213-3)
- Favaroni, A., Trinks, A., Weber, M., Hegemann, J. H., & Schnee, C. (2021). Pmp Repertoires Influence the Different Infectious Potential of Avian and Mammalian *Chlamydia psittaci* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.656209>

- Gil-Sánchez, J. M., Rodríguez-Caro, R. C., Moleón, M., Martínez-Pastor, M. C., León-Ortega, M., Eguía, S., Graciá, E., Botella, F., Sánchez-Zapata, J. A., Martínez-Fernández, J., Esteve-Selma, M. A., & Giménez, A. (2022). Predation impact on threatened spur-thighed tortoises by golden eagles when main prey is scarce. *Scientific Reports*, 12(1), 17843. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-22288-9>
- Gitsels, A., Sanders, N., & Vanrompay, D. (2019). Chlamydial Infection From Outside to Inside. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2329. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02329>
- Gomes, J. P., Nunes, A., Bruno, W. J., Borrego, M. J., Florindo, C., & Dean, D. (2006). Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: Evidence for serovar da recombination and correlation with tissue tropism. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 275–286. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.275-286.2006>
- Hahn, D. L. (1995). Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection in adult asthma: a before-after trial, 41(4):345-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7561707/>
- Homer, B. L., Jacobson, E. R., Schumacher, J., & Scherba, G. (1994). Chlamydiosis in Mariculture-reared Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 31(1), 1–7. <https://doi.org/10.1177/030098589403100101>
- Horn, M. (2008). Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annual Review of Microbiology*, 62(Volume 62, 2008), 113–131. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.62.081307.162818/1>
- Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Europea. (s.f.). Universidad Europea de Madrid. <https://hospitalveterinario.universidadeuropea.com/>
- Inchuai, R., Weerakun, S., Nguyen, H. N., & Sukon, P. (2021). Global Prevalence of Chlamydial Infections in Reptiles: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(1), 32–39. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2020.2654>
- Interempresas Media, S.L.U. (2025, 22 de enero). Conoce el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Europea de Madrid, con servicio de urgencias 24 horas los 365 días del año. Interempresas. <https://www.interempresas.net/Mascotas/Articulos/585258-Conoce-Hospital-Clinico-Veterinario-Universidad-Europea-Madrid-servicio-urgencias-24.html>
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-1. Disponible online: <https://www.iucnredlist.org/> (Último acceso en 21 Mayo de 2025)
- Jordá, G. B., Hanke, S. E., Ramos-Rincón, J. M., Mosmann, J, López, M. L., Entrocassi, A. C., Cuffini, C. (2018). Prevalence and phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* in a population of women in Posadas, Misiones, 31(1):21-26. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29451375/>

- Knittler, M. R., & Sachse, K. (2015). Chlamydia psittaci: update on an underestimated zoonotic agent. *Pathogens and Disease*, 73(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTU007>
- Laroucau, K., Ortega, N., Vorimore, F., Aaziz, R., Mitura, A., Szymanska-Czerwinska, M., Cicerol, M., Salinas, J., Sachse, K., & Caro, M. R. (2020). Detection of a novel Chlamydia species in captive spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) in southeastern Spain and proposal of Candidatus Chlamydia testudinis. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(2). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126071>
- Lysén, M., Österlund, A., Rubin, C. J., Persson, T., Persson, I., & Herrmann, B. (2004). Characterization of ompA Genotypes by Sequence Analysis of DNA from All Detected Cases of Chlamydia trachomatis Infections during 1 Year of Contact Tracing in a Swedish County. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1641–1647. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15071019/>
- Marschang, R. E., Salzmann, E., & Pees, M. (2021). Diagnostics of Infectious Respiratory Pathogens in Reptiles. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 24(2), 369–395. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2021.01.007>
- Mitchell, C. M., Hutton, S., Myers, G., Brunham, R., Timms, P. (2010). Chlamydia pneumoniae is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions, 6(5):e1000903. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20502684/>
- Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Zając, M., Laroucau, K., & Szymańska-Czerwińska, M. (2017). Free-living and captive turtles and tortoises as carriers of new Chlamydia spp. *PLoS ONE*, 12(9), e0185407. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185407>
- Moore, E. R., & Ouellette, S. P. (2014). Reconceptualizing the chlamydial inclusion as a pathogen-specified parasitic organelle: An expanded role for Inc proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(OCT). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2014.00157>
- Mülleken, K., Schmidt, E., & Hegemann, J. H. (2010). Members of the Pmp protein family of Chlamydia pneumoniae mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Molecular Microbiology*, 78(4), 1004–1017. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2010.07386.X>
- Mueller, K. E., & Wolf, K. (2015). C. pneumoniae disrupts eNOS trafficking and impairs NO production in human aortic endothelial cells. *Cellular Microbiology*, 17(1), 119–130. <https://doi.org/10.1111/CMI.12341>
- Ng, T. F. F., Wellehan, J. F. X., Coleman, J. K., Kondov, N. O., Deng, X., Waltzek, T. B., Reuter, G., Knowles, N. J., & Delwart, E. (2015). A tortoise-infecting picornavirus expands the host range of the family Picornaviridae. *Archives of Virology*, 160(5), 1319–1323. <https://doi.org/10.1007/S00705-015-2366-6>

- Numazaki, K., Sakamoto, Y., Umetsu, M., Agatsuma, Y., Yamanaka, T., Kogasaka, R., Hiraki, M., Kuniya, Y., Miua, J., Ukae, S., Ueda, D., Sato, T., & Chiba, S. (2000). Therapeutic effect of clarithromycin for respiratory-tract infections in children caused by *Chlamydia pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13(3), 219–222. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00116-8)
- Okoh, G. R., Horwood, P. F., Whitmore, D., & Ariel, E. (2021). Herpesviruses in Reptiles. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.642894/PDF>
- Orós, J., Delgado, C., Fernández, L., & Jensen, H. E. (2004). Pulmonary hyalohyphomycosis caused by *Fusarium* spp in a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*): An immunohistochemical study. *New Zealand Veterinary Journal*, 52(3), 150–152. <https://doi.org/10.1080/00480169.2004.36420>
- Pace, A., Vicari, N., Rigamonti, S., Magnino, S., Borrelli, L., Dipineto, L., Fioretti, A., Hochscheid, S., Tavares, L., & Duarte, A. (2022). Detection of Chlamydial DNA from Mediterranean Loggerhead Sea Turtles in Southern Italy. *Animals*, 12(6), 715. <https://doi.org/10.3390/ANI12060715/S1>
- Piorunek, M., Brajer-Luftmann, B., & Walkowiak, J. (2023). *Pasteurella Multocida* Infection in Humans. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12101210>
- Quiles Machado, J. A., Aragón Domínguez, V., Monsalvo Hernando, M., & Gómez Durán, M. (2018). Neumonías bacterianas no neumocócicas (II). Infecciones respiratorias por *Mycoplasma* y *Chlamydia*. Neumonías víricas. *Medicine*, 12(54), 3186. <https://doi.org/10.1016/J.MED.2018.04.002>
- Rodríguez-Domínguez, M., Sanbonmatsu, S., Salinas, J., Alonso, R., Gutiérrez, J., & Galán, J. C. (2014). Microbiological diagnosis of infections due to *Chlamydia* spp. and related species. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(6), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.015>
- Rohde, G., Straube, E., Essig, A., Reinhold, P., & Sachse, K. (2010). Chlamydial Zoonoses. *Deutsches Arzteblatt International*, 107(10), 174. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2010.0174>
- Rucks, E. A. (2023). Type III Secretion in *Chlamydia*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 87(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-23>
- Snipes, K. P., Kasten, R. W., Calagoan, J. M., & Boothby, J. T. (1995). Molecular characterization of *Pasteurella testudinis* isolated from desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with and without upper respiratory tract disease. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(1), 22–29. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.1.22>
- Staub, E., Marti, H., Biondi, R., Levi, A., Donati, M., Leonard, C. A., Ley, S. D., Pillonel, T., Greub, G., Seth-Smith, H. M. B., & Borel, N. (2018). Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature-sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. *Scientific Reports*, 8(1), 5660. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-23897-Z>

- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V., & Davis, R. W. (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282(5389), 754–759. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5389.754>
- Ulbert, Á. B., Juhász, H., Karácsony, Z., Bencze, K., Deim, Z., Burián, K., & Terhes, G. (2024). The Occurrence of *Chlamydia felis* in Cats and Dogs in Hungary. *Pathogens*, 13(9), 771. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13090771/S1>