

ANEXO I

Requisitos para solicitar permiso de acceso a los recursos genéticos y a los conocimientos tradicionales asociados:

I. Datos del Solicitante *

Apellido y Nombre del Investigador Responsable/ Representante:

Javier A. Origlia

DNI:

23668138

Título y profesión:

Médico Veterinario

Correo electrónico:

javieroriglia@yahoo.com

Dirección particular:

Presidente Perón 486 (CP1900) Ensenada, Buenos Aires.

IF-2019-03569984-GDEBA-DGLYCNMAGP

Teléfono particular:

0221154088116

Institución que presenta el proyecto:

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Dirección laboral:

Calle 60 y 118 S/N (CP1900) La Plata, Buenos Aires.

Teléfono laboral:

0221 423-6663

(Con la presente se debe adjuntar copia de título habilitante de grado, DNI y copia certificada del poder en el caso que así amerite)

***Los mismos datos deben completados para cada integrante del proyecto que intervenga en el muestreo.**

Colaborador:

Apellido y Nombre del Colaborador: Gabriela Gorriti

DNI: 23481886

Título y profesión: Licenciada en Biología

Correo electrónico: gabrielagorriti@yahoo.com

Dirección particular: Presidente Perón 486 (CP1900) Ensenada, Buenos Aires.

Teléfono particular: 0221154883296

Institución que presenta el proyecto: ---

Dirección laboral: Presidente Perón 486 (CP1900) Ensenada, Buenos Aires.

Teléfono laboral: 0221154883296

II. Datos del proyecto

IF-2019-03569984-GDEBA-DGLYCNMAGP

Título del proyecto: *Chlamydia psittaci* en palomas. situación actual en palomas cautivas y silvestres en la región noreste de la provincia de buenos aires y su relación epidemiológica en humanos.

Objetivos:

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la presencia de *Chlamydia psittaci* (*Cp*) en aves de la familia Columbidae en cautiverio y de vida libre, de la región noreste de la provincia de Buenos Aires (La Plata y partidos vecinos), determinar qué genotipo/os circulan en las poblaciones estudiadas, y realizar la caracterización epidemiológica para determinar posibles vínculos entre las *Cp* halladas en palomas, humanos y otras especies de aves.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Determinar por métodos moleculares la presencia de clamidia en palomas de palomares de competición y de humanos que se encuentren en estrecho contacto con ellas.
- 2) Determinar por métodos moleculares la presencia de clamidia en palomas de vida libre de la región.
- 3) Aislar e identificar clamidias a partir de muestras provenientes de palomas de palomares de competición y de humanos que se encuentren en estrecho contacto con ellas.
- 4) Aislar e identificar clamidias a partir de muestras provenientes de palomas de vida libre de la región.
- 5) Determinar por métodos moleculares la presencia de clamidia en muestras provenientes de distintas especies de aves remitidas para diagnóstico al Ladeap.
- 6) Aislar e identificar clamidias a partir de muestras provenientes de distintas especies de aves remitidas para diagnóstico al Ladeap.
- 7) Estimar la prevalencia de *Cp* en palomas de vida libre y palomas de competición con un 95 % de confianza (métodos estadísticos) y un 10 % de error de acuerdo al número de muestras obtenidas.
- 8) Realizar la genotipificación de los aislamientos o materiales genéticos obtenidos.
- 9) Realizar la tipificación molecular de los aislamientos o materiales genéticos obtenidos.
- 10) Realizar la genotipificación y tipificación molecular de aislamientos o materiales genéticos obtenidos de casos de psitacosis humana.
- 11) Determinar la vinculación epidemiológica entre las cepas o materiales genómicos obtenidos de palomas con los encontrados en humanos y otras aves.

Descripción de actividades:
MÉTODOS PROPUESTOS.

Toma de muestras:

Se realizará el muestreo de animales cautivos en 35 palomares del partido de La Plata y partidos vecinos. Se tomarán muestras por duplicado de materia fecal, hisopados de conjuntiva y coanas de 10 ejemplares por palomar considerando las condiciones propias de cada establecimiento para obtener un total de 350 muestras (<http://epitools.ausvet.com.au/> fecha de acceso 3/11/14). Una parte de la muestra será destinada a su análisis por métodos moleculares, y la otra acondicionada y conservada para, posteriormente, destinarla al aislamiento.

Se realizará la captura de al menos 350 aves de la familia Columbidae (*Columba livia*, *Zenaida auriculata* y *Patagioenas picazuro*) de vida silvestre en distintos puntos del área de estudio para realizar la toma de muestra en forma similar a la descrita para las cautivas. Las capturas se llevarán a cabo con jaula trampa, siguiendo los lineamientos del CICUAL para garantizar el bienestar de las aves, las cuales una vez obtenida la muestra, serán liberadas.

Se realizarán los muestreos en dos épocas del año: otoño y primavera (pudiendo extenderse según la eficiencia de muestreo) con un número aproximado de 87 muestras de cada población (silvestres y cautivas) en cada periodo de muestreo. En el momento de la extracción se relevarán los datos de geoposicionamiento, rango etario (juvenil, adulto) y sexo de cada ejemplar.

En los palomares se muestreará a los propietarios y aquellas personas que se encuentren en estrecho contacto con las aves (empleados) a las que se les realizará hisopados de fauces y nariz.

Las muestras provenientes de otras especies de aves serán obtenidas de aquellas que son remitidas para diagnóstico al Ladeap, en el caso de tratarse de aves vivas la toma de muestras se realizará de la misma forma que en palomas, si el ave se encuentra muerta se realizará la necropsia y se tomarán muestras de diversos órganos (sacos aéreos, pulmón, hígado y bazo).

Las muestras para estudios moleculares se colectarán en contenedores adecuados en el caso de la materia fecal y órganos, las de conjuntiva ocular y coanas con hisopos de rayón o dacrón estériles. Las muestras destinadas a cultivo se conservarán en *buffer* SPG a -80°C hasta su utilización (28).

Biología molecular:

Las muestras obtenidas de palomas, humanos y otras especies de aves se procesarán para la extracción y purificación del ADN, mediante el uso de equipos comerciales (QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las muestras serán analizadas mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) para determinar la presencia de beta-actina como control de una adecuada extracción y purificación del ADN. Luego se realizará una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) específica para la identificación de familia Chlamydiaceae (blanco molecular: gen 23 s rARN). A las muestras que resultasen positivas para la qPCR de familia se les realizará una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) específica para *Cp* (blanco molecular: gen *ompA*). Se utilizarán diferentes reactivos comerciales y *primers* adecuados para cada qPCR

(9, 21).

La amplificación parcial de gen *ompA* y su posterior secuenciación se realizará de aquellas muestras positivas. Las secuencias obtenidas serán alineadas y comparadas con las preexistentes en la base de datos GenBank. Las muestras y aislamientos positivos a *Cp* serán analizadas mediante la técnica de MLST (*multi locus sequence typing*) basada en la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos variables de siete genes previamente seleccionados (*enoA*, *fumC*, *gatA*, *gidA*, *hemN*, *hlfX*, *oppA*), y la posterior alineación de los tipos de secuencias obtenidas con las ya existentes en una base de datos centralizada (<http://pubmlst.org/chlamydiales/>) para determinar clones o líneas clonales. (22)

Cultivo y asilamiento:

Las muestras conservadas en buffer SPG se procesarán para realizar el aislamiento del agente en un laboratorio de tipo P3. Para este fin se utilizarán huevos embrionados de entre 6 a 8 días de edad, los cuales se inocularán por yema, también se realizará el aislamiento en cultivos celulares (BGMK, Vero, HeLa, McCoy, LLCMK2, L929). Para confirmar la presencia del agente se utilizará la microinmunofluorescencia directa y técnicas de biología molecular.

Análisis estadístico:

Se realizará un análisis para datos categóricos por medio de regresión logística, considerando como variable de respuesta el resultado del diagnóstico de la prueba patrón seleccionada, respecto de posibles variables predictoras tales como época de muestreo, rango etario, sexo y localización.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1- Andersen, A.A., Grimes, J.E., Wyrick, P.B.. Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In B.W. Calnek, J.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif (Eds.), Diseases of Poultry, (10th edition), Ames, IA, Iowa State University Press, 1997, p. 333-349.
- 2- Andersen A. A., Franson J. C. . Avian Chlamydiosis. In: Nancy J. Thomas, D. Bruce Hunter, Carter T. Atkinson (Eds).. Infectious Diseases of Wild Birds. (1 edition), Iowa, Blackwell Publishing, 2007, p. 303-316.
- 3- Beeckman D. S. A., Vanrompay D. C. G.. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 11–17.
- 4- Cercenado E., Cantón R. (Ed.) 2012 Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. Seimc (Online) [http:// www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap44.pdf](http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap44.pdf) Accessed 5 June 2013.

- 5- Dickx V., Beeckman D. S. A., Dossche L., Tavernier P., Vanrompay D.. *Chlamydoiphila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. Journal of Medical Microbiology 2010; 59: 1348–1353.
- 6- Dickx V., Geens T., Deschuyffeleer T., Tyberghien L., Harkinezhad T., Beeckman D. S. A., Braeckman L., Vanrompay D. *Chlamydoiphila psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse. Journal of Clinical Microbiology, 2010; 48: 3244–3250
- 7- Dickx V., Vanrompay D. . Zoonotic transmission of *Chlamydia psittaci* in a chicken and turkey hatchery. Journal of Medical Microbiology, 2011; 60: 775–779.
- 8- Dovc A., Zorman-Rojs O., Vergles Rataj A., Bole-Hribovsek V., Krapez U., Dobeic M.. Health status of free-living pigeons (*Columba livia domestica*) in the city of Ljubljana. Acta Veterinaria Hungarica, 2004; 52: 219–226.
- 9- Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. . Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Molecular and Cellular Probes, 2006; 20:60–63.
- 10- Frutos MC., Monetti MS., Venezuela FR., Kiguen XA., Re VE., Cuffini CG.. Importancia de *Chlamydoiphila pneumoniae* en reptiles de la provincia de Córdoba, Argentina. Respuesta Inmunológica de sus cuidadores. VI Taller Internacional de infecciones por clamidias en humanos y animales. 2012, s/n, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- 11- Gaede W., Reckling K.-F., Dresenkamp B., Kenklies S., Schubert E., Noack U., Irmischer H.-M., Ludwig C., Hotzel H.and Sachse K.. *Chlamydoiphila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. Zoonoses Public Health. 2008; 55:184–188.
- 12- Harkinezhad T., Verminnen K, Van Droogenbroeck C., Vanrompay D. . *Chlamydoiphila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. Journal of Medical Microbiology, 2007; 56:1097–1100.
- 13- Harkinezhad T., Geens T., Vanrompay D.. *Chlamydoiphila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. Veterinary Microbiology, 2009; 135:68–77.
- 14- Harkinezhad T., Verminnen K., De Buyzere M., Rietzschel E., Bekaert S., Vanrompay D.. Prevalence of *Chlamydoiphila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. Journal of Medical Microbiology, 2009; 58: 1207–1212.
- 15- Horvatek D., Laroucau K., Prukner-Radovčić E.. Detection of *Chlamydia psittaci* genotypes in fecal samples of homing pigeons in Croatia. Veterinarski Arhiv, 2013; 83: 201-209,
- 16- Kaleta, E.F., Taday, E.M.. Avian host range of *Chlamydoiphila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. Avian Pathology, 2003; 32: 435–461.
- 17- Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R., Berndt A., Schubert E., Sachse K.. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. Infection, Genetics and Evolution, 2009; 9:1240–1247.
- 18- Laroucau K., de Barbeyrac B., Vorimore F., Clerc M., Bertin C., Harkinezhad T., Verminnen K., Obeniche F., Capek I., Bebear C., Durand B., Zanella G., Vanrompay D., Garin-Bastuji B., Sachse K.. Chlamydial

- infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Veterinary Microbiology*, 2009; 135: 82–89.
- 19- Magnino S., Haag-Wackernagel D., Geigenfeind I., Helmecke S., Dovc A., Prukner-Radovc'ic E., Residbegovic E., Ilieski V., Laroucau K., Donati M, Martinov S., Kaleta E.F.. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Veterinary Microbiology*, 2009; 135: 54–67.
- 20- Mitchell S.L., Wolff B.J., Thacker W.L., Ciembor P.G., Gregory C.R., Everett K.D., Ritchie B.W., Winchell J.M.. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009; 47: 175–181.
- 21- Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K.. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *The Veterinary Journal*, 2009; 181: 145–150
- 22- Pannekoek Y., Dickx V., Beeckman D., Jolley K., Keijzers W., Vretou E., Maiden M., Vanrompay D., van der Ende A.. Multi locus sequence typing of *Chlamydia* reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species. *PLoS One*, 2010; 5:e14179. doi:10.1371/journal.pone.0014179.
- 23- Pavlak M., Vlahović, K., Gregurić J., Županičić Ž., Jerčić J., Božikov J.. An epidemiologic study of *Chlamydia* sp. in feral pigeons (*Columba livia* vat. *domestica*). *Z. Jagdwiss.*, 2000; 46: 84-95.
- 24- Portu A. L., Gallo Vaulet M.L., Entrocassi A.C., Mestre M., Sachse K., Rodriguez Fermepin M.. Detección de *Chlamydia psittaci* y otras especies de la fam. Chlamydiaceae en materia fecal de palomas en la ciudad de Buenos Aires. VI Taller Internacional de infecciones por clamidias en humanos y animales. 2012, s/n, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- 25- Rodolakis A., Mohamad Khalil Y.. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology*, 2010; 140: 382–391.
- 26- Rodriguez Fermepin M., Entrocassi A.. Chlamydiales. Curso internacional teórico practico: Herramientas para la investigación y el diagnostico de las infecciones por clamidias en humanos y animales, 2011, s/n. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- 27- Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A., Longbottom D.. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, 2009; 135: 2–21.
- 28- Spencer, W., Johnson, F.. Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.* 1983; 113: 535–536.
- 29- Tanaka, C.; Miyazawa, T.; Watarai, M.; Ishiguro, N.. Bacteriological survey of feces from feral pigeon in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 2005; 67: 951-953.
- 30- Vázquez B., Esperón F., Neves E., López J., Ballesteros C., Muñoz M.. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2010; 52:45
- 31- Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*, 1995; 45: 93-119.

- 32- Vanrompay D., Harkinezhad T., van de Walle M., Beeckman D., van Droogenbroeck C., Verminnen K., Leten R., Martel A., Cauwerts K.. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. Emerging Infectious Diseases, 2007; 13: 1108-1110
- 33- Verminnen K., Duquenne B., De Keukeleire D., Duim B., Pannekoek Y., Braeckman L., Vanrompay D.. Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. Journal of Clinical Microbiology, 2008; 46: 281–285.
- 34- Zweifel D., Hoop R., Sachse K., Pospischil A., Borel N.. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in wild birds—potencial risk for domestic poultry, pet birds, and public health?. Eur J Wildl Res, 2009; 55:575–581.

Antecedentes del grupo de trabajo vinculados al trabajo de tesis:

1- Gornatti Churria, C; Uriarte, J; Origlia, J; Spinsanti, E; Unzaga, F; López, N; Cerdá, R; Marcantoni, H; Marino, F; Herrero Loyola; M; Píscopo, M y Petruccelli, M. Diagnóstico de *Chlamydophila psittaci* mediante la técnica de real-time PCR: estudios preliminares. Prerentado en el 2do. Congreso Argentino sobre Cría de Psitácidos. Fundación Temaiken, Escobar, Buenos Aires, Argentina. 7 y 8 de agosto de 2009.

2- Origlia J., Lopez N., Cadario M. E., Arias N., Netri C., Unzaga M. F., Herrero Loyola M., Piscopo M., Petruccelli M.. “Detección de *Chlamydia psittaci* en aves mascotas y de producción durante marzo de 2013 a marzo de 2014.” IIIº Congreso Panamericano de Zoonosis y VIIIº Congreso Argentino de Zoonosis. Facultad de Ciencias Medicas, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina. 4 al 6 de junio de 2014.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4
Revisión bibliográfica				
Realización de actividades de posgrado				
Toma de muestras				
Pruebas de PCR en tiempo real				
Cultivo y aislamiento				
Amplificación y secuenciación gen <i>ompA</i>				

MLST				
Estudios estadísticos				
Análisis y discusión de resultados				
Redacción del trabajo final				
Publicación de los resultados				
Defensa de la tesis doctoral				

MEDIOS DISPONIBLES PARA SU REALIZACIÓN:

El presente plan se desarrollará en la Cátedra de Patología de de Aves y Pilíferos, Ladeap (Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP) y en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas del ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

La Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos posee la infraestructura y equipamientos necesarios para la concreción de parte del presente plan de trabajo de tesis, en lo que respecta a la toma y acondicionamiento de muestras y la realización de las pruebas de biología molecular destacándose para ello la utilización de equipos e insumos necesarios:

- Bacteriología: cámara de seguridad biológica VECO Clean Plus, estufa de bacteriología StableTemp Cole Parmer, agitadores Orbital Shaker Cole Parmer y minishaker MS1 IKA, tanque de nitrógeno líquido, freezers y heladeras.
- Biología molecular: PCR en tiempo real IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System BIO-RAD Laboratories, cámaras PCR Chamber PLAS LABS y PCR Prep station MISONIX, espectrofotómetro Genova JENWAY, centrífuga HERMLE Z36HK, baño maría seco Block Heater SBH130D Stuart, heladeras y freezers.

En el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas del ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” se llevara a cabo el asilamiento del agente para lo cual dicho instituto cuenta con un laboratorio de seguridad biológica tipo III (UOCCB e INEI, Bacteriología Clínica).

La secuenciación se realizará en un laboratorio privado especializado.

Destino final del material

La biocustodia de los aislamientos se realizará en el INEI-ANLIS “Carlos Malbran”.
La biocustodia de los materiales genéticos se realizará en la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata y en el INEI-ANLIS “Carlos Malbran”.

Fuente de financiamiento:

Propia

Socios del proyecto (*Indicar las instituciones, organismos e investigadores participantes*):

Mg. Maria Estela Cadario

INEI-ANLIS “Carlos Malbran”

(Con la presente se debe adjuntar el proyecto de investigación específico impreso, donde conste: introducción con la justificación que defina el proyecto, objetivos, metodología, resultados esperados y bibliografía)

IF-2019-03569984-GDEBA-DGLYCNMAGP



GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES
2019 - Año del centenario del nacimiento de Eva María Duarte de Perón

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2019-03569984-GDEBA-DGLYCNMAGP

LA PLATA, BUENOS AIRES
Martes 12 de Febrero de 2019

Referencia: Recursos Geneticos ANEXO I

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 4 pagina/s.

Digitally signed by GDE BUENOS AIRES
DN: cn=GDE BUENOS AIRES, c=AR, o=MINISTERIO DE JEFATURA DE GABINETE DE MINISTROS BS AS,
ou=SUBSECRETARIA para la MODERNIZACION DEL ESTADO, serialNumber=CUIT 30715471511
Date: 2019.02.12 12:48:00 -03'00'

Cristian Gabriel Marioni
Director
Dirección de Gestión Legal y Coordinación Normativa
Ministerio de Agroindustria

Digitally signed by GDE BUENOS AIRES
DN: cn=GDE BUENOS AIRES, c=AR, o=MINISTERIO DE
JEFATURA DE GABINETE DE MINISTROS BS AS,
ou=SUBSECRETARIA para la MODERNIZACION DEL
ESTADO, serialNumber=CUIT 30715471511
Date: 2019.02.12 12:48:01 -03'00'



G O B I E R N O D E L A P R O V I N C I A D E B U E N O S A I R E S
2021 - Año de la Salud y del Personal Sanitario

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Anexo I, ORIGLIA Javier - EX-2021-27184746-GDEBA-DSTAMDAGP

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 13 pagina/s.