



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.

T E S I S

**CARACTERIZACIÓN DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN
LA QUERATOCONJUNTIVITIS CONTAGIOSA OVINA.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.**

P R E S E N T A :

M. EN CARN. GIOVANY ORTIZ ARANA

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 2023.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.**

T E S I S

**CARACTERIZACIÓN DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN
LA QUERATOCONJUNTIVITIS CONTAGIOSA OVINA.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.**

P R E S E N T A :

M. EN C. GIOVANY ORTIZ ARANA.

COMITÉ DE TUTORES

DIRECTOR DE TESIS.

DR. EN C. JORGE PABLO ACOSTA DIBARRAT

CO-DIRECTOR

DR. MARTÍN TALAVERA ROJAS

TUTOR ADJUNTO.

DRA. EN C. ERIKA GABRIELA PALOMARES RESENDIZ

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 2023

Resumen.

La Queratoconjuntivitis Infecciosa por sus siglas en inglés (IKC) y en español (QCO) es una enfermedad ocular que afecta a pequeños rumiantes y se asocia a múltiples microorganismos, esta patología puede ocasionar pérdida de la visión permanente en los animales afectados. En este estudio se realizó el análisis filogenético y la identificación de factores de virulencia asociados a patógenos involucrados en la Queratoconjuntivitis Infecciosa de casos clínicos en pequeños rumiantes en el Estado de México. Para la identificación de *Moraxella* spp., se realizó el aislamiento microbiano y la PCR del gen *16S rRNA*, para la detección de la familia *Chlamydiaceae* se realizó la PCR-tiempo real de la subunidad *23S rRNA* y para identificar la especie se utilizó el fragmento específico del gen *ompA* y finalmente para la detección de la especie de *Mycoplasma* se realizó el aislamiento y la PCR del gen *16S rRNA* y del gen *LppS*. Se utilizó la técnica de PCR para la detección de factores de virulencia asociados a *Chlamydia* spp (*incA* y *pmpH*), para *Mycoplasma* spp (*lppS*) para *Moraxella* spp (*mbxA*, *plb* y *fur*). Además, se realizó el análisis filogenético con base a la detección de los patógenos y sus factores de virulencia asociados a la IKC. En este estudio se identificó a 16.42% (46/280) de *Moraxella* (*Mor. ovis*) y 12.14% de (34/280) *Chlamydia* (*C. abortus* y *C. pecorum*) de las muestras de problemas oculares en este estudio no se logró detectar a *Mycoplasma* spp, además se logró identificar el factor de virulencia *incA* en cinco de las muestras positivas a *C. abortus*. El análisis de las secuencias y la construcción de árbol filogenético reveló que los aislamientos mexicanos de *Mor. ovis* y *C. abortus* tienen una alta similitud 97.96 % con aislamientos reportados de otros países. Este es el primer estudio donde se identifica la presencia *C. abortus* y *C. pecorum* en la IKC en el Estado de México, estos resultados ofrecen nuevo conocimiento en la epidemiología de la queratoconjuntivitis infecciosa, los agentes implicados y podría brindar herramientas para la prevención y control de la IKC y otras enfermedades asociadas a estos agentes, algunos de los cuales son zoonóticos.

Palabras clave: *Chlamydia* spp. factores de virulencia, filogenia, *Moraxella* spp., *Mycoplasma* spp., ovinos, queratoconjuntivitis infecciosa.

Summary.

Infectious keratoconjunctivitis by its acronym in English (IKC) and in Spanish (QCO) is a common contagious ocular disease among ruminants. In small domestic ruminants, IKC is usually bilateral and produces ocular discharge, epiphora, mild conjunctivitis and/or corneal opacity, causing transitory blindness in most of the cases. The objectives of this study are to investigate the ocular infection of pathogens involved in infectious keratoconjunctivitis of clinical cases in small ruminants in the State of Mexico. For the identification of *Moraxella* spp., microbial isolation and PCR of the *16S rRNA* gene were performed. The identification of the *Chlamydiaceae* family was achieved by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) using the 23S rRNA subunit. Subsequently, a species-specific PCR of *C. pecorum*, based on the *ompA* gene, was carried out as described by Pantchev et al, finally for the detection of *Mycoplasma* species, the isolation and PCR of the *16S rRNA* gene and the *LppS* gene were performed. The PCR technique was used to detect virulence factors associated with *Chlamydia* spp (*incA* and *pmpH*), for *Mycoplasma* spp (*lppS*) and for *Moraxella* spp (*mbxA*, *plb* and *fur*). In addition, the phylogenetic analysis was carried out based on the detection of pathogens and their virulence factors associated with IKC. In this study, 16.42% (46/280) *Moraxella* (*Mor. ovis*) and 12.14% of (34/280) *Chlamydia* (*C. abortus* and *C. pecorum*) of the samples of eye problems were identified in this study, it was not possible to detect to *Mycoplasma* spp, it was also possible to identify the virulence factor *incA* in five of the samples positive for *C. abortus*. The analysis of the sequences and the construction of the phylogenetic tree revealed that the Mexican isolates of *Mor. ovis* and *C. abortus* have a high similarity of 97.96 % with isolates reported from other countries. This is the first study where the presence of *C. abortus* and *C. pecorum* is identified in the IKC in the State of Mexico, these results offer new knowledge in the epidemiology of infectious keratoconjunctivitis, the agents involved and could provide tools for prevention and control. of IKC and other diseases associated with the agents, some of which are zoonotic.

Keywords *Chlamydia* spp. infectious keratoconjunctivitis, *Moraxella* spp., *Mycoplasma* spp. phylogeny, sheep, virulence, factors.

Agradecimientos.

El trabajo de tesis fue financiado por el proyecto “**Caracterización, fenotípica y genotípica y resistencia antimicrobiana de aislados de *Moraxella* spp obtenidos de casos clínicos de queratoconjuntivitis ovina**” con clave de registro 4629/2019 SF. UAEM”.

Y del proyecto “**Caracterización genotípica de *Mycoplasmas* spp., *Chlamydia* spp., y *Moraxella* spp. Presentes de casos clínicos de Queratoconjuntivitis Ovina y su relación con el cuadro clínico de la enfermedad**” con clave de registro 6177/2020CIB

Se agradece el apoyo brindado al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias CENID-Salud Animal e Inocuidad por permitir la estancia de investigación dentro de las instalaciones en el laboratorio de Enfermedades de los pequeños rumiantes.

Además, se agradece la beca de manutención otorgada por parte de **CONAHCYT 2019-000037-02NACF-09642**

INDICE.

I.- REVISIÓN DE LITERATURA.	12
1.1.- Agentes patógenos implicados en la Queratoconjuntivitis.	13
1.1.1.- <i>Mycoplasmas</i> spp.....	13
1.1.2.- <i>Chlamydia</i> spp.....	14
1.1.3.- <i>Moraxella</i> spp.	16
1.2.- Agentes virales.	17
2.- Diagnóstico.	18
2.1.- Identificación de <i>Chlamydia</i> spp.	18
2.2.- Identificación de <i>Mycoplasmas</i> spp.	18
2.3.- Identificación de <i>Moraxella</i> spp.	19
3.- Patogénesis y factores de virulencia de los agentes implicados IKC.	20
3.1.- Biofilms.	20
3.2.- Adhesinas.	21
3.3.- Producción de hemolisinas	22
3.4.- Invasión y sobrevivencia bacteriana.	24
3.5.-Sistema de adquisición de hierro.	26
3.6.- Evasión de la respuesta Inmune y variación antigénica	26
4.-Análisis filogenético de patógenos.	27
5.- Respuesta inmune del ojo.	27
II- JUSTIFICACIÓN.	29
III.- HIPOTESIS.	30
IV.- OBJETIVOS.	31
4.1.- Objetivo General.....	31
4.2.- Objetivo Específicos.....	31
V.- MATERIAL Y METODOS.	32
5.1.- Recolección de las muestras.	32
5.2.- Aislamiento e identificación.	32
5.3.- Extracción de ADN	33
5.4.- Identificación molecular	33
5.5.- Análisis estadístico.	36
5.6.- Factores de virulencia.....	36

5.7.- Análisis Filogenético de los patógenos y factores de virulencia	38
VI.- RESULTADOS.....	40
VII.- DISCUSION	56
VIII.- CONCLUSION GENERAL	61
IX. SUGERENCIAS.	62
X.-REFERENCIAS.....	63
XI.-ANEXOS	91

Índice de figuras

Figura 1. Crecimiento de <i>Moraxella</i> spp., en placa agar sangre.....	42
Figura 2. Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> , identificación molecular de <i>Moraxella ovis</i> ...	43
Figura 3. PCR del gen <i>incA</i> en muestras positivas a <i>Chlamydia</i>	46
Figura 4. Alineamiento de secuencias del gen <i>16S rRNA</i> obtenidas de aislamientos de <i>Moraxella</i> analizado por el método de Maximum Likelihood	49
Figura 5. Árbol filogenético de <i>Moraxella</i> spp basado en la secuencia gen <i>16S rRNA</i> analizado por el método de Maximum Likelihood	50
Figura 6. Distanciamiento genómico entre aislamientos mexicanos de <i>Moraxella ovis</i>	52
Figura 7. Distanciamiento genómico entre aislamientos mexicanos y entre cepas de otros orígenes geográficos de <i>Moraxella ovis</i>	53
Figura 8. Alineamiento de secuencias del gen <i>incA</i> obtenidas de muestras positivas a partir de aislamiento de <i>Chlamydia</i>	54
Figura 9. Árbol filogenético de <i>Chlamydia</i> spp. basado en la secuencia gen <i>incA</i>	55

Índice de tablas.

Tabla 1. Iniciadores y técnicas utilizadas para la identificación de <i>Chlamydia</i> spp., <i>Moraxella</i> spp. y <i>Mycoplasma conjunctivae</i>	35
Tabla 2. Iniciadores y factores de virulencia asociados a patógenos IKC.....	38
Tabla 3. Muestreo en pequeños rumiantes con queratoconjuntivitis infecciosa en ocho municipios del Estado de México.....	40
Tabla 4. Escala de grado de lesión del globo ocular en pequeños rumiantes con QCO.....	41
Tabla 5. Resultados de pruebas bacteriológicas de los aislados de <i>Moraxella</i> spp.....	42.
Tabla 6. Aislamientos de <i>Moraxella</i> y factores de virulencia detectados de casos clínicos de IKC en el Estado de México.....	44
Tabla 7. Aislamientos de <i>Chlamydia</i> y factor de virulencia detectados de casos clínicos de IKC en el Estado de México.....	47
Tabla 8. Interacciones entre patógenos asociados IKC en pequeños rumiantes.....	48

ANEXOS

Productos de investigación.....	91
Protocolo de Extracción de ADN.....	100
Protocolo de Purificación de ADN.....	102

I.- REVISIÓN DE LITERATURA.

La principal patología ocular en los pequeños rumiantes es la Queratoconjuntivitis Contagiosa o Infecciosa por sus siglas en inglés (IKC) (Angelos, 2010; Giacometti *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2014), esta enfermedad se caracteriza por la presencia de secreciones oculares (hialinas hasta mucopurulenta), fotofobia, epífora, blefaroespasmos, hipervascularización, conjuntivitis y opacidad corneal lo cual genera una ceguera transitoria en la mayoría de los casos, sin embargo, en casos severos se pueden presentar úlceras corneales de forma unilateral o bilateral ocasionando una ceguera permanente (Hosie, 2000).

La Queratoconjuntivitis tiene un origen multifactorial debido a las interacciones entre factores ambientales (la exposición de la luz solar, polvo y la presencia de moscas), factores del hospedero (como la edad, raza, respuesta inmune y pigmentación ocular) y factores de los patógenos implicados (expresión de factores de virulencia). La tasa de morbilidad de esta enfermedad puede alcanzar de un 30 hasta a un 80% (Radostits *et al.*, 2007), aunque generalmente la mortalidad es baja, se reconoce que, de no tomar las medidas de prevención y control adecuadas, esta enfermedad puede propagarse en el o los rebaño(s) (Smith y Sherman, 2011). A las de las pérdidas por ocasionadas por los animales afectados en las unidades de producción, se deben sumar las pérdidas económicas derivadas del costo de los medicamentos y de los servicios médicos veterinarios (O'Connor *et al.*, 2012).

Esta patología se distribuye a nivel mundial reportándose en diferentes países como Noruega (Akerstedt & Hofshagen, 2004), India (Karthik *et al.*, 2017), Australia (Jelocnik *et al.*, 2019), Alaska (Evans *et al.*, 2008), Pakistán (Shahzad *et al.*, 2013), Brasil (Farias *et al.*, 2015), Irán (Sağlam *et al.*, 2018), Suecia (Janovsky *et al.*, 2001), Sudáfrica (van Halderen *et al.*, 1994) y España (Fernández-Aguilar *et al.*, 2013) han reportado la presencia de IKC en los pequeños rumiantes encontrando diversos microorganismos implicados con mayor frecuencia se ha identificado a *Moraxella* spp., *Mycoplasmas* spp. y *Chlamydia* spp (Akerstedt & Hofshagen, 2004; Gupta *et al.*, 2014; Jelocnik *et al.*, 2019) aunque con menor frecuencia se ha identificado a *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Coxiella* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp. sin embargo, su papel en

la patogenia de la IKC es menos claro (Akerstedt & Hofshagen, 2004; Belloy *et al.*, 2003a; Gupta *et al.*, 2014; Jelocnik *et al.*, 2019; Sánchez-Romano *et al.*, 2018).; Williams *et al.*, 2019).

1.1.- Agentes patógenos implicados en la Queratoconjuntivitis.

1.1.1.- *Mycoplasmas* spp.

En la actualidad se han reconocido alrededor de 200 especies de *Mycoplasmas* que son responsables de ocasionar diversas patologías como neumonías, mastitis, conjuntivitis y artritis en diversos animales, esto se debe al tropismo tisular que tienen los *Mycoplasmas* spp. hacia epitelios de las mucosas (Gomez-Martin *et al.*, 2012).

Las *Mycoplasmas* spp. se caracterizan por tener un genoma pequeño entre 580 a 1380 kpb con dimensiones que oscilan entre 0.2 a 0.8 μm y están limitadas por una membrana citoplasmática trilaminar rica en esteroides y carente de una pared celular, con apariencia de las colonias en forma de huevo frito en el medio de crecimiento. Estos microorganismos poseen escasos genes vinculados a la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y lípidos lo que los obliga a tener una relación de comensalismo con el hospedero.

En los pequeños rumiantes se ha identificado a diferentes especies de *Mycoplasmas* como; *M. adleri*, *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. conjunctivae*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* y subsp. *capricolum*, *M. hyornis*, *M. mycoides* subsp. *capri* y subsp. *mycoides* LC, *M. ovipneumoniae*, *M. ovis* y *M. putrefaciens* (Akwuobu *et al.*, 2016; Awan *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2014; Nicholas *et al.*, 2008).

Algunas de estas especies se han asociado a las principales patologías en ovinos y caprinos como; agalactia contagiosa (CA), causada exclusivamente por *Mycoplasma agalactiae*, neumonía atípica causada por *M. ovipneumoniae* y Queratoconjuntivitis Infecciosa causada por *M. conjunctivae* (Bergonier *et al.*, 1997; Corrales *et al.*, 2007; Dagnall, 1994b).

M. conjunctivae fue aislado por primera vez de un ovino en Australia por Surman (1968) y no fue hasta la década de los setenta del siglo pasado que fue nombrado y caracterizado correctamente (Barile, 1972). *M. conjunctivae* se ha asociado como el principal agente de la

Queratoconjuntivitis Contagiosa en pequeños rumiantes salvajes y domésticos (Fernández-Aguilar *et al.*, 2017; Giacometti *et al.*, 2002, 1999) ya que sea observado que puede transmitirse por contacto directo con animales infectados por medio de vectores como las moscas (Fernández-Aguilar *et al.*, 2019).

Una vez que *M. conjunctivae* invade la estructura del ojo, esta bacteria ocasiona daño en los tejidos circundantes ocasionando una disminución en el rendimiento visual y conduciendo a la perforación de la córnea (Mayer *et al.*, 1997). *M. conjunctivae* se ha aislado exclusivamente en el tejido ocular (Amores *et al.*, 2010; Vilei *et al.*, 2007).

En estudios recientes se han identificado a *M. arginini*, *M. mycoides*, *M. agalactiae*, *M. hyornis* a partir de hisopados conjuntivales en los pequeños rumiantes, sin embargo, se desconoce el rol de estos microorganismos en la patogenia de la Queratoconjuntivitis. (Baker *et al.*, 2001; González-Candela *et al.*, 2007; Verbisck-Bucker *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2014; Olaogun *et al.*, 2015;).

Estas especies de *Mycoplasmas* se pueden aislar a partir de secreciones oculares y nasales en ovinos, sin embargo, se ha encontrado en mayor porcentaje en caprinos (Ammar *et al.*, 2008) y con frecuencia en animales jóvenes (Elshafay *et al.*, 2016). *M. conjunctivae* y *M. agalactiae* pueden detectarse en cualquier fase del desarrollo de la enfermedad (Santos *et al.*, 2022). Actualmente se reconoce que algunas especies de *Mycoplasmas* tienen un potencial zoonótico importante como es el caso de *M. arginini* (Silló *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2012).

1.1.2.- *Chlamydia* spp.

Las *Chlamydias* spp. son un grupo de bacterias intracelulares obligadas, con un tropismo tisular hacia las mucosas lo que ocasiona una diversidad de patologías en los animales y en el humano (Hogan *et al.*, 2004). Actualmente se han identificado 13 especies que pertenecen a este género; *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. poikilothermis*, *C. psittaci*, *C. suis*, *C. trachomatis* y *C. serpentis* (Bommana & Polkinghorne, 2019; Sachse *et al.*, 2014), aunque, taxonómicamente en esta familia incluyen a los miembros del taxón *Candidatus* como, *Ca. C. corallus* y *Ca. C.*

sanzinia (Staub *et al.*, 2018; Taylor-Brown *et al.*, 2015; Vorimore *et al.*, 2013). Sin embargo, en años recientes Laroucau *et al.*, (2019) proponen a *Chlamydia buteonis* como una nueva especie.

C. abortus, *C. pecorum*, *C. psittaci* y *C. suis* se han identificado de diversas patologías en los rumiantes domésticos y silvestres (Borel *et al.*, 2018; Burnard & Polkinghorne, 2016; Di Francesco *et al.*, 2013; Jelocnik *et al.*, 2019; Schautteet & Vanrompay, 2011; Rodolakis & Laroucau, 2015).

C. psittaci se ha identificado en la IKC, ocasionando brotes de queratoconjuntivitis folicular (Cooper, 1974; Polkinghorne *et al.*, 2009), este patógeno también se ha relacionado en casos de poliartritis en corderos y se reconoce su potencial zoonótico ocasionando infecciones genitourinarias en mujeres (Osman *et al.*, 2012). *Chlamydia psittaci* ocasiona la psitacosis es una zoonosis de reporte obligatorio ocasiona en los seres humanos cuadros neumónicos y cardiacos, esta enfermedad deriva su nombre a los psitácidos que son aves de la familia Psittacidae (loros, pericos, guacamayas y aves afines) y están presentes en diversos países en el continente americano distribuido a nivel mundial (Herrera *et al.*, 2015)

Por otro lado *C. pecorum* en los rumiantes ocasiona múltiples manifestaciones clínicas desde queratoconjuntivitis, encefalomiелitis, problemas reproductivos, enteritis, mastitis y artritis (Walker *et al.*, 2015). Se reconoce que *C. pecorum* tiene la capacidad de producir foliculitis conjuntival y neovascularización corneal en corderos y terneros jóvenes (Walker *et al.*, 2015, 2016), siendo considerado por Hossie, (2004) como uno de responsables de causar Queratoconjuntivitis en los pequeños rumiantes. *C. pecorum* tiene la capacidad de infectar a otros hospederos en gran medida a animales de producción tales como: porcinos, equinos, bovino e incluyendo al ser humano alojándose de manera natural en el tracto digestivo de los animales (Li *et al.*, 2016; Sachse *et al.*, 2009), hasta la fecha aún no se reconoce el potencial zoonótico (Rodolakis & Mohamad, 2010).

C. abortus es considerado a nivel mundial como el agente causal del aborto enzoótico ovino ocasionando grandes pérdidas económicas en las unidades de producción (Li *et al.*, 2015; Longbottom & Coulter, 2003; McCauley, 2010; Rodolakis & Laroucau, 2015), este microorganismo es reconocido por su alto potencial zoonótico al producir problemas

reproductivos (Meijer *et al.*, 2004; Rodolakis & Mohamad, 2010) y problemas respiratorios en el ser humano (Ortega *et al.*, 2016).

Se ha observado que *C. abortus* puede generar conjuntivitis, epididimitis, neumonía y artritis en los pequeños rumiantes y puede ser encontrado partir de muestras de heces fecales (Rodolakis & Laroucau, 2015), secreciones vaginales (Mora-Diaz *et al.*, 2015) y de hisopados oculares (Gerber *et al.*, 2007), esta bacteria puede estar acompañada con otras *Chlamydias* como *C. pecorum* (Holzwarth *et al.*, 2011) y con *C. psittaci* (Jelocnik *et al.*, 2019), *C. suis* (Polkinghorne *et al.*, 2009) y por otros patógenos como *Mycoplasmas* spp. (Gupta *et al.*, 2014).

La mayoría de las especies de *Chlamydia* se transmiten por la vía oronasal mediante aerosoles y alimentos contaminados, también se ha reportado que se puede transmitir de forma vertical mediante infecciones de la placenta al feto (Longbottom & Coulter, 2003; Rodolakis & Laroucau, 2015; Rodolakis & Mohamad, 2010). Las infecciones ocasionadas por *Chlamydia* generan grandes pérdidas económicas en todo el mundo (Anzalone, 2020; Cochrane *et al.*, 2005; De Puyseleir *et al.*, 2014; Essig & Longbottom, 2015; Lutz-Wohlgroth *et al.*, 2006; Ramakers *et al.*, 2017; Van Grootveld *et al.*, 2018)

1.1.3.- *Moraxella* spp.

Hasta este momento se han identificado y agrupado 19 especies del género *Moraxella*; *Mor. atlantae*, *Mor. boevrei*, *Mor. bovis*, *Mor. bovoculi*, *Mor. canis*, *Mor. caprae*, *Mor. catarrhalis*, *Mor. caviae*, *Mor. cuniculi*, *Mor. equi*, *Mor. lacunata*, *Mor. lincolni*, *Mor. nonliquefaciens*, *Mor. oblonga*, *Mor. osloensis*, *Mor. ovis*, *Mor. pluranimalium*, *Mor. porci* y *Mor. saccharolytica*., todas estas especies son de importancia en la salud humana y veterinaria (Teixera and Merquior, 2014).

Los mayoría de las especies de *Moraxella* se han identificado en las membranas de las mucosas del tracto respiratorio, genitourinario y de la conjuntiva en los seres humanos y animales (Teixera y Merquior, 2014), como es el caso de *Mor. ovis*, *Mor. bovis* y *Mor. bovoculi* que se encuentran en el tejido ocular en los rumiantes (Akerstedt & Hofshagen, 2004; Farias *et al.*, 2015; Karthik *et al.*, 2017).

Los únicos sitios en los que se ha aislado *Mor. ovis* en los pequeños rumiantes son del saco conjuntival (Lindqvist, 1960; Spradbrow, 1968) y de secreciones nasales (Dagnall, inédito), mientras que en el ganado bovino solo se aisló del saco conjuntival (Elad *et al.*, 1988). Aunque se desconoce el papel preciso de *Mor. ovis* en la patogénesis de la QCO, bajo ciertas circunstancias, este puede contribuir a agravar los signos clínicos en ovejas (Lindqvist, 1960).

En cambio *Mor. bovis* se considera como el principal agente etiológico de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB), sin embargo, en estudios recientemente por Karthik *et al.*, (2017) encontraron a esta bacteria en un ovino, estos datos sugieren que *Mor. bovis* podría extenderse entre ovinos y bovinos y en otras especies animales (Menoueri *et al.*, 1988; Richard *et al.*, 1989; Sosa Zunino, 2013). *Mor. bovis* se ha aislado tanto de animales sanos como enfermos, lo que indica que algunos animales podrían actuar como reservorios de la enfermedad (Pugh & McDonald, 1986).

En casos de queratoconjuntivitis en rumiantes *Mor. bovoculi* ha sido aislado en diversos países como Estados Unidos, Brasil y Uruguay (Angelos *et al.*, 2007b; Libardoni *et al.*, 2012; Loy & Brodersen, 2014; Shen *et al.*, 2011; Sosa & Zunino, 2013). El primer aislamiento reportado de *Mor. bovoculi* lo realizó Angelos *et al.* en el 2007 en los Estados Unidos, describiéndola como un coco Gram negativo obtenida a partir de una úlcera corneal de un bovino posteriormente se idéntico en renos (Sánchez Romano *et al.*, 2019; Tryland *et al.*, 2009) y en un equino (Liu *et al.*, 2014).

1.2.- Agentes virales.

Uno de los agentes virales que se han aislado de casos clínicos de la Queratoconjuntivitis es el Cervidherpevirus tipo CvHV2 que ha sido propuesto como posible agente primario (Sánchez Romano *et al.*, 2018), no obstante también se ha identificado al Alfaherpesvirus durante las primeras etapas de la enfermedad de muestras provenientes de renos en Noruega (Tryland *et al.*, 2009). En Reino Unido se identificó al virus de Cervidherpevirus tipo 1 (CvHV1) en hisopados oculares en ciervos rojos (Inglis *et al.*, 1983). Aunque aún no se comprende el rol de los Cervidherpevirus en la patogenia de la queratoconjuntivitis, se reconoce que durante los procesos infecciosos que utilizan a los corticoides como parte del tratamiento estos virus pueden reactivarse ocasionando conjuntivitis

2.- Diagnóstico.

El diagnóstico clínico de la Queratoconjuntivitis Infecciosa se basa en la realización de un examen físico y el reconocimiento de los signos clínicos (Montserrat *et al.*, 2006), aunque para llegar al diagnóstico definitivo se necesita identificar a los microorganismos implicados mediante una adecuada recolección de muestras mediante hisopados conjuntivales y nasales (Akerstedt & Hofshagen, 2004; Gupta *et al.*, 2014; Tryland *et al.*, 2017) .

2.1.- Identificación de *Chlamydia* spp.

Para el aislamiento de *Chlamydia* spp., es necesario el cultivo celular o desarrollo en embrión de pollo (Longbottom & Coulter, 2003; Philips & Clarkson, 1992) , posteriormente al cultivo se hace el uso de inmunofluorescencia para evidenciar los cuerpos elementales de *Chlamydia* se emplean de tinciones especiales como Giménez, Giemsa, Ziehl-Neelsen modificado o Machiavello (Aiken, 2000; Mora-Diaz *et al.*, 2015; Rodolakis & Souriau, 1980, Storz, 1990).

Actualmente el diagnóstico de *Chlamydia* se está realizando la reacción de la cadena de polimerasa en tiempo real (PCRrt), primero para la identificación de familia y posteriormente para la determinación de las especies, utilizando los genes conservados 16-23S *rRNA* (Ehricht *et al.*, 2006; Sánchez Romano *et al.*, 2019), *ompA* (Jelocnik *et al.*, 2019), *omp2* (Hartley *et al.*, 2001) y *pmp* (Laroucau *et al.*, 2007).

2.2.- Identificación de *Mycoplasmas* spp.

Para la identificación de *Mycoplasmas* se utilizan métodos directos e indirectos. Entre los métodos directos se encuentran el aislamiento en un medio sólido y/o líquido y la inmunofluorescencia, sin embargo, ambos métodos son lentos y con baja sensibilidad (Meseguer-Peinado *et al.*, 2012). Debido a la dificultad de crecimiento de *Mycoplasma* (Awan *et al.*, 2012) los métodos más rápidos y valiosos son las pruebas de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel gradiente desnaturizante (DGGE)

(Baker *et al.*, 2001; Mcauliffe *et al.*, 2005), en el cual emplean los genes conservados *16S rRNA* y *LppS* para la identificación de familias y especies (Gupta *et al.*, 2014).

Entre los métodos más utilizados para la tipificación de las especies de *Mycoplasmas* se basan en la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (De la Fe *et al.*, 2012), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado AFLP (Kokotovic *et al.*, 1999) y la tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Mcauliffe *et al.*, 2011).

Los métodos indirectos más empleados para la identificación de las *Mycoplasmas* se basan en pruebas serológicas utilizando ensayos de inmunoadsorción ligando a enzimas (ELISA), aunque pueden llegar tener baja sensibilidad y especificidad y algunas ELISAS aún no están disponibles en diferentes países (Belloy *et al.*, 2001). La técnica de fijación de complemento que detecta tanto IgG como IgM con una sensibilidad del 85%, y aglutinación de partículas siendo la técnica más utilizada (Belloy *et al.*, 2001; Degiorgis *et al.*, 2000).

2.3.- Identificación de *Moraxella* spp.

La identificación de las especies de *Moraxella* se basa en técnicas bacteriológicas, moleculares y de secuenciación. Para determinar la especie de los aislamientos de *Moraxella* (*bovis*, *ovis* y *bovoculi*) mediante técnicas bacteriológicas clásicas se utilizan las pruebas de fenilalaninadesaminasa, gelatinasa, DNAsa y Tween 80 (Angelos & Ball, 2007; Angelos, *et al.*, 2007; Sosa & Zunino, 2013) aunque pueden llegar a ser inconsistentes.

Para la identificación correcta de *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis* se pueden utilizar pruebas de PCR mediante la amplificación del gen *16-23S rRNA* (Shen *et al.*, 2011; Sosa & Zunino, 2013) y de la amplificación de la región conservada de la citotoxina A del gen *rtxA* demostrando una alta diferenciación entre las tres especies de *Moraxella*. (Farias *et al.*, 2015).

Para determinar los perfiles de clonalidad y la variabilidad génica de los aislamientos de *Moraxella* se utilizan pruebas de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), conceso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) y BOX-PCR para establecer si hay una relación entre los diferentes aislamientos obtenidos de *Moraxella* spp. de ovinos y bovinos en los diferentes tiempos y situaciones geográficas (Conceição *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 1999; Sosa & Zunino, 2013).

3.- Patogénesis y factores de virulencia de los agentes implicados IKC.

Para comprender la patogenia de la queratoconjuntivitis infecciosa como una enfermedad propia en los rumiantes es importante comprender los diferentes mecanismos y factores de virulencia usados por cada uno de los microorganismos implicados para lograr comprender como es que se adhieren, invaden, colonizan y evitan la respuesta inmune para lograr la infección en el tejido ocular (O'Brien & Hazlett. 1995).

3.1.- Biofilms.

Se conoce que algunos patógenos pueden sobrevivir en el medio ambiente, debido a la capacidad de agruparse y formar comunidades constituidas por masas de microorganismos y de productos extracelulares denominados biofilms y/o biopelículas (Costerton *et al.*, 1999; Høiby *et al.*, 2010). Esta capacidad les permiten adherirse a diversas superficies abióticas y bióticas para obtener diversos nutrientes del medioambiente y obtener resistencia a diversos desinfectantes y antimicrobianos (Klausen *et al.*, 2003, Murray *et al.*, 2009) con la finalidad de lograr infecciones crónicas en el hospedero (Gressler *et al.*, 2015; Tiba *et al.*, 2009).

Una de las problemáticas actuales para erradicar la queratoconjuntivitis infecciosa está relacionada a la formación de biopelículas por los microorganismos implicados (Prieto *et al.*, 2013). Se han reportado que bacterias del género *Moraxella* son capaces de formar biofilms como *M. bovis*, *M. ovis* y *M. bovoculi* esto le permite colonizar cavidades nasales y oculares (Ely *et al.*, 2019; C. Prieto *et al.*, 2013).

Por otra parte se ha reportado que microorganismos sin pared celular como son las *Mycoplasmas* pueden formar biofilms, lo que les permiten incrementar su resistencia a la desecación (McAuliffe *et al.*, 2006) y sobrevivir en el saco conjuntival y orificios nasales durante varios meses proporcionándoles una oportunidad para nuevas reinfecciones dentro de los rebaños (Baker *et al.*, 2001).

3.2.- Adhesinas.

Una vez que el patógeno ingresan en el hospedero a través de una vía de entrada (Meylan *et al.*, 2006, Murray *et al.*, 2009), estos deben adherirse y fijarse mediante moléculas específicas a las células del hospedero cercano a la puerta de entrada, ya que si no se adhieren, estos suelen ser eliminadas por las barreras físicas y químicas del hospedero (Meylan *et al.*, 2006). Se ha observado que algunos patógenos en la superficie de su membrana citoplasmática poseen estructuras fimbriales (como son los pili, fimbrias o flagelos), como no fimbriales (como son lectinas, ácidos lipídicos, proteínas de membrana externa) lo que les permite la adherencia en la superficie de las células diana (Klausen *et al.*, 2003, Murray *et al.*, 2009).

3.2.1.- Estructuras Fimbriales.

Diversos estudios han identificado en cepas de *Moraxella* la capacidad de expresar fimbrias de tipo IV (Lepper & Power, 1988; Jayappa & Lehr, 1986, Pedersen, 1972). Estas fimbrias pueden estar distribuidas alrededor de la membrana citoplasmática de la bacteria teniendo una longitud entre 1 a 4 μm de largo y 6 nm de diámetro (Keizer *et al.*, 2001).

La fimbria tipo Q permite que *Moraxella* pueda adherirse a la superficie de la córnea mientras que la fimbria tipo I solo contribuye a la bacteria a la persistencia local y el mantenimiento de la infección (Ruehl *et al.*, 1993). En las cepas de *Moraxella* se ha observado que cuando expresan el pili Q son más patógenas logrando establecer adherencia más eficiente a comparación de las cepas que solo expresan el pili I (Ruehl *et al.*, 1993, 1988), aunque también se reconoce que algunas cepas pueden expresar ambas fimbrias (Marrs *et al.*, 1985) y las fimbrias pueden perderse después de varios pases en un medio cultivo (Annular & Wilcox, 1985).

3.2.2.- Estructuras no fimbriales.

En la superficie de la membrana de las *Mycoplasmas* spp. se encuentran proteínas modificadas covalentemente con lípidos denominadas adhesinas (Jan *et al.*, 1996) siendo utilizados como un factor de virulencia para estos microorganismos (Boguslavsky *et al.*, 2000;

Hu *et al.*, 1982; Krause, 1998; Seto *et al.*, 2001). Se ha identificado que el gen *lppS* de *M. conjunctivae* codifica a una proteína de 150 kDa denominada LppS, esta proteína le permite a la bacteria adherirse a las células de los epitelios del hospedador siendo considerada como el principal factor de virulencia (Belloy, *et al.*, 2003b).

Por otro lado las *Moraxella* tiene la capacidad de expresar hemaglutininas, este tipo de proteínas tienen un papel importante en la adhesión de la bacteria ya que les permite a las cepas no fimbriadas adherirse a varios tipos de células a pesar de ser menos eficientes en comparación de las cepas que poseen fimbrias (Annuar & Wilcox, 1985). Se ha logrado identificar varios ORFs que codifican para una proteína flpA y flpB homologa a la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis*, otros ORFs que codifican para una proteína de secreción de la hemaglutinina y para una proteína accesoria Flp (Fap), lo cual le permitiría a *Moraxella* adherirse a las superficies mucosas y atravesar el espacio periplásmico de la superficie celular (Kakuda *et al.*, 2006).

Mientras tanto en algunas especies de *Chlamydia* se ha observado que tienen la capacidad de expresar ciertas proteínas de membrana polimórficas (Henderson & Lam, 2001) como son las Pmp6, Pmp20 y Pmp21 y sus homologas las PmpG, PmpB y PmpD lo que les permite adherirse a las membranas de los epitelios de las células hospedadoras (Becker & Hegemann, 2014; Crane *et al.*, 2006; Lent *et al.*, 2016a; Mölleken *et al.*, 2010) aunque también se ha reconocido que las proteínas chaperonas las Hsp70 conocidas “Dnak-like” localizadas en la membrana externa y en el citoplasma realizan la misma función como se ha observado en cepas de *C. trachomatis* (Schmiela & Wyrick, 1994).

3.3.- Producción de hemolisinas

Una vez que una bacteria se adhiere a las células del hospedero, puede causar daño directo al competir por los nutrientes y generando enzimas extracelulares o sustancias relacionadas que degradan el material de la célula permitiendo a la bacteria dispersarse a otras células o tejidos (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Se ha reportado que *Mor. ovis*, *Mor. bovis* y *Mor. bovoculi* tienen la capacidad de producir β -hemolisinas, este tipo de proteínas tienen propiedades hemolíticas, corneotóxicas y

leucotóxicas que son importantes para ocasionar daño en la córnea (Billson *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 1995). Las β -hemolisinas pertenecen a la familia RTX de las exoproteínas bacterianas cuya función principal es la producción de poros en la membrana citoplasmática de diversas células provocando un desequilibrio osmótico por el eflujo de potasio y finalmente la lisis celular (Angelos, *et al.*, 2007b; Angelos *et al.*, 2001; Billson *et al.*, 2000).

Las β -hemolisinas son codificadas a partir de un operón compuesto por 5 genes denominados 5'-*mbxCABDtolC-3'* para *Mor. bovis* (Angelos *et al.*, 2001), 5'-*mbvCABDtolC-3'* para *M. bovoculi* y 5'-*movCABDtolC-3'* para *Mor. ovis* (Angelos, *et al.*, 2007b).

Los genes *mbxA*, *mbvA* y *movA* codifican para la formación de la estructura de la citotoxina A para las tres especies de *Moraxella* (Angelos *et al.*, 2001), estas citotoxinas son activadas por los productos de los genes *mbxC*, *mbvC* y *movC* y transportadas por las proteínas de membrana codificadas por los genes *mbxB*, *mbvB*, *movB*, y *mbxD*, *mbvD*, *movD* (Angelos, *et al.*, 2007b; Angelos *et al.*, 2001) y finalmente el gen *tolC* codifica una proteína de la membrana externa OMP que permite el movimiento de la citotoxina a través de las membranas y el periplasma de las bacterias hacia el medio extracelular (Sosa *et al.*, 2015).

Aunque se ha podido identificar cepas de *Mor. bovis* y *Mor. ovis* no hemolíticas, estas bacterias no están asociadas a la queratoconjuntivitis en ovinos y bovinos (Brown *et al.*, 1998; Dagnall, 1994a, 1994b), sin embargo, los datos sugieren que las cepas *Moraxella* no hemolíticas pueden convertirse en hemolíticas y potencialmente patógenas por la adquisición del operón RTX que está localizada específicamente en una isla de patogenicidad (PAIs) (Hess & Angelos, 2006).

En *M. bovis* se logró identificar el gen *plb* que codifica para la proteína de la fosfolipasa B conocida (Plb), esta proteína es una lipasa-serina triacilglicerol de 66 kDa que tiene una acción enzimática sobre los fosfolípidos de la membrana de la célula ocasionando lisis celular (Farn *et al.*, 2001).

Por otra parte, en *M. bovoculi* y *M. bovis* se logró identificar la presencia de enzimas hidrolíticas (esterasa C4, esterasa-lipasa C8, lipasa C14, fosfoamidasa, hialuronidasa y fosfatasa) y de enzimas proteolíticas (aminopeptidasas y gelatinasa) que participan en la

producción de úlceras corneales junto a fibrinolisin y las β -hemolisinas. (Angelos, *et al.*, 2007a; Frank & Gerber, 1981).

Ciertos *Mycoplasmas* también pueden secretar algunas exotoxinas, incluidas CARDS TX y hemolisina, además de expresar diversas enzimas patógenas, como las enzimas lipolíticas, peptidasas, fosfatasas, ecto-ATPasas, nucleasas citotóxicas y nucleotidasas (Chen *et al.*, 2021). Se ha observado en *Mycoplasmas* spp., que los radicales libres, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el superóxido (O_2^-) ocasionan daño oxidativo en las membranas de las células del hospedero (Razin & Yogev, 1998).

3.4.- Invasión y sobrevivencia bacteriana.

En el caso particular de *Chlamydia* una vez que ingresa dentro de la célula, esta debe invadir a las células epiteliales no fagocíticas mediante la formación de una vacuola cargada con los cuerpos elementales (EB) (inclusión) (Eissenberg *et al.*, 1983), posteriormente evitar y bloquear la fusión con los fagolisosomas (Capmany & Damiani, 2010; Rzomp *et al.*, 2003) y adquirir nutrientes dentro de la célula para poder reestructurarse y formar los cuerpos reticulados (CR) (Su *et al.*, 2004).

El ciclo comienza con la unión del cuerpo elemental infeccioso (CE) y su entrada a la célula epitelial. Posteriormente, el CE se diferencia en el cuerpo reticulado (RB) dentro de los límites de un fagosoma modificado llamado inclusión. La inclusión naciente evita la fusión con los compartimentos endofagocíticos y migra hacia el perinúcleo. Las proteínas bacterianas (Inc) expuestas en la membrana de inclusión median la interacción con diferentes orgánulos del hospedero y facilitan la adquisición de nutrientes. Los RB se replican por fisión binaria y finalmente se vuelven a diferenciar en EB que se liberan al medio extracelular mediante lisis de la célula hospedera o por extrusión de la inclusión. En condiciones estresantes, *Chlamydia* pasa a un estado inactivo caracterizado por la presencia de cuerpos aberrantes no infecciosos (AB) (Damiani *et al.*, 2014).

El sistema de secreción (TTSS) tipo III es un mecanismo que utiliza *Chlamydia* para secretar diversas proteínas efectoras como las TarP (translocated actin recruiting phosphoprotein), las CPAF (Chlamydial protease-like activity factor) y las Inc (Inclusion proteins secreted)

directamente al sitio de entrada ya sea al citoplasma o a la membrana, lo que permite el inicio de la remodelación del citoesqueleto de actina que es fundamental para inducir la fagocitosis y facilitar la penetración de la bacteria dentro de las células esta acción ayuda a degradarlos factores de transcripción de las células para la presentación de antígenos por parte del CMH I y II lo cual interfiere a la respuesta a la infección de esta bacteria.(Carabeo *et al.*, 2002; Clifton *et al.*, 2004; Engel, 2004).

Del sistema de secreción tipo III hasta en este momento se han caracterizado siete proteínas Inc en *C. trachomatis* (IncA-G) y tres en *C. pneumoniae* y *C. psittaci* (IncA-C), este descubrimiento ha permitido determinar el tiempo exacto en que *C. trachomatis* y *C. psittaci* puedan expresar las proteínas IncD-G y IncB que les permitirá la transición del cuerpo elemental al cuerpo reticular y del bloqueo de la fusión del lisosoma con el cuerpo elemental una vez fagocitado por la célula.

Posteriormente los CR de *Chlamydia* deben mantener la integridad de la célula infectada mientras se están replicando (Fan *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2005), y a su vez diferenciarse a nuevos cuerpos elementales (CE) que son la forma infectiva (Hybiske & Stephens, 2007), para que esto suceda *Chlamydia* utiliza un lipopolisacárido (LPS) para realizar la transición de CR a CE (Nguyen *et al.*, 2011), una vez realizado la transición los CE buscan una forma segura de salir de la célula infectada (extrusión) para infectar a otras células vecinas.

Para que ocurra esta última fase las CE de *Chlamydia* secretan varias proteínas sobre la membrana de inclusión (Rockey *et al.*, 1995, Rzomp *et al.*, 2006) y en el citosol lo que desencadena en una lisis de célula infectada (extrusión) y liberando a los CE al medio extracelular para posteriormente invadir a otras células (Zhong *et al.*, 2001).

Las proteínas de membranas polimórficas (Pmps) además de la adhesión celular, desempeñan funciones en la evasión de la respuesta inmune mediante la variación de antígenos (Rodolakis & Laroucau, 2015). En *Chlamydia* spp., las Pmps se encuentran presentes, aunque el número de secuencias de codificación (CDS) varía de acuerdo a la especie. por ejemplo, en *C. trachomatis* solo se codifica 9 Pmps, mientras que la familia Pmps se expande en *C. pneumoniae*, *C. abortus* y *C. psittaci* codificando 21, 2 y 21 Pmps respectivamente (Henderson & Lam, 2001; Lent *et al.*, 2016b)

3.5.-Sistema de adquisición de hierro.

El hierro se considera como un elemento esencial para todas las bacterias ya que es necesario para su crecimiento y replicación (Fenwick *et al.*, 1996), para esto *Moraxella* ha desarrollado un sistema constituido por sideróforos y de una proteína de membrana externa (PME) de 78 kDa actuando como un receptor para reconocer a la lactoferrina y transferrina dos proteínas capaces de quelar el hierro en las secreciones de las mucosas y en el suero sanguíneo (Brown *et al.*, 1998; Fenwick *et al.*, 1996). No obstante, en estudios posteriores encontraron en *Mor. bovis* las proteínas TbpA y TbpB y LbpA y LbpB, estas proteínas resultaron ser específicas para el reconocimiento de la transferrina y lactoferrina bovina pero no para las ovinas y caprinas (Yu & Schryvers, 2002).

En cepas *Mor. bovis* un grupo de investigadores describieron que cuando existe una disminución en la expresión del gen influye negativamente en la expresión del gen *omp79* la cual codifica una proteína de 79 kDa denominada lrpA, sin esta proteína existe un retardo en el crecimiento de la bacteria en condiciones donde la fuente de hierro está disponible por la transferrina o lactoferrina bovina (Kakuda *et al.*, 2003a, 2003b).

3.6.- Evasión de la respuesta Inmune y variación antigénica

Debido a que las bacterias poseen diversos antígenos estos pueden desencadenar una respuesta inmunológica y como un mecanismo de defensa muchos de los patógenos alteran los antígenos que se encuentran en su superficie a través de un proceso denominado variación antigénica. Este proceso involucra la activación de genes alternativos y en consecuencia en el momento en que el organismo reconoce y monta la respuesta inmunitaria contra el patógeno, este ya habrá alterado sus antígenos para que no sea reconocido y no se ve afectada por los anticuerpos.

Se ha observado en *Mycoplasma* especialmente en *M. hyorhina* una familia de genes *vlp* que codifican un sistema conformado de lipoproteínas variables Vlp que recubren la superficie de la membrana del microorganismo proporcionan una amplia gama de variantes antigénicas (Rosengarten & Wise, 1990, 1991).

Se ha identificado que algunas proteínas de membrana polimórficas (Pmps) participan en la evasión de la respuesta inmune mediante la variación de antígenos (Grimwood *et al.*, 2001), ya que esta característica parece ser única para pmpH en *C. psittaci*, se sugiere esta proteína juega un papel importante en el ciclo de desarrollo de esta bacteria.

4.-Análisis filogenético de patógenos.

Se ha descrito que *Mor. bovis* y *Mor. bovoculi* existen dos genotipos (genotipos 1 y 2) estos dos genotipos se diferencian por el tamaño de sus cromosomas, por el contenido genómico y la presencia de variantes proteicas codificadas del factor de virulencia de las hemolisinas, aunque estos aislamientos no se ha demostrado experimentalmente que cause la IK> (Wynn *et al.*, 2022)

En cepas del genotipo 1 de *Mor. bovoculi* que fueron aisladas de casos clínicos IK, se ha observado una gran diversidad de recombinaciones en su secuencia entre especies, específicamente entre las regiones del gen *I6S* y *RTX* que codifican a la β -hemolisina, presentan un mayor número de genes vinculados a factores de virulencia y a la presencia de genes vinculados a la resistencia antimicrobiana en comparación a cepas genotipo 1 de *M. bovoculi* aisladas de animales sin lesiones oculares (Dickey *et al.*, 2018).

En un estudio reciente se informó de una supuesta nueva especie/mutante de *Moraxella* (SBP 39/19) que fue recuperada de secreciones oculares en caballos, esta nueva especie se hipotetiza que pudo haber surgido a partir de una variación o mutación de una cepa de *Moraxella bovoculi* (Seeger *et al.*, 2021)

5.- Respuesta inmune del ojo.

Se reconoce que las barreras más eficaces de la estructura del ojo son las superficies de los epitelios de la córnea y de la conjuntiva que son regenerados cada 5 a 7 días para evitar la adherencia de diversos microorganismos patógenos. La superficies de los epitelios de la córnea está compuesta de células claras que se consideran células jóvenes y ricas microplacas mientras las células oscuras se consideran que son las etapas finales de desarrollo de las células epiteliales, sin embargo, esta característica les permite a las bacterias situarse en las

células oscuras para esperar el recambio celular y de las condiciones favorables como la resequeidad y presencia luz para favorecer la colonización de las superficies de los epitelios del ojo (Chandler *et al.*, 1983).

Otra barrera de defensa en el ojo está conformada por la composición química de la película lagrimal lo cual otorga una defensa inespecífica en la superficie ocular (Gilger, 2008). Las lágrimas por si solas tienen como función principal transportar sustancias, como la β -lisina, transferrinas, lactoferrinas. componentes del sistema del complemento y lisoenzima que proporcionan una acción antimicrobiana contra los microorganismos patógenos. (Brightman *et al.*,1991).

Para iniciar una respuesta inmune inespecífica en el ojo, este comienza a reclutar neutrófilos, monocitos y macrófagos en el área de inflamación para comenzar la limpieza de los desechos celulares y la destrucción de los microorganismos patógenos (Eichenbaum *et al.*, 1996). Sin embargo, para montar una respuesta inmune específica, en el ojo existe una serie de limitaciones como son el limitado drenaje linfático y la escasa vascularización impidiendo el acceso de linfocitos citotóxicos y de anticuerpos circulantes a la cornea (English,1999). Para contrarrestar estas limitaciones en la conjuntiva se encuentra tejido linfoide denominado (CALT) que permite la captación y procesamiento de antígenos por parte de los macrófagos para estimular la producción de inmunoglobulinas encontrando principalmente la IgA en la superficie ocular y en las lágrimas (Eichenbaum *et al.*, 1996). aunque también se ha detectado de anticuerpos protectores IgM e IgG (IgG1 e IgG2) (Bishop *et al.*,1982).

II- JUSTIFICACIÓN.

El ojo es considerado como un espejo del estado de salud del animal, es importante reconocer que cuando su estructura se altera, se refleja en los rendimientos de producción del animal. Sin embargo, cuando se busca información sobre cualquier aspecto asociado a patologías oculares en ovejas como es el caso de la IKC la información es escasa y aparece de forma dispersa, dado a que no se ha podido señalar a ningún microorganismo como el agente primario y/o secundario de la queratoconjuntivitis contagiosa en los pequeños rumiantes. Se sugiere que esta enfermedad tiene un origen multifactorial, que es desencadenado por la intervención de diversos factores medioambientales, del hospedero y de los patógenos implicados. Actualmente se reconoce que los animales afectados presentan un retraso en el crecimiento y por ende con lleva a una disminución en la productividad generando pérdidas económicas para los productores. En los últimos años se han identificado diversas especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Moraxella* asociadas a la queratoconjuntivitis en los pequeños rumiantes lo cual enaltece la importancia del diagnóstico definitivo por el riesgo potencial zoonótico que representan algunos de estos patógenos.

A pesar que aún no se comprende totalmente la patogénesis de la queratoconjuntivitis infecciosa se reconoce que algunos patógenos utiliza diversos factores de virulencia para colonizar los diferentes epitelios del ojo, el entendimiento de los diferentes factores de virulencia como; las proteínas de inclusión de membrana (*incA*), las proteínas de membrana polimórficas (*Pmps*), los lipopolisacáridos (*LppS*), las citotoxinas (operón *RXT*), los sideróforos (*fur*), las fosfolipasas (*plb*), las proteínas chaperonas (*Hsp*) y otras más, pueden permitir a desarrollar nuevos métodos diagnósticos y nuevas propuestas de inmunógenos para controlar y prevenir la enfermedad. En la actualidad los estudios moleculares en la patogénesis microbiana han permitido identificar algunos patógenos asociados a la IKC como son *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Moraxella*, sin embargo, en México no se tienen estudios al respecto, por tal razón este estudio generará impacto en la generación de nueva información para la comprensión de la patogenia de la IKC y representaría el inicio de la vigilancia epidemiología molecular de los diferentes patógenos que ocasiona esta patología y que afecta a los pequeños rumiantes en las diferentes sistemas de producción en gran parte de territorio mexicano.

III.- HIPOTESIS.

En lesiones oculares de ovinos y caprinos se podrán identificar a los principales patógenos como *Moraxella* spp., *Chlamydia* spp. y *Mycoplasma* spp. implicados en la queratoconjuntivitis infecciosa.

IV.- OBJETIVOS.

4.1.- Objetivo General.

Identificar y caracterizar a *Moraxella* spp., *Chlamydia* spp. y *Mycoplasma* spp implicados en la queratoconjuntivitis infecciosa obtenidos de muestras de lesiones oculares en ovinos y caprinos.

4.2.- Objetivo Específicos.

Obtener aislamientos de *Moraxella*, *Chlamydia* y *Mycoplasma* de muestras de casos clínicos de queratoconjuntivitis contagiosa en ovinos y caprinos, en el Estado de México.

Identificar las especies de *Moraxella*, *Chlamydia* y *Mycoplasma* mediante la PCR utilizando genes específicos.

Amplificar los genes de virulencia en: *Moraxella* spp. (*fur*, *plb*, *mbxA*), *Chlamydia* spp. (*pmpH* y *incA*) y *Mycoplasma* spp. (*lppS*).

Realizar el análisis filogenético de los aislamientos obtenidos y factores de virulencia identificados.

V.- MATERIAL Y METODOS.

5.1.- Recolección de las muestras.

El tamaño de la muestra se estimó con la fórmula para población infinitas $n = z^2 pq / e^2$.

Donde z^2 = Nivel de confianza 95%; p = Probabilidad de que ocurra el evento ($p = 0.24$) (Ortiz Arana *et al.*, 2017); $q = 1 - p$ Probabilidad de que no ocurra el evento; e^2 = error estimado (5%); n = tamaño de la muestra (Jaramillo & Martínez, 2009) estimando un $n = 280$ animales.

Se identificaron animales con afecciones oculares sugerentes a la queratoconjuntivitis dentro de los rebaños de ovinos y caprinos de diferentes municipios del Estado de México. A todos los animales con lesiones oculares sugerentes a IKC se le realizó un examen clínico y pruebas oftalmológicas como la prueba Schimer y Tinción de Fluoresceína (Montserrat *et al.*, 2006). Por cada animal se recolecto tres muestras mediante la realización de un pase en la descamación conjuntival sin tocar el borde palpebral, teniendo cuidado de no contaminar la muestra (Akerstedt & Hofshagen, 2004).

El primer hisopado se colocó en un medio de transporte Stuart (MTS, Cat 1058A, Dibico en México S.A de C.V) (Akerstedt & Hofshagen, 2004) y el segundo se transportó en caldo Friss (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE. UU) (Shahzad *et al.*, 2013) y el tercero se transportó en medio de sacarosa-fosfato/glutamato (SPG) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antimicrobianos 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina y 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina (Mora-Diaz *et al.*, 2015; Sachse *et al.*, 2009). Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración a 4°C hasta la llegada dentro del laboratorio y conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

5.2.- Aislamiento e identificación.

Para identificar a *Moraxella* spp. se utilizaron los criterios establecidos por (Angelos & Ball, 2007; Angelos *et al.*, 2007a; Shen *et al.*, 2011) Las muestras de los hisopados fueron sembradas en placas de agar base sangre suplementada con 5% de sangre ovina (ABS, BLL, Cat BD211037 Becton, Dickison en México). Las placas fueron incubadas a 37°C entre 48-

72 h y se observó el crecimiento de colonias circulares con elevación convexa, margen entero, superficie suave y un halo de β -hemólisis a su alrededor.

Para identificar *Mycoplasma* spp., se emplearon los criterios establecidos por (Giangaspero *et al.*, 2010; Shahzad *et al.*, 2013). Las muestras se incubaron a 37°C durante 72 h en condiciones de microaerófila. Posteriormente los caldos fueron filtrados a través de una membrana con poros de 0.45 μ m (Seitz, Avondale, Pensilvania, USA) y se colocaron algunas gotas en agar PPLO (APPLO Cat. BD231210 DB, Difco, México). Las placas se incubaron hasta por 8 días y fueron monitorizadas cada dos días para detectar signos de crecimiento de *Mycoplasma*.

5.3.- Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de las muestras y de los aislamientos obtenidos se realizaron mediante el kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (Cat 51306, Qiagen, USA) conforme al criterio del fabricante (**ANEXO**)

5.4.- Identificación molecular.

Para la identificación molecular de los diversos patógenos se utilizaron los siguientes protocolos:

Chlamydia spp.

Para la identificación de ADN Chlamydial de las muestras se emplearon los genes *23S rRNA* y *ompA* mediante un PCR Tiempo real. El primer protocolo a seguir de Ehrlich *et al.*, (2006) para determinar a la familia *Chlamydiaceae*. El volumen de reacción fue llevado de la siguiente manera, en una placa de 96 pozos, en volúmenes de reacción de 20 μ l: 10 μ l de 2X QuantiNova Probe PCR Master Mix que contiene QuantiNova DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, QuantiNova Antibody, QuantiNova Guard, QuantiNova ProbePCR Buffer y dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)), (Qiagen®, Alemania), 0.4 μ M de cada iniciador, 0.1 μ M de sonda de hidrolisis y 2 μ l de ADN de las muestras. La amplificación se realizó

empleando el siguiente protocolo de temperaturas: un ciclo a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 s y 65 °C por 2 s. Como control positivo se utilizó ADN purificado del fragmento *23s rRNA* de la cepa AB7 de *C. abortus*; Control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

Para la determinación de las especies de *Chlamydia* se utilizó el protocolo descrito por (Pantchev *et al.*, 2009, 2010). La amplificación se realizó empleando el siguiente protocolo de temperaturas de la siguiente manera: un ciclo a 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 s. y 60 °C por 3 s. Con la finalidad de obtener un tamaño de los productos 76 pb, 82 pb, 76 pb respectivamente. Como control positivo se utilizó un plásmido que contiene el gen *ompA* específico para *C. abortus* (Plate/*ompACa*); para *C. pecorum* (*pGEM-ompA*) y para *C. psittaci* (*pGEM-ompA*). Control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Tabla 1).

Moraxella spp.

Para la identificación de los aislamientos de *Moraxella* se empleó el gen *16S rRNA* mediante un PCR multiplex. Se utilizó el protocolo descrito por (Shen *et al.*, 2011). Para el volumen reacción se empleó un total de 25 µl que contenía 0.4µM de cada primer, Green Master Mix 12.5µL (1X), Agua 7.5 µL, colonia pura. La amplificación se realizó empleando el siguiente protocolo de temperaturas a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 40s, 55°C por 40 s y 72°C por 60 s y una extensión final a 72°C por 7 min, con la finalidad de obtener un tamaño de los productos 1849 pb, 1859 pb, 1541 pb para la identificación de *M. ovis*, *M. bovoculi* y *M. bovis* respectivamente Como control positivo se utilizó un aislamiento de campo de *Moraxella* (BMor128) obtenido de un estudio previo (Ortiz *et al.*, 2023), con código de secuencia gen Bank (ON811671) y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

Mycoplasma spp.

Para la identificación de *M. conjunctivae* se empleó un PCR anidado basada en el gen *lppS*. utilizando los protocolos descritos por Belloy *et al.*, (2003a) Para el volumen reacción se empleó un total de 25 µl que contenía 0.4µM de cada primer, Green Master Mix 12.5µL (1X), Agua 7.5 µL, ADN de la muestra. La amplificación se realizó empleando el siguiente protocolo de temperaturas a 94°C por 30 s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 2

min y 72°C por 60 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Con la finalidad de obtener un tamaño de los productos 1047pb y 748 pb respectivamente. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas

Tabla 1. Iniciadores y técnicas utilizadas para la identificación de *Chlamydia* spp. *Moraxella* spp. y *Mycoplasma conjunctivae*,

Tipo de PCR	Gen	Primers	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>Chlamydia</i> , PCR tiempo real	23S rRNA	Ch23S-F	CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT	Ehricht, <i>et al.</i> , 2006
		Ch23S-R	ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC	
		Ch23S-P	FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-TAMRA	
	ompA	CpaOMP1-F	GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA	Pantchev <i>et al.</i> , 2009,2010
		CpaOMP1-R	ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA	
		CpaOMP1-S	FAMTAAATACCACGAATGGCAAGTTGGTTT AGCG-TAMRA	
		CppecOMP1-F	CCATGTGATCCTTGCGCTACT	
		CppecOMP1-R	TGTCGAAAACATAATCTCCGTAATAAT	
		CppecOMP1-S	FAM-TGCGACGCGATTAGCTTACGCGTAG-TAMRA	
		CppsOMP1-F	CACTATGTGGGAAGGTGCTTCA	
		CppsOMP1-R	CTGCGCGGATGCTAATGG	
		CppsOMP1-S	FAM-CGCTACTTGGTGTGAC-TAMRA	
	<i>Moraxella</i> , PCR Multiplex	16S rRNA	Bviv16S1F	GAACGATGACTATCTAGCTTGCTAGATATG
Bovi1541R			AGCTATAGACCCAATTTAACTTACGCTACT	
Bovo1915R			TGTATTGGGTACAATCACCATGG	
Ovi16S1F			GAACGATGAGTATCCAGCTTGCT	
Ovis1849R			CTCTTTACTTTGGTTAATTATTTTGTGGA	
<i>Mycoplasmas</i> <i>conjunctivae</i> PCR anidada	16S rRNA	MOLIGEN1-L	ACTCCTACGGGAGGCAGCA	Belloy <i>et al.</i> , 2003
		16SUNI-R	GTGTGACGGGCGGTGTGTAC	
	LppS	McoF1	GTATCTTTAGAGTCCTCGTCTTTTAC	
		McoR1	CAGCGTGCAGGATGAAATCCCTC	

5.5.- Análisis estadístico.

Se evaluó la asociación de los géneros y especies microbianas versus lesiones oculares de ovinos utilizando la prueba de Chi-cuadrada con una significancia de $P < 0.05$ con el software EpiTools ([http://epitools.ausvet.com.au/content.php? página=EstadísticasInicio](http://epitools.ausvet.com.au/content.php?%20p%C3%A1gina=Estad%C3%ADsticasInicio)). Para comparar las interacciones entre especies se empleó la prueba de Fisher con una significancia de $P < 0.05$ de confianza con el software Epi Info™ | CDC (<https://www.cdc.gov/epiinfo>).

5.6.- Factores de virulencia.

Para la identificación de diversos factores de virulencia asociados a los patógenos involucrados en la IKC:

Chlamydia spp.

Para la identificación de los factores de virulencia vinculado al gen *pmpH* (que codifica para una proteína polimórfica de membrana) se siguió el protocolo descrito por Lent *et al.*, (2016) y para el gen *incA* (que codifica para la proteína de inclusión de membrana) se siguió el protocolo en este estudio. Para amplificación del gen *pmpH* se empleó los iniciadores (H-G2-F y H-G2-R) utilizando un volumen de reacción total de 25 μ l de la PCR que contenía 0.4 μ M de cada primer, Green Master Mix 12.5 μ L (1X), Agua 2.5 μ L, 5 μ L ADN de la muestra, la cual se empleó el siguiente protocolo de temperaturas 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s, 58°C por 30s y 72°C por 60s y una extensión final 72°C por 2 min En la cual se espera visualizar un tamaño del producto 207 pb. Control negativo se utilizó agua libre de nucleasas

Para la identificación del gen *incA* se diseñaron primers a partir de la secuencia reportada en el GenBank (EU340812.1) de la proteína membrana de inclusión de *Chlamydia abortus* aislamiento MO907 Para amplificación del gen *incA* se utilizó un volumen de reacción total de 25 μ l de la PCR que contenía 0.4 μ M de cada primer, Green Master Mix 12.5 μ L (1X), Agua 2.5 μ L, 5 μ L ADN de la muestra, la cual se empleó el siguiente protocolo de temperaturas 95°C por 2 min seguido de 40 ciclos a 95°C por 60s, 55°C, por 30s, 72°C. por 45s y una extensión final 72°C por 7 min. Para lo cual se esperó visualizar un tamaño de

producto de 619 pb. Como control positivo se utilizó un aislado de campo de *C. abortus* obtenido de bazo de un ovino; Control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Tabla 2).

Moraxella spp.

Para la identificación de los factores de virulencia vinculado a los genes *mbxA* (que codifica para la estructura de la β -hemolisina), *plb* (que codifica para una fosfolipasa B) y *fur* (que codifica una proteína reguladora de la adquisición de hierro) en los aislamientos de *Moraxella* spp se siguió los siguientes protocolos descritos por (Angelos *et al.*, 2007a; Sosa *et al.*, 2015). Para amplificación del gen *mbxA* se emplearon los iniciadores para *mbxA* (Pphem start y New B gene up), para el gen *plb* (mbpl_fwd y mbplb_rev) y para el gen *fur* (mbfur_fwd y mbfur_rev). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l que contenía 0.4 μ M de cada primer, Green Master Mix 12.5 μ L (1X), Agua 7.5 μ L, ADN de la muestra. Para el gen *mbxA* se utilizó el siguiente protocolo de temperaturas 95°C por 1 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 min, 56°C por 30s y 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 5 min (Tabla 2).

Para los genes *plb* y *fur* se empleó el siguiente protocolo de temperaturas 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 40°C por 1 min y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Con la finalidad de visualizar los siguientes tamaños de los productos, 3703 pb, 1490 pb y 336 pb respectivamente. Control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

Mycoplasma spp.

Para la identificación del factor de virulencia vinculado al gen *lppS* que codifica una proteína denominada LppS en *Mycoplasmas* spp se siguió el protocolo descrito por (Belloy *et al.*, 2003b). Para el volumen reacción se empleó un total de 25 μ l que contenía 0.4 μ M de cada primer, Green Master Mix 12.5 μ L (1X), Agua 7.5 μ L, ADN de la muestra. La amplificación se realizó empleando el siguiente protocolo de temperaturas a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30s, 51°C por 30s y 68°C por 75s y una extensión final a 72°C por 5 min Para lo cual se pretende visualizar un tamaño de producto 966 pb (Tabla 2).

Tabla 2. Iniciadores y factores de virulencia asociados a patógenos IKC.

Genero	Gen	Factor de virulencia	Primers	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>Chlamydia</i>	<i>pmpH</i>	Evasión	H-G2-F	GCATGCCTCAACCCTATCGT	Lent <i>et al.</i> , 2017
			H-G2-R	CAACGGCGCTAGATGGAAAA	
	<i>incA</i>	Invasión	incA-F	TCTTACTGCACCTGTAAAAGC	En este estudio.
			incA-R	TACTTGCCCTGAGTTTGCT	
<i>Moraxella</i>	<i>fur</i>	Sidefolio	Mbfur_fwd	GTTTTGGTATTTTAGATGG	Sosa <i>et al.</i> , 2015
			Mbfur_rev	AGTGCCTTATACACGTCT	
	<i>plb</i>	Fosfolipasa B	Mbplb_fwd	CGCAAATCACCGACCATTT	
			Mbplb_rev	AAACATCAAGCGAACCCCAA	
	<i>mbxA</i>	β -hemolisina	P-hemstart	ATHGAYTGGATHGCNCCNTTYG	
			NewBgeneup	ACCTTATCCATCACAACCTGAA AAAAC	
<i>Mycoplasma</i>	<i>lppS</i>	Adhesinas	Ser_start2	CACTATACTTAACAGATAGTCC	Belloy <i>et al.</i> , 2001
			Ser_end	GCAGCAACTGCTGAAAGTC	

5.7.- Análisis Filogenético de los patógenos y factores de virulencia

Una vez amplificado las secuencias parciales del gen *16S rRNA* y del factor de virulencia (*incA*) se procedió a la purificación de los fragmentos usando el kit comercial PROMEGA (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) siguiendo las indicaciones y especificaciones del fabricante, el kit tiene la capacidad de purificar el fragmento a partir de la reacción de PCR, lo cual facilita la obtención y concentración adecuada de ADN purificado (ANEXO).

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN purificados se procedió a medir su concentración en un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific) alcanzando una concentración final de 100-120 ng de ADN, para su posterior envío a la Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa estadístico Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para las alineaciones de las secuencias de los genes obtenidos se utilizaron los programas estadísticos Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 11.0) (64 bits) y software Geneious Prime® Versión 11.0.14.1+1 (64 bits). y las secuencias obtenidas fueron comparados con la base de datos del Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la construcción de un árbol filogenético mediante el método de Maximum Likelihood modelo Tamura-Nei utilizando un valor bootstrap de 1000 repeticiones. Las construcciones de los árboles filogenéticos serán derivados de los alineamientos y porcentajes de similitud de la secuencia parcial de los genes (*16S rRNA*) y del factor virulencia *incA* obtenido.

VI.- RESULTADOS.

Se recolecto un total de 840 muestras de hisopados del saco conjuntival de 277 ovinos y 3 caprinos pertenecientes a casos clínicos de queratoconjuntivitis infecciosa obtenidos de 25 localidades en 9 municipios en el Estado de México (Figura 6) de un total 913 animales. Se obtuvo una prevalencia del 30.66% (280/913) de la enfermedad de IKC en el Estado de México como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestreo en pequeños rumiantes con queratoconjuntivitis infecciosa en ocho municipios del Estado de México.

Municipio	Estado	UPP	Total, de Animales	Animales Muestreado	%
Xonacatlán	México	3	65	47	72.3
Lerma	México	3	86	45	52.
Cuajimalpa	México	3	55	29	52.7
Almoloya de Juárez	México	5	116	36	31.0
Temoaya	México	4	73	19	26.0
Ocoyoacán	México	1	87	43	49.4
Villa Cuauhtémoc	México	2	56	22	39.2
Ixtlahuaca	México	2	165	17	10.3
Toluca	México	2	210	22	10.4
Total		25	913	280	30.66

UPP Unidad de producción pecuaria , % Porcentaje de prevalencia de IKC

Las lesiones que se observaron con mayor frecuencia en los casos de queratoconjuntivitis infecciosa es la conjuntivitis 28.1% (257/913), acompañada con secreción mucopurulenta 27.0% (247/913), seguida por la pérdida de la visión 10.2% (94/913), opacidad corneal 8.3% (76/209) y solo el 1.9% de los animales (18/913) presentan ulcera corneal (Tabla 4).

Tabla 4. Escala de grado de lesión del globo ocular en pequeños rumiantes con IKC.

Grado de	Lesiones	Animales afectados	Localización de la lesión en el ojo		
			I	D	B
1	Ojo seco	70	-		
2	Epifora.	37	--		
3	Secreción	247	46	38	163
4	Conjuntivitis.	257	46	37	174
5	<i>Queratoconjuntivitis</i>	29	5	1	26
6	Opacidad corneal	76	12	18	46
7	Neovascularización	6	0	1	5
8	Úlcera corneal	18	7	4	7

Prueba de Schirmer Valor < 15mm corresponde Ojo Seco; Prueba de Schirmer Valor > 15mm corresponde Epifora; Prueba Fluoresceína (+) Presencia de Úlcera Corneal

Identificación bacteriológica de *Moraxella* spp.

De las 280 muestras de hisopados conjuntivales, se identificó en 46 a *Moraxella* spp., en agar sangre observando crecimiento de colonias pequeñas grisáceas con presencia de un halo β -hemolisis alrededor de las colonias (Figura 1), a las colonias sospechosas se les realizó tinción de Gram identificando cocos Gram negativos.



Figura 1. Crecimiento de *Moraxella* spp., en placa agar sangre.

Posteriormente a las colonias, se les realizaron pruebas complementarias para la identificación de especies de los aislamientos obtenidos Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de pruebas bacteriológicas de los aislados de *Moraxella* spp.

Tinción Gram	B-Hemolisis	Respiración	Catalasa	Oxidasa	TSI	SIM	MIO	OF	Urea	Mac Conkey	Sal Manitol	Adhasa	Gelatinasa	Caldo nitrato	Fenilalaninadesaminasa	Resultados Aislamientos	Total	Identificación	Bacteriológica
Coco	+	Aerobia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7		<i>M.</i>	
Coco	+	Aerobia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	39	46	<i>ovis</i>	

Características de crecimiento y pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de *Moraxella*.

Identificación molecular de *Moraxella* spp.

Del total de los 46 aislamientos obtenidos por bacteriología de *Moraxella* spp, sólo el 95.65% (44/46) amplificaron el gen *16S rRNA* observando una banda de 1849 pb que corresponde a *Moraxella ovis* (Figura 2) (Tabla 6).

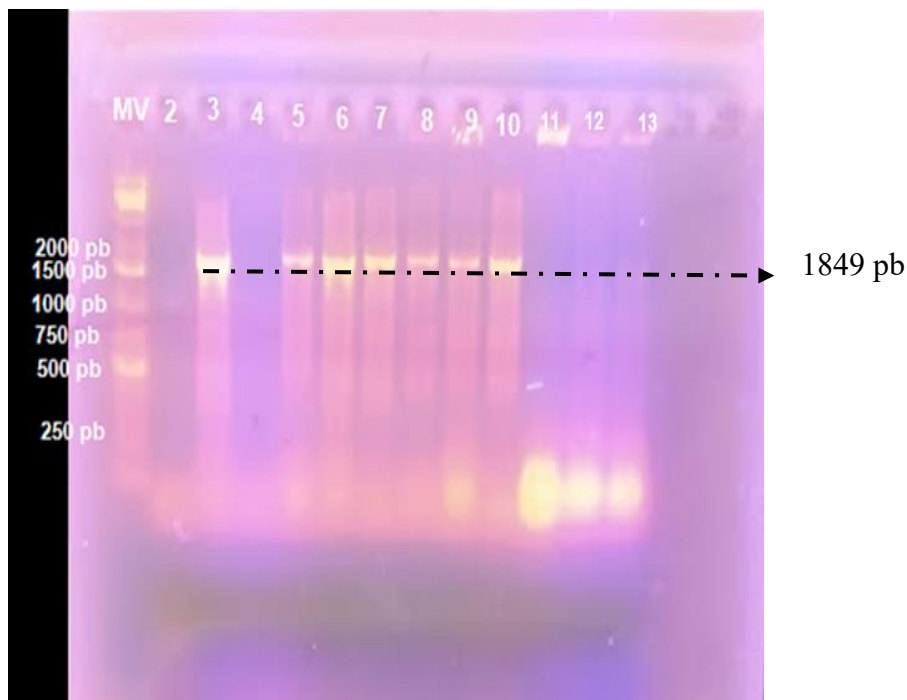


Figura 2. Amplificación del gen *16S rRNA*, identificación molecular de *Moraxella ovis*. PCR multiplex. Gel agarosa 1.0% (MV) Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Cat.G5711 Promega). Carril (2) Muestra control negativo H2O. Carril (3) Muestra control positivo (BMor128). Carril (4-13) Aislados de *Moraxella ovis*.

Factor de virulencia en *Moraxella* spp.

En este estudio no se logró identificar ningún factor de virulencia asociado a *Moraxella ovis*. Para el gen *mbxA* ninguna de las muestras amplificó el producto de 3703 pb correspondiente al gen *mbxA* (Tabla 6)

Para los genes *plb* y *fur* se observaron productos inespecíficos, en las muestras positivas a *M. ovis* (Tabla 6).

Tabla 6. Aislamientos de *Moraxella* y factores de virulencia detectados de casos clínicos de IKC en el Estado de México.

Muestra	Especie	Bacteriología	PCR Multiplex gen 16S rRNA.			Factores de virulencia		
		<i>Moraxella ovis</i>	<i>Moraxella ovis</i>	<i>Moraxella bovis</i>	<i>Moraxella bovoculi</i>	<i>mbxA</i>	<i>plb</i>	<i>Fur</i>
BMor4-7	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor5-2	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor8-14	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor8- 16	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor8- 28	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor8- 33	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor11-5	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor11-6	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor12-1	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor12-7	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor13-2	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor14-1	Caprino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor14-2	Caprino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor15-3	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor15-6	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-1	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-2	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-5	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-7	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-9	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-11	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-20	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-26	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor16-43	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor18-5	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

BMor19-2	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor20-1	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor20-7	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor20-11	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor20-13	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor20-14	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor20-15	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor21-3	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor21-4	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor21-6	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor21-9	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor21-11	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor22-1	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor23-1	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor23-3	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor23-5	Ovino	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor23-6	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor24-2	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor24-4	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor24-5	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
BMor24-9	Ovino	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Identificación molecular de *Chlamydia* spp.

Del total de 280 de los hisopados conjuntivales transportados en el medio SPG. solo 34 fueron positivos (12.14%) y se detectó la presencia de ADN Chlamydial (Tabla 7).

Todas las muestras que resultaron positivas a la Familia Chlamydiaceae se identificaron como *Chlamydia abortus* 12.14% (34/280) además se detectó en una (1/34) muestra ADN de *Chlamydia pecorum* (Anexo). En este estudio no se logró identificar *Chlamydia psittaci* de las muestras obtenidas en problemas oculares en los pequeños rumiantes (Tabla 7).

Factores de Virulencia en *Chlamydia* spp.

Se detectó la presencia el gen *incA* en cuatro de las muestras positivas a *C. abortus* y en una positiva a *C. abortus* y *C. pecorum* (Figura 3) (Tabla 7).

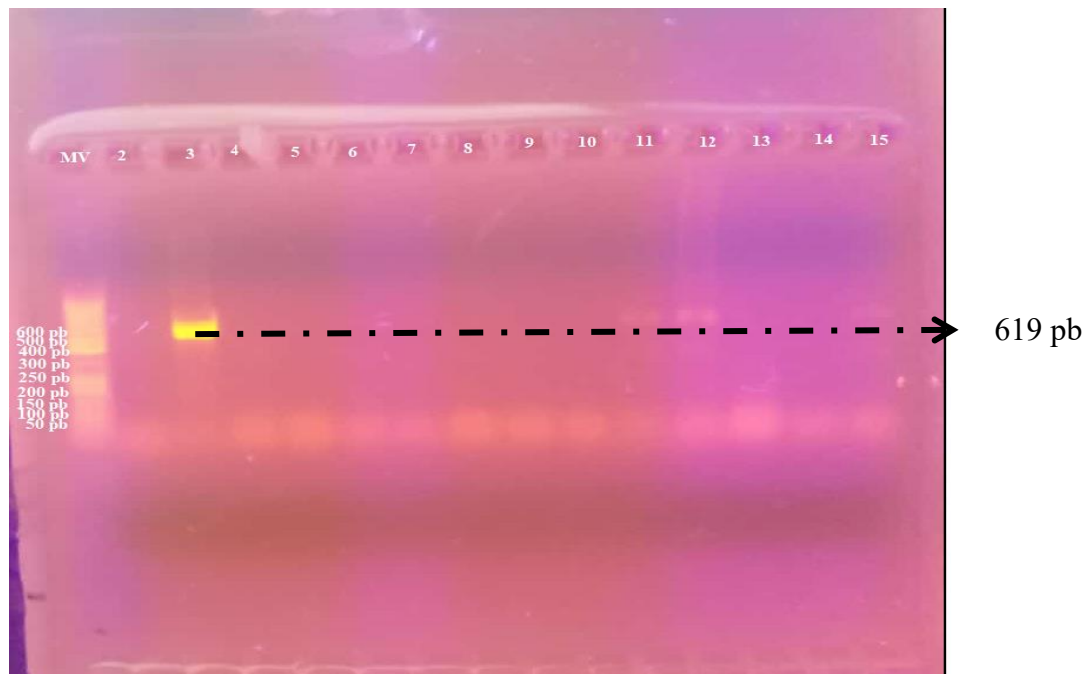


Figura 3. PCR final del gen *incA* en muestras positivas a *Chlamydia*.

PCR punto final. Gel agarosa 1.5% (MV) Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder (Termofisher). Carril (1) Muestra negativo H2O. Carril (2) aislamiento de *C. abortus* identificado de bazo de una oveja que presentó aborto. Muestra. Carril (4-15) Muestras positiva *C. abortus* obtenida de lesiones oculares en ovinos y (Carril 12) Muestra positiva a *C. abortus* y *C. pecorum* obtenida de lesiones oculares en ovinos.

Para el gen *pmpH* se visualizó un tamaño de producto inespecífico para las muestras positivas a *C. abortus*.

Tabla 7. Aislamientos de *Chlamydia* y factor de virulencia detectados de casos clínicos de IKC en el Estado de México.

Muestra	Origen	ADN ng/μl	Absorbancia	Familia Chlamydiaceae	1° ct	C. <i>abortus</i>	1° ct	C. <i>pecorum</i>	1° ct	C. <i>psittaci</i>	1° ct	<i>IncA</i>
Cha4-6	Ovino	9.45	1.86	(+)	35.76	(+)	33.62	(-)	≥36	(-)	≥36	(+)
Cha4-10	Ovino	3.74	1.94	(+)	35.31	(+)	33.6	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha2-13	Ovino	5.08	1.7	(+)	34.45	(+)	33.27	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha8-15	Ovino	4.38	1.85	(+)	34.99	(+)	32.38	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha8-02	Ovino	7.94	1.9	(+)	34.96	(+)	33.72	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha8-12	Ovino	11.19	1.74	(+)	35.77	(+)	32.91	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha8-08	Ovino	16.61	1.81	(+)	35.63	(+)	32.95	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha16-31	Ovino	10.49	1.75	(+)	32.25	(+)	32.62	(-)	≥36	(-)	≥36	(+)
Cha16-33	Ovino	41.99	1.81	(+)	24.67	(+)	33.11	(+)	26.71	(-)	≥36	(+)
Cha10-4	Ovino	7.46	1.48	(+)	34.8	(+)	30.98	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha17-2	Ovino	49.21	1.83	(+)	35.08	(+)	33.63	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha20-4	Ovino	13.79	1.78	(+)	33.93	(+)	31.3	(-)	≥36	(-)	≥36	(+)
Cha20-12	Ovino	38.81	1.49	(+)	33.75	(+)	30.9	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha21-9	Ovino	27.38	1.41	(+)	34.75	(+)	32.56	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha21-12	Ovino	41.30	1.73	(+)	33.75	(+)	33.36	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha23-4	Ovino	7.07	1.95	(+)	34.14	(+)	27.49	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha23-5	Ovino	1.36	2	(+)	34.46	(+)	27.38	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha23-6	Ovino	9.28	1.65	(+)	35.95	(+)	27.49	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha23-7	Ovino	4.13	1.83	(+)	35.58	(+)	27.74	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha23-8	Ovino	6.33	1.68	(+)	35.97	(+)	27.41	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-1	Ovino	5.93	1.81	(+)	34.37	(+)	27.33	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-2	Ovino	11.03	1.81	(+)	34.46	(+)	27.28	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-3	Ovino	8.10	1.85	(+)	34.9	(+)	27.65	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-4	Ovino	1.31	5.1	(+)	35.72	(+)	27.41	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-5	Ovino	12.10	1.8	(+)	34.89	(+)	27.37	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-6	Ovino	2.97	2.05	(+)	35.79	(+)	27.26	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-7	Ovino	8.14	1.93	(+)	35.96	(+)	27.39	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-8	Ovino	4.96	1.77	(+)	35.78	(+)	27.34	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha24-9	Ovino	4.79	2.07	(+)	34.36	(+)	27.34	(-)	≥36	(-)	≥36	(+)
Cha25-1	Ovino	10.53	1.72	(+)	35.16	(+)	27.38	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha25-3	Ovino	8.17	1.67	(+)	34.38	(+)	27.37	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha25-4	Ovino	10.40	1.79	(+)	35.93	(+)	27.51	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha25-5	Ovino	7.90	1.66	(+)	35.76	(+)	27.4	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)
Cha25-7	Ovino	27.38	1.56	(+)	34.71	(+)	27.24	(-)	≥36	(-)	≥36	(-)

Valor de la Curva Estándar <36 (CT) Se considera la muestra como positivo; Valor de la Curva Estándar ≥36 (CT) Se considera la muestra como negativo.

Mycoplasma spp

De los 280 hisopados conjuntivales transportados en medio PPLO, solo una de las muestras se tiene un aislamiento presuntivo de *Mycoplasma* spp, se observa una colonia con apariencia en forma de huevo frito, con tamaño menor 0.2 μm , sin embargo, no hubo crecimiento bacteriano al pase de la resiembra en el cultivo. Se logró identificar a *Mor. ovis* y *C. abortus* en forma conjunta en las lesiones oculares de cuatro ovinos y en otro se identificó *C. abortus* y *C. pecorum* (tabla 8). No se encontró diferencia en las interacciones de los diferentes microorganismos aislados en forma conjunta ($p=0.18$).

Tabla 8. Interacciones entre patógenos asociados IKC en pequeños rumiantes

Interacciones	Identificación	Lesiones oculares	Especie animal
<i>Mor. ovis</i>	42 [♦]	OS, E, C, SP, OC, UC, QC	Ovinos (40)
		QC, SP	Caprinos (2)
<i>C. abortus</i>	29 [♦]	OS, E, C, OC, QC, SP	Ovinos (29)
<i>C. abortus</i> y <i>C. pecorum</i>	1 [•]	C, SP, OC	Ovino (1)
<i>C. abortus</i> y <i>Mor. ovis</i>	4 [•]	OS, E, C, SP	Ovinos (4)

♦Prueba de Chi-cuadrada (X^2) con una probabilidad $p=0.11$; •Prueba exacta de Fisher (F) con una $p=0.18$ Os: Ojo Seco, E: Epifora, C: Conjuntivitis, SP: Secreción Purulenta, OC: Opacidad Corneal, QC: Queratoconjuntivitis, UC: Ulcera Corneal. (#) Animales con aislamiento positivo a cada especie o especies.

Análisis Filogenético.

Moraxella spp

Se realizó el alineamiento de las secuencias parciales del gen *16s rRNA* de *Moraxella* agrupándolos con una similitud 973 nt, estas secuencias fueron analizadas en el programa estadístico Geneious Prime® y se compararon con la base de datos del Gen Bank la

construcción del árbol filogenético se realizó mediante el método de Maximum Likelihood (Figura 4).

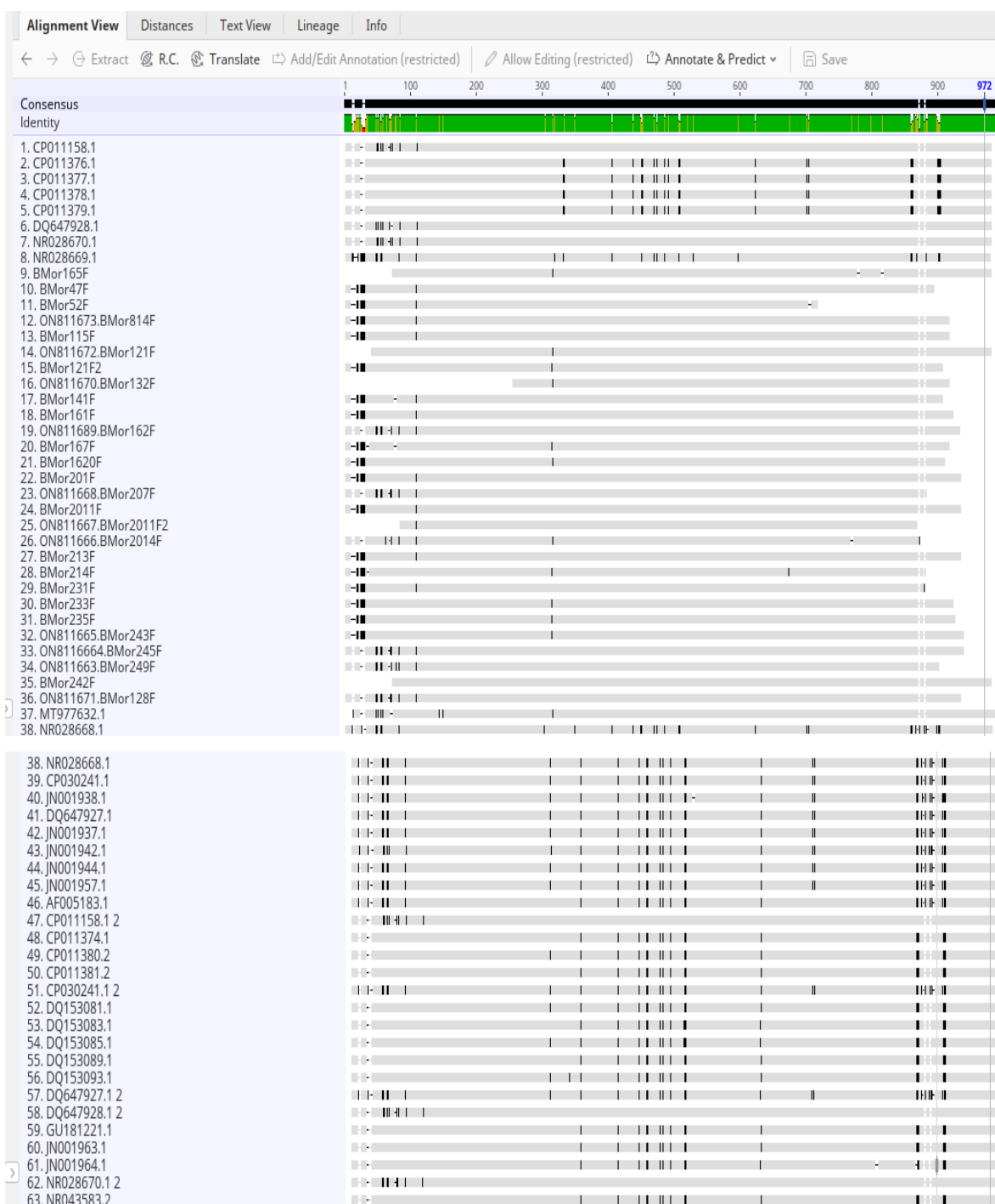


Figura 4. Alineamiento de secuencias del gen *16s rRNA* obtenidas de aislamientos de *Moraxella*

La construcción final del árbol filogenético se realizó analizando 63 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio es decir menos del 5% de brechas de alineación (eliminación parcial). En la construcción final del árbol filogenético se realizó con un total de 802 nt en el conjunto de datos final.

Las secuencias obtenidas de este estudio del gen *16S rRNA* de *Moraxella* se agruparon en la rama principal de *Mor. ovis* junto con las secuencias reportadas en el gen Bank de casos clínicos IKC de bovinos y ovinos de otros países (Figura 11).

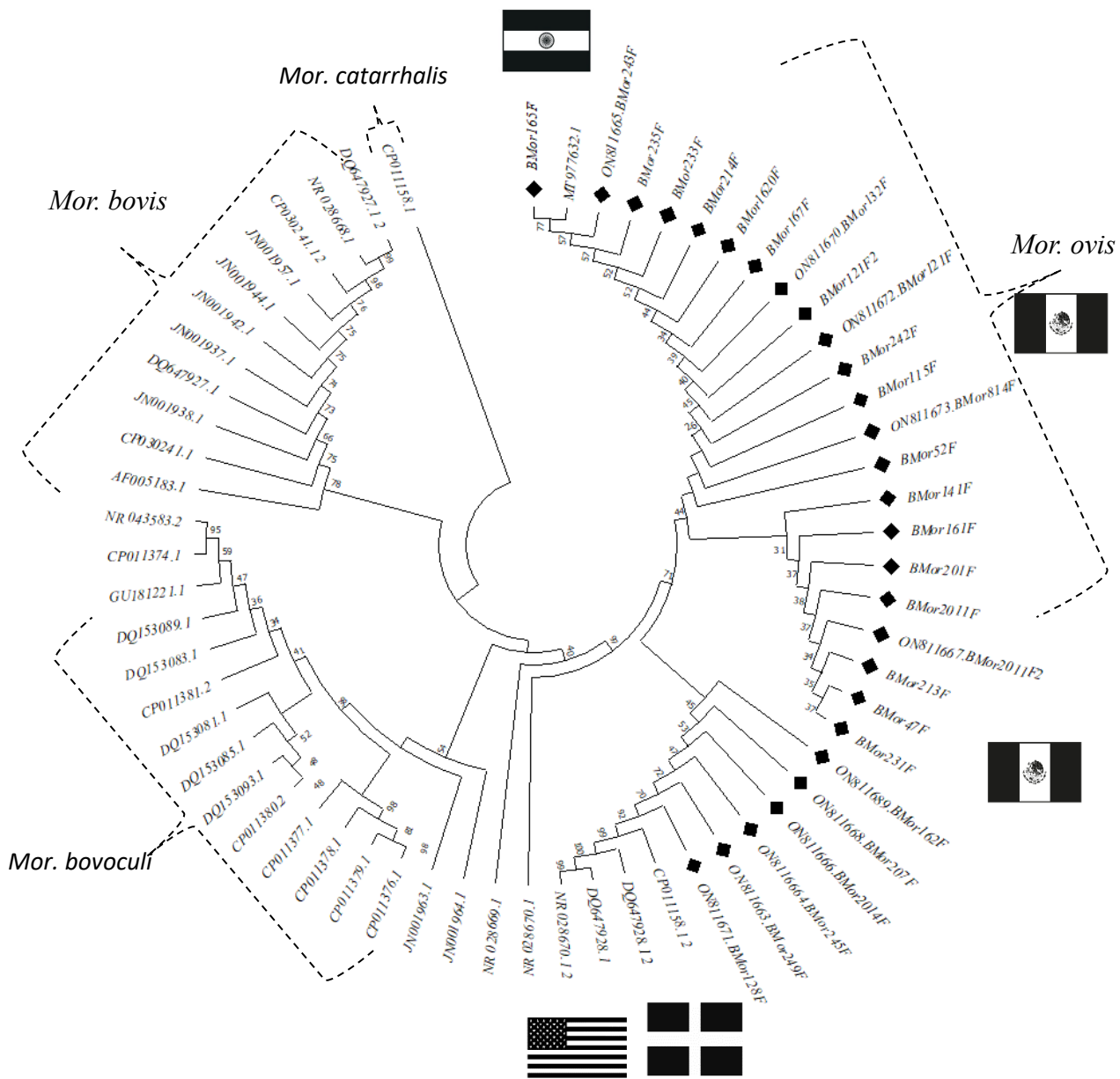






Figura 5. Árbol filogenético de *Moraxella* spp basado en la secuencia gen *16S rRNA* analizado por el método de Maximum Likelihood. El árbol de consenso bootstrap fue inferido de 1000 repeticiones se tomó para representar las relaciones filogenéticas con valores > 70% en las agrupaciones de las ramas. Se alinearon secuencias reportadas el GenBank para la agrupación de la rama principal de *Moraxella catarrhalis* (outgroup), Agrupación de la rama principal de *Moraxella bovoculi* Agrupación de la rama principal de *Moraxella bovis*, Agrupación de la rama principal de *Moraxella ovis* y (♦) las secuencias de este estudio fueron identificadas con etiquetas rombo y líneas de colores de las ramas secundarias y se etiqueta el origen de las secuencias Estados Unidos de América ; India ; Noruega ; y México .

En las secuencias reportadas por GenBank se observa similitud $\geq 96.46\%$ con nuestros aislamientos, el distanciamiento genómico entre los aislamientos fue inferior $\leq 2.84\%$, evidenciando que existe poca variabilidad genética entre los aislamientos mexicanos obtenidas de diferentes municipios del Estado de México y entre cepas de otros países (Figura 6 y 7).

	XON BMCR4- 2f(2985)	XON BMCR5- 2f(2986)	XON BMCR8- 14(22124)16f(2983)	XON BMCR11- 5f(2978)	ALM BMCR11- 5f(2978)	ALM BMCR12- 8(2984)	ALM BMCR12- 8(2984)	TEM BMCR13- 2f(2967)	TEM BMCR14- 1f(2963)	OCO BMCR16- 1f(2976)	OCO BMCR16- 2f(2987)	OCO BMCR16- 7(2982)	OCO BMCR16- 20f(2964)	TOL BMCR20- 1f(2977)	TOL BMCR20- 7f(2968)	TOL BMCR20- 11f(2973)11f(2969)	TOL BMCR20- 14f(2965)	V.CUA BMCR21- 4f(2981)	V.CUA BMCR21- 1f(2974)	IXT BMCR23- 3f(2972)	IXT BMCR23- 5f(2975)	IXT BMCR23- 6f(2960)	IXT BMCR24- 2f(2970)	IXT BMCR24- 3f(2979)	IXT BMCR24- 5f(2971)	IXT BMCR24- 9f(2971)			
MR03188	96.81	97.96	96.15	99.78	98.02	98.02	98.93	100	99.85	97.88	98.03	100	96.46	97.78	98.05	100	99.87	98.05	99.15	98.01	96.79	97.93	97.81	97.71	97.82	97.85	100	100	99.94
MR03189	96.81	97.96	96.15	99.78	98.02	98.02	98.93	100	99.85	97.88	98.03	100	96.46	97.78	98.05	100	99.87	98.05	99.15	98.01	96.79	97.93	97.81	97.71	97.82	97.85	100	100	99.94
MR03191	97.53	96.95	95.48	97.66	96.59	96.59	97.76	96.86	96.82	96.43	96.61	96.86	95.25	96.56	96.65	97.14	97.83	96.65	97.23	96.61	95.98	96.9	96.61	96.51	96.62	96.61	96.86	96.86	96.91
MR03192	96.7	96.49	94.92	97.2	96.15	96.15	97.33	96.43	96.21	95.95	96.11	96.43	94.81	96.11	96.22	96.68	97.32	96.22	96.76	96.21	95.52	96.44	96.17	96.08	96.18	96.24	96.45	96.45	96.41
MR03193	96.7	96.49	94.92	97.2	96.15	96.15	97.33	96.43	96.21	95.95	96.11	96.43	94.81	96.11	96.22	96.68	97.32	96.22	96.76	96.21	95.52	96.44	96.17	96.08	96.18	96.24	96.45	96.45	96.41
MR03194	96.7	96.49	94.91	97.2	96.15	96.15	97.33	96.43	96.21	95.95	96.11	96.43	94.81	96.11	96.22	96.68	97.32	96.22	96.76	96.21	95.52	96.44	96.17	96.08	96.18	96.24	96.45	96.45	96.41
MR03195	96.7	96.49	94.92	97.2	96.15	96.15	97.33	96.43	96.21	95.95	96.11	96.43	94.81	96.11	96.22	96.68	97.32	96.22	96.76	96.21	95.52	96.44	96.17	96.08	96.18	96.24	96.45	96.45	96.41
MR03196	97.43	96.83	95.34	97.54	96.48	96.48	97.65	96.76	96.67	96.31	96.5	96.75	95.14	96.44	96.54	97.02	97.71	96.54	97.11	96.54	95.87	96.79	96.5	96.41	96.51	96.56	96.71	96.71	96.8
MR03197	97.53	96.95	95.48	97.66	96.59	96.59	97.76	96.86	96.82	96.43	96.61	96.86	95.25	96.56	96.65	97.14	97.83	96.65	97.23	96.61	95.98	96.9	96.61	96.51	96.62	96.61	96.86	96.86	96.91
MR03198	99.69	95.36	94.49	96.76	95.15	95.15	96.38	96.32	95.61	94.98	95.19	96.32	93.81	95.11	95.24	96.68	97.58	95.24	96.18	95.24	94.72	95.75	95.15	95.1	95.2	95.21	96.34	96.34	96.24
MR03199	99.69	95.36	94.49	96.76	95.15	95.15	96.38	96.32	95.61	94.98	95.19	96.32	93.81	95.11	95.24	96.68	97.58	95.24	96.18	95.24	94.72	95.75	95.15	95.1	95.2	95.21	96.34	96.34	96.24
MR03200	99.69	95.36	94.49	96.76	95.15	95.15	96.38	96.32	95.61	94.98	95.19	96.32	93.81	95.11	95.24	96.68	97.58	95.24	96.18	95.24	94.72	95.75	95.15	95.1	95.2	95.21	96.34	96.34	96.24
MR03201	99.69	95.36	94.49	96.76	95.15	95.15	96.38	96.32	95.61	94.98	95.19	96.32	93.81	95.11	95.24	96.68	97.58	95.24	96.18	95.24	94.72	95.75	95.15	95.1	95.2	95.21	96.34	96.34	96.24
MR03202	97.43	96.83	95.34	97.54	96.48	96.48	97.65	96.76	96.67	96.31	96.5	96.75	95.14	96.44	96.54	97.02	97.71	96.54	97.11	96.54	95.87	96.79	96.5	96.41	96.51	96.56	96.71	96.71	96.8
MR03203	97.53	96.95	95.48	97.66	96.59	96.59	97.76	96.86	96.82	96.43	96.61	96.86	95.25	96.56	96.65	97.14	97.83	96.65	97.23	96.61	95.98	96.9	96.61	96.51	96.62	96.61	96.86	96.86	96.91
MR03204	97.43	96.83	95.34	97.54	96.48	96.48	97.65	96.76	96.67	96.31	96.5	96.75	95.14	96.44	96.54	97.02	97.71	96.54	97.11	96.54	95.87	96.79	96.5	96.41	96.51	96.56	96.71	96.71	96.8
MR03205	97.53	96.95	95.48	97.66	96.59	96.59	97.76	96.86	96.82	96.43	96.61	96.86	95.25	96.56	96.65	97.14	97.83	96.65	97.23	96.61	95.98	96.9	96.61	96.51	96.62	96.61	96.86	96.86	96.91
MR03206	97.33	96.72	95.2	97.43	96.37	96.37	97.55	96.65	96.52	96.21	96.39	96.65	95.03	96.33	96.43	96.91	97.58	96.43	96.95	96.41	95.75	96.67	96.35	96.3	96.4	96.41	96.66	96.66	96.61
MR03207	99.69	95.36	94.49	96.76	95.15	95.15	96.38	96.32	95.61	94.98	95.19	96.32	93.81	95.11	95.24	96.68	97.58	95.24	96.18	95.24	94.72	95.75	95.15	95.1	95.2	95.21	96.34	96.34	96.24
MR03208	99.69	95.36	94.49	96.76	95.15	95.15	96.38	96.32	95.61	94.98	95.19	96.32	93.81	95.11	95.24	96.68	97.58	95.24	96.18	95.24	94.72	95.75	95.15	95.1	95.2	95.21	96.34	96.34	96.24
MR03209	96.81	97.96	96.15	99.78	98.02	98.02	98.93	99.68	99.85	97.88	98.03	99.67	96.46	97.78	98.05	99.66	99.87	98.01	98.84	98.01	96.79	97.93	97.81	97.72	97.82	97.85	99.68	99.68	99.61
MR03210	96.81	97.96	96.15	99.78	98.02	98.02	98.93	99.68	99.85	97.88	98.03	100	96.46	97.78	98.05	100	99.87	98.05	99.15	98.01	96.79	97.93	97.81	97.71	97.82	97.85	100	100	99.94
MR03211	97.53	96.95	95.48	97.66	96.59	96.59	97.76	96.86	96.82	96.43	96.61	96.86	95.25	96.56	96.65	97.14	97.83	96.65	97.23	96.61	95.98	96.9	96.61	96.51	96.62	96.61	96.86	96.86	96.91
MR03212	99.59	95.36	94.49	96.65	95.04	95.04	96.27	96.22	95.45	94.87	95.08	96.21	93.7	95	95.14	96.68	97.58	95.14	96.18	95.14	94.72	95.75	95.08	94.99	95.09	95.16	96.23	96.23	96.11
MR03213	99.49	95.25	94.35	96.54	94.93	94.93	96.16	96.11	95.3	94.76	94.97	96.1	93.59	94.89	95.03	96.56	97.45	95.01	96.07	95.01	94.6	95.64	94.97	94.88	94.98	95.01	96.11	96.11	96.01
MR03214	99.59	95.36	94.49	96.65	95.04	95.04	96.27	96.22	95.45	94.87	95.08	96.21	93.7	95	95.14	96.68	97.58	95.14	96.18	95.14	94.72	95.75	95.08	94.99	95.09	95.16	96.24	96.24	96.11
MR03215	99.59	95.36	94.49	96.65	95.04	95.04	96.27	96.22	95.45	94.87	95.08	96.21	93.7	95	95.14	96.68	97.58	95.14	96.18	95.14	94.72	95.75	95.08	94.99	95.09	95.16	96.23	96.23	96.11
MR03216	97.64	97.06	95.62	97.77	96.7	96.7	97.87	96.97	96.97	96.54	96.72	96.97	95.36	96.67	96.76	97.25	97.96	96.76	97.34	96.76	96.1	97.01	96.71	96.62	96.73	96.77	96.96	96.96	97.01
MR03217	97.53	97.06	95.62	97.77	96.7	96.7	97.87	96.97	96.97	96.54	96.72	96.97	95.36	96.67	96.76	97.25	97.96	96.76	97.34	96.76	96.1	97.01	96.71	96.62	96.73	96.77	96.96	96.96	97.01
MR03218	96.66	97.83	95.95	99.78	97.88	97.88	99.25	99.23	100	97.75	97.9	99.23	97.22	98.09	97.92	99.15	99.49	97.91	98.55	97.91	97.56	97.79	98.11	98.02	98.13	98.15	99.24	99.24	99.11
MR03219	33.55	33.23	30.56	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.11	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23	33.23
MR03220	99.59	95.36	94.49	96.65	95.04	95.04	96.27	96.22	95.45	94.87	95.08	96.21	93.7	95	95.14	96.68	97.58	95.14	96.18	95.14	94.72	95.75	95.08	94.99	95.09	95.16	96.23	96.23	96.11
MR03221	96.39	97.17	95.9	97.76	96.92	96.92	97.33	96.65	97.12	96.77	96.94	96.65	94.7	96.67	96.97	96.91	98.09	96.97	96.07	96.91	95.52	97.24	96.71	96.62	96.73	96.71	96.66	96.66	96.61
MR03222	96.81	97.96	96.15	99.78	98.02	98.02	98.93	99.68	99.85	97.88	98.03	100	96.46	97.78	98.05	100	99.87	98.05	99.15	98.01	96.79	97.93	97.81	97.71	97.82	97.85	100	100	99.94
MR03223	96.81	97.96	96.15	99.78	98.02	98.02	98.93	99.68	99.85	97.88	98.03	100	96.46	97.78	98.05	100	99.87	98.05	99.15	98.01	96.79	97.93	97.81	97.71	97.82				

Factor de Virulencia *incA* en *Chlamydia*

Se realizó el alineamiento con una similitud 683 nt de las secuencias obtenidas del gen *incA* en *Chlamydia*, estas secuencias se agruparon en la rama principal y secundaria teniendo alto porcentaje de similitud de 98% con respecto a las secuencias GenBank de *C. pecorum* y de los aislados 100% de similitud con *C. abortus* de diferentes orígenes geográficos, las secuencias de este estudio se distanciaron de las secuencias del *incA* que se detectaron en aislamientos de *C. trachomatis*, *C. suis* y *C. psittaci* (Figura 8).

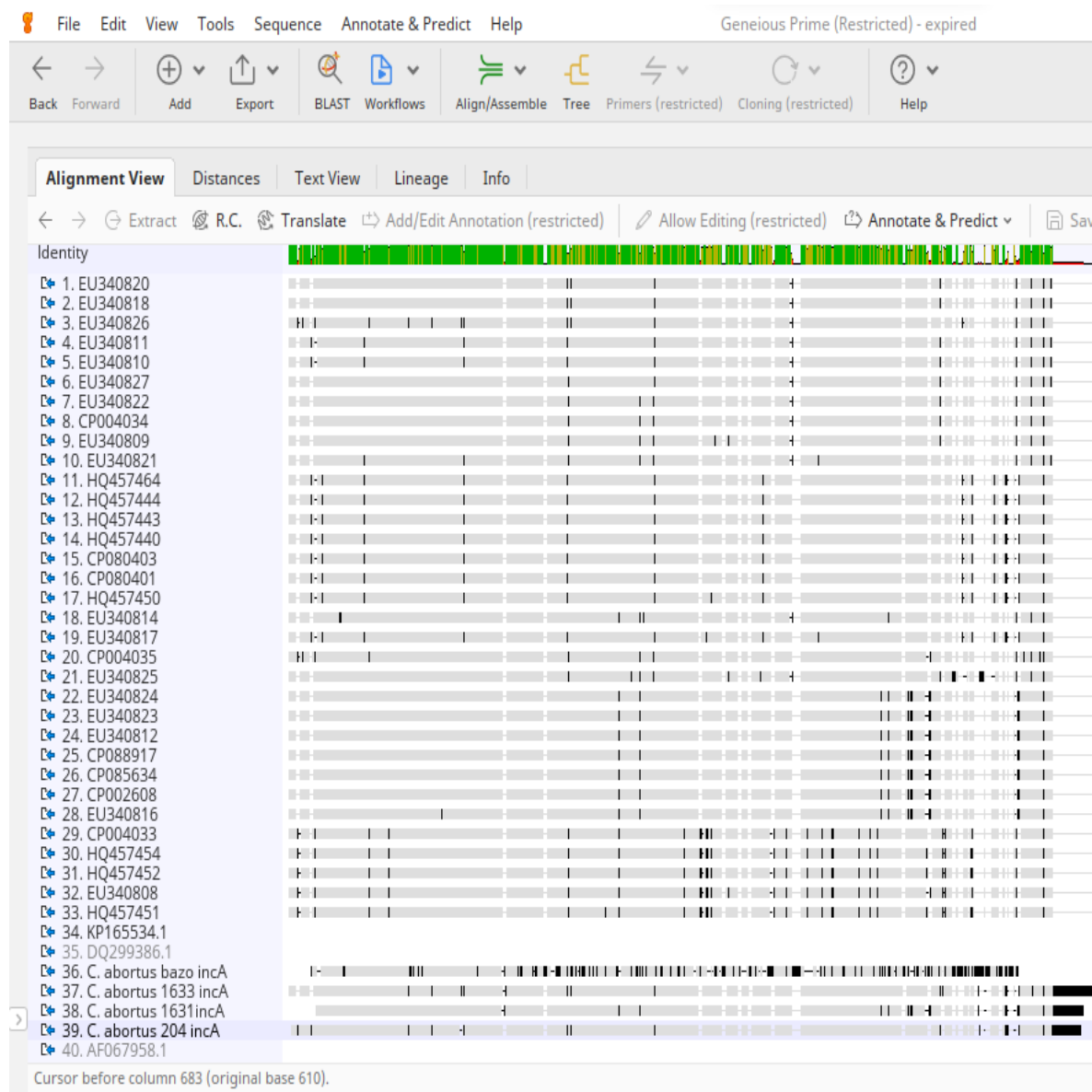


Figura 8. Alineamiento de secuencias del gen *incA* obtenidas de muestras positivas a *Chlamydia*

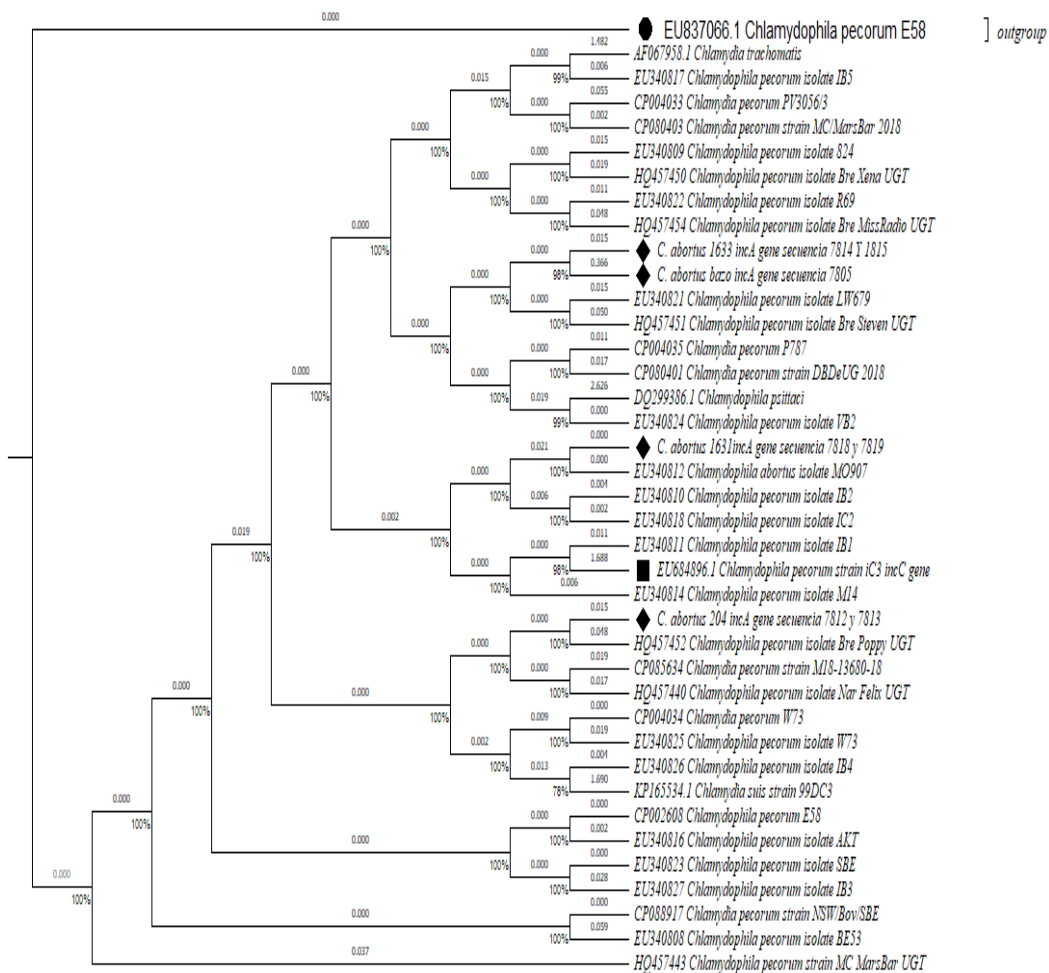


Figura 9. Árbol filogenético de *Chlamydia* spp basado en la secuencia gen *incA*.

El árbol de consenso bootstrap fue inferido de 1000 repeticiones mediante el método de Maximum Likelihood. El análisis de secuencia ancestral del gen *incA* se infirió con 39 secuencias de nucleótidos, la longitud de las secuencias analizadas para la reconstrucción filogenética se realizó con un total de 476 posiciones de nt en el conjunto de datos final. La etiqueta circular (*) designa la secuencia de *C. pecorum* cepa E58 como el supuesto ancestral *incA* que se asumió en la conexión de este grupo externo (Mohamad *et al.*, 2014). La etiqueta de diamante (◆) designa secuencias del gen *incA* obtenidas de tres muestras positivas de lesiones oculares por *Chlamydia* y el control positivo de *C. abortus* que se obtuvo del bazo de una oveja que abortó (De Jesús-Aldama, 2019). La etiqueta circular (■) designa la secuencia para la inclusión de la membrana proteica *incC* de *Chlamydia pecorum*.

VII.- DISCUSION

En este estudio se observó una prevalencia del 30.66% (280/913) de la IKC en el Estado de México, sin embargo, se ha observado que en brotes esporádicos la enfermedad puede alcanzar tasas mayores del 80% (Sağlam *et al.*, 2018). Esta prevalencia es inferior a lo reportado por (Dagnall, 1994a) donde encuentra una prevalencia de 72% (97/134) en ovinos con lesiones de oculares en el Reino Unido, la diferencia de la prevalencia se debe a los diferentes sistemas de producción y la forma de crianza de animales que tiene ambos países (Herrera *et al.*, 2019).

Las lesiones oculares que se identificaron con mayor frecuencia en casos IKC en ovinos fueron la conjuntivitis acompañado con secreciones mucopurulentas y de opacidad corneal, estos datos son similares a lo que reporta (Jelocnik *et al.*, 2019) donde ellos describen que las lesiones oculares más frecuentes son conjuntivitis acompañado con epífora y edema, esto reafirma a lo estipulado por Dagnall, (1994b), donde hace mención que los primeros cambios en la estructura del ojo se da un por un proceso inflamatorio en la conjuntiva y por el fallo de la película lagrimal (ojo seco).

En este estudio se detectó la presencia de *Mor. ovis* en las muestras de ovinos y caprinos con lesiones oculares, estos datos concuerdan con el estudio de Akertedt & Hofshagen, (2004), donde identifican de igual manera a *Mor. ovis* en ovejas con diferentes grados de lesiones en Noruega. Además, *Mor. ovis* se ha aislado en borrego de vida libre y cabras domésticas en Egipto Zaitoun *et al.* (2021) y en venados y alces de vida libre en Estados Unidos (Dubay *et al.*, 2000).

En este estudio no se logró identificar *Mor. bovoculi* ni *Mor. bovis* en las muestras clínicas de IKC en ovinos y caprinos, aunque se ha reportado la presencia de *Mor. bovis* en rebaños de cabras ubicados en la provincia de Abeokuta en Nigeria (Ojo *et al.*, 2009) y en la muestra de un ovino con lesiones oculares asociado a la IK en la India (Karthik *et al.*, 2017), por otro lado, para *Mor. bovoculi* se ha identificado de una muestra de hisopado conjuntival de un ovino en Brasil (Farias *et al.*, 2015), en hisopados oculares en renos (Tryland *et al.*, 2017) y también en las lesiones oculares asociadas a la IK en equinos (Seeger *et al.*, 2021).

La técnica de PCR tiene una alta sensibilidad para la identificación de los aislamientos de *Mor. ovis* mediante la amplificación del gen *16s rRNA*, se puede hipotetizar que el aislamiento que no amplificó de dicho gen puede estar relacionado con variaciones en el marco de lectura de la secuencia por deleciones o recombinación de nucleótidos dentro de la región no codificante del gen como fue descrito en algunas cepas de *Mor. bovoculi* (Dickey *et al.*, 2018).

En los últimos años se ha desarrollado un PCR multiplex en tiempo real para la detección de cinco patógenos asociados a la IK en bovinos. Esta técnica empleó fragmentos conservados de las secuencias de los cinco patógenos teniendo una sensibilidad para la detección de *Mycoplasma bovoculi* 88.8% (159/179), *Moraxella bovoculi* 75.9% (136/179), *Moraxella bovis* 60.3% (108/179), BHV-1 11.7% (21/179) y *Mycoplasma bovis* 10.0% (18/179) (Zheng *et al.*, 2019), este nuevo método la PCR tiempo real abre nuevas pautas para el desarrollo de técnicas diagnósticas en IK en bovino y en pequeños rumiantes.

En este estudio no se logró identificar ningún factor de virulencia asociado a los genes *plb*, *fur* y *mbxA* en los aislamientos de *Mor. ovis* obtenidos. Se ha descrito que el gen *plb* está presente en cepas de *Mor. bovis*, mientras el gen *fur*, ha sido detectado en cepas de *Mor. bovis* y *Mor. bovoculi* y además se ha determinado la secuencia parcial de este gen (Sosa *et al.*, 2015), mientras que, el gen *mxBA* se ha descrito en las tres especies de *Moraxella* de interés asociados a la IKC (Angelos *et al.*, 2007a; Sosa *et al.*, 2015), este gen se ha relacionado con el agravamiento de las lesiones oculares en rumiantes debido a la expresión de la hemolisina por las cepas de *Mor. ovis*, *Mor. bovis* y *Mor. bovoculi* (Angelos *et al.*, 2003; Cenry *et al.*, 2006).

La posible no identificación de los genes *plb*, *fur* y *mbxA* en los aislamientos de *Mor. ovis* puede estar debido al diseño de los iniciadores utilizados en este estudio, ya que estos fueron diseñados con la secuencia completa disponible de *Mor. bovis*, por lo cual es necesario diseñar iniciadores enfocados en las secuencias reportados en *Mor. ovis* para determinar si están o no presentes de estos factores de virulencia en esta bacteria.

El análisis de las secuencias del gen *16S rRNA* de *Mor. ovis* demostró que nuestros aislamientos tienen una alta similitud con cepas de referencia obtenidas de brotes de casos clínicos de queratoconjuntivitis infecciosa en bovinos y ovinos obtenidos de diferentes orígenes geográficos como Noruega, Estados Unidos e India (Angelos *et al.*, 2007b; Pettersson *et al.*, 1998). Se observó el distanciamiento génico que las secuencias obtenidas en este estudio fueron inferiores al 4.64%, con respecto con las cepas de otros países y entre las mismas secuencias de encontradas en diferentes orígenes de las localidades del Estado de México. El resultado del análisis de secuencias permitió diferenciar correctamente a *Mor. ovis* de *Mor. bovoculi*, lo cual algunos investigadores sugieren ambas bacterias son la misma especie. (Angelos 2010; O'Connor *et al.*, 2012)., mientras que para la diferenciación entre *Mor. ovis* y *Mor. bovis* existió una marcada diferencia en el distanciamiento genómico

Diversos investigadores asocian a *M. conjunctivae* como el agente primario de la IKC en pequeños rumiantes domésticos y salvajes en todo el mundo debido a que causa alta morbilidades y afecta a todos los grupos de edades y ocasiona signos clínicos graves (Giacometti *et al.*, 2002; Fernández-Aguilar *et al.*, 2017), además de la persistencia de sobrevivencia de *M. conjunctivae* en los ojos de los animales sin ocasionar signos clínicos (Janovsky *et al.*, 2001; Giacometti *et al.*, 1998).

En este estudio no se logró identificar a *Mycoplasma conjunctivae*, esto puede deberse a que el cultivo de la bacteria es difícil, lento y de baja sensibilidad, además los factores que intervienen para la conservación y transporte para la toma de muestra influyen en la viabilidad del crecimiento del patógeno (Meseguer-Peinado *et al.*, 2012). Se ha observado que cuando existe un retraso en el tiempo de llegada de la muestra al laboratorio, estas deben conservarse a -70°C y almacenarse a -20°C ., aunque esto puede generar pérdidas en la viabilidad de la muestra (Acosta *et al.*, 2011), en nuestro estudio se tuvo complicaciones en el tiempo de transporte y conservación de las muestras debido a restricciones y políticas al momento del estudio.

Sin embargo, cuando se ha identificado la presencia de *Mycoplasma conjunctivae* en las muestras clínicas estas pueden tener un sinergismo con otros patógenos como *Chlamydia* (*C. abortus* y *C. psittaci*) y de agentes virales (Gupta *et al.*, 2014; McAuliffe *et al.* 2003). y

ocasionar agravaciones en las lesiones oculares en los animales afectados (Arnal *et al.*, 2013; Fernández-Aguilar *et al.*, 2013).

En el estudio realizado por Sağlam *et al.*, (2018), identificaron a *M. conjunctivae* y *M. ovis* en el 7.14% de las muestras recolectadas de ovinos con IKC en Turquía, sin embargo, en este estudio se encontró con mayor porcentaje la presencia de *M. conjunctivae* asociándolo como el principal agente etiológico a la IKC], en el estudio se encontró a *Mor ovis* y *C. abortus* en la misma proporción siendo estos dos patógenos como los agentes implicados a la IKC.

Debido al número de muestras, a las limitaciones financieras y tiempo del estudio se optó utilizar la técnica de PCR tiempo real para la identificación de las especies de *Chlamydia* en este estudio, debido a que es una técnica rápida y que permite procesar múltiples muestras en comparación con el aislamiento por cultivo celular que es una técnica lenta y relativamente costosa (Alonso *et al.*, 2012).

Se demostró en este estudio la presencia de *C. abortus* y *C. pecorum* de muestras de IKC en pequeños rumiantes estos datos concuerdan con lo reportado por Holzwarth *et al.* (2011) donde identifican estas dos especies de *Chlamydia* en un solo ojo de un animal y también asociado con *C. psittaci* (Jones 1991).

Este hallazgo concuerda con lo que reporta Jelocnik *et al.*, (2019) donde encuentran la presencia de *C. pecorum* en ovinos con lesiones oculares en Australia, y con el estudio de Gupta *et al.*, (2014) evidenciando la presencia de *C. abortus* en muestras clínicas de ovinos, caprinos y bovinos con IK, además ambos estudios identificaron la presencia de *Chlamydia psittaci* (Gupta *et al.*, 2014; Jelocnik *et al.*, 2019), sin embargo, en este estudio no se logró identificar a *C. psittaci*.

En México ya se tiene evidencia de la presencia de *C. pecorum*, *C. psittaci* y *C. abortus* en rebaños de ovinos y caprinos asociados a enfermedades reproductivas (Escalante *et al.*, 1997; Limón-González *et al.*, 2022; Mora-Díaz *et al.*, 2015).

En las muestras positivas a *Chlamydia* obtenidas en este estudio no se logró encontrar el gen *pmpH*, este gen solo se ha detectar en cepas de *C. trachomatis* y *C. psittaci*, se ha observado que estas cepas cuando expresan las *pmps* tiene una función de adhesión a las células del hospedero (Mygind *et al.*, 2000). Se ha hipotetizado que cuando existen variaciones en las

expresiones del gen *pmp* esto puede generar fenotipos diferentes de las proteínas que contribuyan a la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Lent *et al.*, 2019)

En este estudio se evidenció la presencia del gen *incA* en *C. abortus*, este resultado nos ayuda a entender sobre la patogénesis microbiana de *Chlamydia* en el desarrollo de la IKC en los pequeños rumiantes, ya que se ha observado que los aislamientos que no expresan dicho gen forman inclusiones no fusogénicas lo cual se relacionan con infecciones menos severas (Suchland *et al.*, 2008).

El gen *incA* se ha identificado con mayor frecuencia en *C. pecorum* y *C. trachomatis* (Bannantine *et al.*, 1998; Mohamad *et al.*, 2014) y en algunas cepas de *C. suis*, *C. psittaci* y *C. abortus* (Beeckman *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2015; Yousef Mohamad *et al.*, 2008), este gen ha teniendo variaciones en su secuencia lo cual hace que algunas especies de *Chlamydias* sean más virulentas que otras y estas variaciones surgieron a partir de la secuencia del ancestro común de la cepa *C. pecorum* E58 (Mohamad *et al.*, 2014)

El análisis de secuencias del gen *incA* demostró una alta similitud con *C. pecorum* y *C. abortus*, reportadas en el Gen Bank y se demostró un distanciamiento genómico del 1.4, 1,6 y 2.6% con las secuencias de *C. trachomatis*, *C. suis* y *C. psittaci* respectivamente la cual se agrupan en diferentes ramas

Las tres secuencias obtenidas en este estudio del gen *incA* tuvieron un distanciamiento genómico menor de 0.01% con respecto al ancestro común con la cepa de *C. pecorum* E58, sin embargo, la muestra control de *C. abortus* identificada del bazo de una oveja con aborto tuvo un distanciamiento genómico de 0.36%, esto podría deberse a que solo se tenía la secuencia parcial obtenida de los cebadores *incA*-F. Este resultado demuestra que *Chlamydia* utiliza el mismo factor de virulencia tanto en enfermedades reproductivas como oculares.

VIII.- CONCLUSION GENERAL

Este trabajo determinó la presencia de *Mor. ovis*, *C. abortus* y *C. pecorum* en casos clínicos de IKC en pequeños rumiantes, sin embargo, no se logró detectar la presencia de *Mycoplasma* spp. Únicamente se detectó el factor de virulencia asociado al gen *incA* en cinco muestras positivas a *C. abortus*. El análisis filogenético del gen *incA* reveló que tiene una alta similitud con el mismo factor de virulencia encontrado en *C. pecorum* y *C. abortus* detectados en diferentes hospederos y orígenes geográficos.

El análisis filogenético basado en el *16S rRNA* para los aislamientos de *Mor. ovis* mostraron altas similitudes con los aislamientos de otros orígenes geográficos. Estos nuevos conocimientos pueden contribuir al desarrollo de estrategias enfocadas a la prevención y control de IKC que tiene un alto impacto económico en la ovinocultura y caprinocultura mexicana. La relación existente entre la presencia de *C. abortus* en lesiones oculares con la presencia de aborto no está totalmente esclarecida, ni tampoco el riesgo zoonótico que implica su presencia en dichas lesiones.

IX. SUGERENCIAS.

- I. Desarrollar nuevas técnicas diagnósticas (PCR y/o ELISAS) para la detección de los múltiples patógenos asociados IKC.
- II. Diseñar nuevos iniciadores específicos para la detección de diversos factores de virulencia asociado a los patógenos asociados IKC.
- III. Desarrollo planes de prevención y control para la prevención IKC en pequeños rumiantes.

X.-REFERENCIAS.

Acosta B.A., Codina, G.M.G., Matas, A.L & Meseguer, P.M.A (2011) Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp y *Ureplasma* spp. EIMC Procedimientos en Microbiología Clínica. 1-53.

Akerstedt, J. & Hofshagen, M. (2004). Bacteriological investigation of infectious keratoconjunctivitis in Norwegian sheep. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(1–2), 19–26. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-45-19>

Akwuobu, C. A., Chah, K. F., Oboegbulem, S. I., & Rabo, J. S. (2016). Pathogenicity of local isolates of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in experimental West African Dwarf goats. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3(3), 242–251. <https://doi.org/http://doi.org/10.5455/javar.2016.c161>

Ammar, A.M., Eissa, S.I., El-Hamid, M.I.A., Ahmed, H.A. & El-Aziz, A.E.E. (2008). Advanced study on Mycoplasmas isolated from sheep. *Zagazif Veterinary Journal*, 36: 128-137.

Amores, J., Corrales J.C., Martín, A. G., Contreras, A., & de la Fe, C. (2010). Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides subsp. capri* in ear swabs taken from goats. *Veterinary Microbiology*, 140(1–2), 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.036>

Angelos, J. A. (2010). *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis : cause or coincidence? *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.002>

Angelos, J. A., & Ball, L. M. (2007). Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(5), 532–534. <https://doi.org/10.1177/104063870701900511>

Angelos, J. A., Ball, L. M., & Hess, J. F. (2007a). Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology*, 125(1–2), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.009>

Angelos, J. A., Hess, J. F., & George, L. W. (2001). Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *American Journal of Veterinary Research*, 62(8), 1222–1228. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1222>

Angelos, J. A., Spinks, P. Q., Ball, L. M., & George, L. W. (2007b). *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 789–795. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64333-0>

Annuar, B. O., & Wilcox, G. E. (1985). Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. *Research in Veterinary Science*, 39(2), 241–246.

Anzalone, L. (2020). *Chlamydias, mycoplasmas y rickettsias*. 1–9. <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 16.pdf>

Arnal, M.C., Herrero, J., de la Fe, C., Revilla, M., Prada, C., Martínez-Durán, D., Gómez-Martín, Á., Fernández-Arberas, O., Amores, J., Contreras, A., García-Serrano, A., & de Luco, D.F. (2013). Dynamics of an Infectious Keratoconjunctivitis Outbreak by *Mycoplasma conjunctivae* on Pyrenean Chamois *Rupicapra p. pyrenaica*. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061887>.

Awan, M.A., Abbas, F., Yasinzai, M., Nicholas, R. A. J., Babar, S., Ayling, R. D., Attique, M. A., & Ahmed, Z. (2009). Prevalence of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens* in goats in pishin district of Balochistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 29(4), 179–185.

Awan, Mohammad Arif, Abbas, F., Zai, Yassin, M., Tariq, M. M., Bajwa, M. A., Attique, M. A., Ahmed, Z., Rashid, N., Rafiq, M., & Shafee, M. (2012). Prevalence of *Mycoplasma* species by Polymerase Chain Reaction (PCR) directly from the nasal swab samples of goats. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 10(1), 5–12.

- Baker, S, Bashiruddin, J. B., Ayling, R. D., & Nicholas R.A. (2001). Molecular detection of *Mycoplasma conjunctivae* in English sheep affected by infectious keratoconjunctivitis. *The Veterinary Record*, 148(8), 240–241. <https://doi.org/doi: 10.1136/vr.148.8.240>
- Bannantine, J. P., Stamm, W. E., Suchland, R. J., & Rockey, D. D. (1998). *Chlamydia trachomatis* InCA is localized to the inclusion membrane and is recognized by antisera from infected humans and primates. *Infection and immunity*, 66(12), 6017–6021. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.12.6017-6021.1998>
- Barile, M. F., Del Giudice, R. A., & Tully, J. G. (1972). Isolation and characterization of *Mycoplasma conjunctivae* sp. n. from sheep and goats with keratoconjunctivitis. *Infection and immunity*, 5(1), 70–76. <https://doi.org/10.1128/iai.5.1.70-76.1972>
- Becker, E., & Hegemann, J. H. (2014). All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 544–556. <https://doi.org/10.1002/mbo3.186>
- Beeckman, D. S., Geens, T., Timmermans, J. P., Van Oostveldt, P., & Vanrompay, D. C. (2008). Identification and characterization of a type III secretion system in *Chlamydophila psittaci*. *Veterinary research*, 39(3), 27. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008002>
- Belloy, L., Giacometti, M., Abdo, E., Jacques, N., Krawinkler, M., Janovsky, M., Brudererd, U., & Frey, J. (2001). Detection of specific *Mycoplasma conjunctivae* antibodies in the sera of sheep with infectious keratoconjunctivitis. *Veterinary Research*, 32(2), 155–164. <https://doi.org/doi.org/10.1051/vetres:2001118>
- Belloy, L., Janovsky, M., Vilei, E. M., Pilo, P., Giacometti, M., & Frey, J. (2003a). Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: Transmission across species in natural outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1913–1919. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1913-1919.2003>
- Belloy, L., Vilei, E. M., Giacometti, M., & Frey, J. (2003b). Characterization of LppS , an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. *Microbiology*, 149(1), 185–193. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25864-0>

Bergonier, D., Berthelot, X., & Poumarat, F. (1997). Contagious agalactia of small ruminants: Current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 16(3), 848–873. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20506/rst.16.3.1062>

Billson, F. M., Harbour, C., Michalski, W. P., Tennent, J., Egerton, J. R., & Hodgson, J. L. (2000). Characterization of Hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. 68(6), 3469–3474.

Billson, F. M., Hodgson, J. L., Egerton, J. R., Lepper, A. W. D., Michalski, W. P., Schwartzkoff, C. L., Lehrbach, P. R., & Tennent, J. M. (1994). A haemolytic cell-free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *FEMS Microbiology Letters*, 124(1), 69–74. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb07263.x>

Bishop, B., Shurig, G.G. & Troutt, H.F. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of anti-*Moraxella bovis* antibodies. *American Journal of Veterinary Research*, 43(8), 1443–1445.

Boguslavsky, S., Menaker, D., Lysnyansky, I., Liu, T., Levisohn, S., Rosengarten, R., Garcia, M., & Yogev, D. (2000). Molecular Characterization of the *Mycoplasma gallisepticum pvpA* Gene Which Encodes a Putative Variable Cytadhesin Protein. *Infection and Immunity*, 68(7), 3956–3964. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.68.7.3956-3964.2000>

Bommana, S., & Polkinghorne, A. (2019). Mini review: Antimicrobial control of chlamydial infections in animals: Current practices and issues. *Frontiers in Microbiology*, 10(113), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00113>

Borel, N., Polkinghorne, A., & Pospischil, A. (2018). A Review on Chlamydial diseases in animals: still a challenge for pathologists? *Veterinary Pathology*, 55(3), 374–390. <https://doi.org/10.1177/0300985817751218>

Brightman, A.H., Wachsstock, R.S. & Erskine, R. (1991). Lysozyme concentrations in the tears of cattle, goats, and sheep. *American Journal of Veterinary Research*;52(1),9–11.

Brown, D.R., May M., Bradbury, J.M Balish M.F., Calcutt M.J, Glass J.I, Tasker S., Messick J.B., Johansson K.E. and Neimark H (2018). Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 1st ed. New York: Wiley <https://doi.org/10.1002/9781118960608>

Brown, M. H., Brightman, A. H., Fenwick, B. W., & Rider, M. A. (1998). Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(4), 259–266. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb02120.x>

Burnard, D., & Polkinghorne, A. (2016). Chlamydial infections in wildlife—conservation threats and/or reservoirs of ‘spill-over’ infections? *Veterinary Microbiology*, 196, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.018>

Capmany, A., & Damiani, M. T. (2010). *Chlamydia trachomatis* intercepts golgi-derived sphingolipids through a rab14-mediated transport required for bacterial development and replication. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014084>

Carabeo, R. A., Grieshaber, S. S., Fischer, E., & Hackstadt, T. (2002). *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infection and Immunity*, 70(7), 3793–3803. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3793-3803.2002>

Cárdenas-Perea, M. E., Cruz-Lopez, O. R., Gándara-Ramírez, J. L., & Pérez-Hernández, M. A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, 94, 35–43.

Chandler, R. L., Bird, R. G., Smith, M. D., Anger, H. S., & Turfrey, B. A. (1983). Scanning electron microscope studies on preparations of bovine cornea exposed to *Moraxella bovis*. *Journal of Comparative Pathology*, 93(1), 1–8. [https://doi.org/doi:10.1016/0021-9975\(83\)90038-5](https://doi.org/doi:10.1016/0021-9975(83)90038-5)

Chen, Y., Wu, Y., Qin, L., Zhu, C., & You, X. (2021) Infection strategies of *Mycoplasmas*: Unraveling the panoply of virulence factors, *Virulence*, 12(1), 788-817, DOI: 10.1080/21505594.2021.1889813

Clifton, D. R., Fields, K. A., Grieshaber, S. S., Dooley, C. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Carabeo, R. A., & Hackstadt, T. (2004). A chlamydial type III translocated protein is

tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(27), 10166–10171. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0402829101>

Cochrane, M., Walker, P., Gibbs, H., & Timms, P. (2005). Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. *Microbiology*, 151(7), 2285–2290. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27781-0>

Conceição, F. R., Dellagostin, O. A., Paolichi, F., Leturia, A. C., & Gil, T.C. (2004). Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. *Veterinary Journal*, 167(1), 53–58. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00084-4)

Cooper, B. S. (1974). Transmission of a *Chlamydia*-like agent isolated from contagious conjunctivo-keratitis of sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 22(10), 181–184. <https://doi.org/10.1080/00480169.1974.34162>

Corrales, J. C., Esnal, A., De la Fe, C., Sánchez, A., Assunção, P., Poveda, J. B., & Contreras, A. (2007). Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.010>

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

Crane, D. D., Carlson, J. H., Fischer, E. R., Bavoil, P., Hsia, R., Tan, C., Kuo, C., & Caldwell, H. D. (2006). *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1894–1899. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0508983103>

Dagnall, G. J. R. (1994a). An investigation of colonization of the conjunctival sac of sheep by bacteria and mycoplasmas. *Epidemiology and Infection*, 112(3), 561–567. <https://doi.org/10.1017/S0950268800051268>

Dagnall, G. J. R. (1994b). The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. *British Veterinary Journal*, *150*(1), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80097-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80097-1)

De la Fe, C., Amores, J., Tardy, F., Sagne, E., Nouvel, L., & Citti, C. (2012). Unexpected genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. *BMC Veterinary Research*, *8*(146), 146.

De Puyseleer, K., De Puyseleer, L., Dhondt, H., Geens, T., Braeckman, L., Morré, S. A., Cox, E., & Vanrompay, D. (2014). Evaluation of the presence and zoonotic transmission of *Chlamydia suis* in a pig slaughterhouse. *BMC Infectious Diseases*, *14*(560), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0560-x>

Damiani MT, Gambarte Tudela J, Capmany A. (2014) Targeting eukary-otic Rab proteins: a smart strategy for chlamydial survival and replication. *Cellular Microbiology*, *16*:1329–1338.

Degiorgis, M.-P., Abdo, E.-M., Nicolet, J., Frey, J., Mayer, D., & Giacometti, M. (2000). Immune Responses To *Mycoplasma Conjunctivae* in Alpine Ibex, Alpine Chamois, and Domestic Sheep in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases*, *36*(2), 265–271. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.2.265>

De Jesus-Aldama, F. (2019). Aislamiento e Identificación Molecular de Chlamydia abortus en Ovinos del Estado De México [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de México. Repositorio institucional – Universidad Autónoma del Estado de México

Di Francesco, Antonietta, Baldelli, R., Donati, M., Cotti, C., Bassi, P., & Delogu, M. (2013). Evidence for Chlamydiaceae and Parachlamydiaceae in a wild boar (*Sus scrofa*) population in Italy. *Veterinaria Italiana*, *49*(1), 119–122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564593>

Dickey, A.M., Schuller, G., Loy, J.D., & Clawson, M.L. (2018). Whole genome sequencing of *Moraxella bovoculi* reveals high genetic diversity and evidence for interspecies recombination at multiple loci. *PLoS ONE*, *13*(12), e0209113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209113>

- Dubay, S. A., Williams, E. S., Mills, K., & Boerger-Fields, A. M. (2000). Association of *Moraxella ovis* with keratoconjunctivitis in mule deer and moose in Wyoming. *Journal of wildlife diseases*, 36(2), 241–247. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.2.241>
- Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H., & Sachse, K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Molecular and Cellular Probes*, 20(1), 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
- Eichenbaum, J.D., Lavach, J.D., Severin, G.A. & Paulsen, M.E. (1996). Immunology of ocular surface. In: Ophthalmology in small animal practice. The compendium collection. NJ: Veterinary Learning Systems;. p. 99–106
- Eissenberg LG, Wyrick PB, Davis CH, Rump JW. (1983). *Chlamydia psittaci* elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infection and Immunity* 40:741–751.
- Elad, D., Yeruham, I., & Bernstein, M. (1988). *Moraxella ovis* in cases of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 35(1–10), 431–434. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00516.x>
- Elshafay D.Y., Nermin, A., Yasser, F.E. and Emad, E.Y.(2016) Isolation and Molecular Characterization of *Mycoplasma arginini* Isolated from Sheep and Goats with Respiratory Manifestation in Dakahilia Governorate.3rd Conference of the Scientific Research Institute of AnimalSociety. Vol. 3. Modern Trends Health for the Advancementof Animal Health, Egypt, Giza.
- Ely, V. L., Vargas, A. ., Costa, M. M., Oliveira, H. P., Pötter, L., Reghelin, M. ., Fernandes, A. W., Pereira, D. I. B., Sangioni, L. A., & Botton, S. A. (2019). *Moraxella bovis* , *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi* : Biofilm formation and lysozyme activity. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 369–376. <https://doi.org/10.1111/jam.14086>
- Engel J. (2004). Tarp and Arp: How *Chlamydia* induces its own entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 9947–9948. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403633101>

- English, R.V.(1999). Immune responses and the eye. In: Gelatt KN, editor. *Veterinary ophthalmology*. 3rd ed. Baltimore: Lipincott Williams & Wilkins, 239–58
- Escalante O.C., Diaz A.E., Segundo-Zaragoza C., & Suarez G.F. (1997). Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: first report. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 39(3-4), 117-122.
- Essig, A., & Longbottom, D. (2015). Chlamydia abortus: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(1), 22–34. <https://doi.org/10.1007/s40588-015-0014-2>
- Evans, A. L., Bey, R. F., Schoster, J. V., Gaarder, J. E., & Finstad, G. L. (2008). Preliminary studies on the etiology of keratoconjunctivitis in Reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) calves in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(4), 1051–1055. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.4.1051>
- Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G. A., Nance, D. M., Greenberg, A. H., & Zhong, G. (1998). Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *The Journal of experimental medicine*, 187(4), 487–496. <https://doi.org/10.1084/jem.187.4.487>
- Farias, L. D. A., Maboni, G., Matter, L. B., Scherer, C. F. C., Libardoni, F., & de Vargas, A. C. (2015). Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of *rtxA* gene from geographically diverse strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology*, 178(3–4), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.05.025>
- Farn, J. L., Strugnell, R. A., Hoyne, P. A., Michalski, W. P., & Tennent, J. M. (2001). Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6717–6720. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6717>
- Fenwick, B., Rider, M., Liang, J., & Brightman, A. (1996). Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. *Veterinary Microbiology*, 48(3–4), 315–324. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00155-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00155-7)

Fernández-Aguilar, X., Cabezón, Ó., Marco, I., Mentaberre, G., Frey, J., Lavín, S., & López-Olvera, J. R. (2013). *Mycoplasma conjunctivae* in domestic small ruminants from high mountain habitats in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 9(253), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-253>

Fernandez-Aguilar, X., López-Olvera, J. R., Puig-Ribas, M., Begoeva, M., Velarde, R., Cardells, J., & Cabezón, O. (2019). *Mycoplasma conjunctivae* in insect vectors and anatomic locations related to transmission and persistence. *Veterinary Microbiology*, 228(May 2018), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.11.004>

Fernández-Aguilar, X., Rossi, L., Cabezón, Ó., Giorgino, A., Llopis, I. V., Frey, J., & López-Olvera, J. R. (2017). Infectious keratoconjunctivitis and occurrence of *Mycoplasma conjunctivae* and Chlamydiaceae in small domestic ruminants from Central Karakoram, Pakistan. *Veterinary Record*, 181(9), 237. <https://doi.org/10.1136/vr.103948>

Frank S. K., & Gerber, J. A. Y. D. (1981). Hydrolytic Enzymes of *Moraxella bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(2), 269–271.

Gerber, A., Thoma, R., Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, C., Doherr, M. G., Zimmermann, D. R., Polkinghorne, A., Pospischil, A., & Borel, N. (2007). Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period. *BMC Veterinary Research*, 3(24), 1–8. <https://doi.org/doi:10.1186/1746-6148-3-24>

Giacometti, M., Janovsky, M., Belloy, L., & Frey, J. (2002). Infectious keratoconjunctivitis of ibex, chamois and other caprinae. *Revue Scientifique et Technique*, 21(2), 335–345. <https://doi.org/10.20506/rst.21.2.1338>

Giacometti, M., Nicolet, J., Johansson, K.-E., Naglic, T., Degiorgis, M. P., & Frey, J. (1999). Detection and Identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR Based on the 16S rRNA. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine Series B*, 46(3), 173–180.

Giangaspero, M., Orusa, R., Nicholas, R. A. J., Harasawa, R., Ayling, R. D., Churchward, C. P., Whatmore, A., Bradley, D., Robetto, S., Sacchi, L., & Domenis, L. (2010). Characterization of *Mycoplasma* isolated from an Ibex (*Capra Ibex*) suffering from

keratoconjunctivitis in northern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4), 1070–1078. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.4.1070>

Gilger, B. C. (2008). Immunology of the Ocular Surface. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 38(2), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.11.004>

Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J. & Rogers, D.G. (1995). Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin, *Veterinary Microbiology*; 43, 183–196. [doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00084-A](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00084-A)

Greene, W., Xiao, Y., Huang, Y., McClarty, G., & Zhong, G. (2004). *Chlamydia*-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis. *Infection and immunity*, 72(1), 451–460. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.451-460.2004>

Gomez-Martin, A., De la Fe, C., Amores, J., Sánchez, A., Contreras, A., Paterna, A., Buendía, A. J., & Corrales, J. C. (2012). Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers. *Veterinary Microbiology*, 157(3–4), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.004>

González-Candela, M., Verbisck-Bucker, G., Martin-Atance, P., Cubero-Pablo, M. J., & León-Vizcaino, L. (2007). Mycoplasmas isolated from Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*): frequency and risk factors. *The Veterinary Record*, 161(5), 167–168. <https://doi.org/doi:10.1136/vr.161.5.167>

Gould S., Dewell, R., Tofflemire, K., Whitley, R. D., Millman, S. T., Opriessnig, T., Rosenbusch, R., Trujillo, J., & O'Connor, A. M. (2013). Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis in dairy calves. *Veterinary Microbiology*, 164(1–2), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.038>

Gressler, L. T., de Vargas, A. C., da Costa, M. M., Sutili, F. J., Schwab, M., Pereira, D. I. B., Sangioni, L. A., & Botton, S. de A. (2015). Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(10), 835–841. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2015001000003>

- Grimwood, J., Olinger, L., & Stephens, R. S. (2001). Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infection and immunity*, 69(4), 2383–2389. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2383-2389.2001>
- Gupta, S., Chahota, R., Bhardwaj, B., Malik, P., Verma, S., & Sharma, M. (2014). Identification of Chlamydiae and *Mycoplasma* species in ruminants with ocular infections. *Letter in Applied Microbiology*, 60(2), 135–139. <https://doi.org/10.1111/lam.12362>
- Hartley, J. C., Kaye, S., Stevenson, S., Bennett, J., & Ridgway, G. (2001). PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3072–3079. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3072-3079.2001>
- Herrera, Y., Perdomo, S., & Cardona, J. (2015). Psitacosis y salmonelosis: zoonosis que involucran a las aves. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 7(1), 100-108.
- Henderson, I. R., & Lam, A. C. (2001). Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp. – autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends in Microbiology*, 9(12), 573–578. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02234-X](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02234-X)
- Hess J. F., & Angelos, J. A. (2006). The *Moraxella bovis* RTX toxin locus mbx defines a pathogenicity island. *Journal of Medical Microbiology*, 55(4), 443–449. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46366-0>
- Herrera Haro, J. G., Álvarez Fuentes, G., Bárcena Gama, R., & Núñez Aramburu, J. M. (2019). Caracterización de los rebaños ovinos en el sur de Ciudad de México, México. *Acta universitaria*, 29.
- Hogan, R. J., Mathews, S. A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J. T., & Timms, P. (2004). Chlamydial Persistence :beyond the Biphasic Paradigm. *Infection and Immunity*, 72(4), 1843–1855. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.1843>
- Højby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Holzwarth, N., Pospischil, A., Mavrot, F., Vilei, E. M., Hilbe, M., Zlinszky, K., Regenscheit, N., Pewsner, M., Thoma, R., & Borel, N. (2011). Occurrence of Chlamydiaceae,

Mycoplasma conjunctivae, and pestiviruses in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) of Grisons, Switzerland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(2), 333–337. <https://doi.org/10.1177/104063871102300223>

Hosie, B.D. (2000). Ocular diseases. In Martin WB, Aitken ID (eds): Diseases of Sheep, ed 3. Oxford, Blackwell Science, pp 301-305

Hu, P. C., Cole, R. M., Huang, Y. S., Graham, J. A., Gardner, D. E., Collier, A. M., & Clyde, W. J. (1982). *Mycoplasma pneumoniae* infection: Role of a surface protein in the attachment organelle. *Science*, 1387(1978), 1980–1982. <https://doi.org/doi:10.1126/science.6801766>

Hybiske, K., & Stephens, R. S. (2007). Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infection and immunity*, 75(8), 3925–3934. <https://doi.org/10.1128/IAI.00106-07>

Inglis, D.M., Bowie, J.M., Allan., M.J. & Nettleton, P. F. (1983). Ocular disease in red deer calves associated with a herpes virus infection. *Veterinary Record*, 113(8):182-183. [doi:10.1136/vr.113.8.182](https://doi.org/10.1136/vr.113.8.182)

Jan G., Fontenelle, C., Verrier, F., He, M. Le, & Wroblewski, H. (1996). Selective acylation of plasma membrane proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp . *mycoides* SC , the Contagious Bovine Pleuropneumonia agent. *Current Microbiology*, 32(1), 38–42. <https://doi.org/doi:10.1007/s002849900007>

Janovsky, M., Frey, J., Nicolet, J., Belloy, L., Goldschmidt-Clermont, E., & Giacometti, M. (2001). *Mycoplasma conjunctivae* infection is self-maintained in the Swiss domestic sheep population. *Veterinary Microbiology*, 83(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00407-2)

Jaramillo A.C. J. & Martinez M.J.J. (2009). *Epidemiología veterinaria: Vol. 1 edición.*

Jayappa, H.G. & C. Lehr, (1986). Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 47(10): 2217-2221.

- Jelocnik, M., Laurence, M., Murdoch, F. R., & Polkinghorne, A. (2019). Detection of Chlamydiaceae in ocular swabs from Australian pre-export feedlot sheep. *Australian Veterinary Journal*, 97(10), 1–3. <https://doi.org/10.1111/avj.12857>
- Kakuda, T., Oishi, D., Tsubaki, S., & Takai, S. (2003a). Cloning and characterization of the fur gene from *Moraxella bovis*. *Microbiology and Immunology*, 47(6), 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03378.x>
- Kakuda, T., Oishi, D., Tsubaki, S., & Takai, S. (2003b). Molecular cloning and characterization of a 79-kDa iron-repressible outer-membrane protein of *Moraxella bovis*. *FEMS Microbiology Letters*, 225(2), 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00554-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00554-8)
- Kakuda, T., Sarataphan, N., Tanaka, T., & Takai, S. (2006). Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, 118(1–2), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.024>
- Karthik, K., Manimaran, K., Mahaprabhu, R., & Shoba, K. (2017). Isolation of *Moraxella* sp. from Cases of Keratoconjunctivitis in an organized sheep farm of India. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 07(10), 138–143. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2017.710014>
- Keizer, D. W., Slupsky, C. M., Kalisiak, M., Campbell, A. P., Crump, M. P., Sastry, P. A., Hazes, B., Irvin, R. T., & Sykes, B. D. (2001). Structure of a Pilin Monomer from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24186–24193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100659200>
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511–1524. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>
- Kokotovic, B., Friis, N. F., Jensen, J. S., & Ahrens, P. (1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism Fingerprinting of Mycoplasma Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3300–3307.

Krause, D. C. (1998). *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends in Microbiology*, 6(1), 780–782. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01168-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01168-2)

Laroucau, K., Vorimore, F., Aaziz, R., Solmonson, L., Hsia, R. C., Bavoil, P. M., Fach, P., Hölzer, M., Wuenschmann, A., & Sachse, K. (2019). *Chlamydia buteonis*, a new Chlamydia species isolated from a red-shouldered hawk. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(5), 125997. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.06.002>

Laroucau, K., Trichereau, A., Vorimore, F., & Mahé, A. M. (2007). A *pmp* genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*, 121(1–2), 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.013>

Lent, S. Van, Creasy, H., Myers, S. A., & Vanrompay, D. (2016a). The number, organization, and size of polymorphic membrane protein coding sequences as well as the most conserved *pmp* protein differ within and across *Chlamydia* species. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 333–344. <https://doi.org/10.1159/000447092>

Lent, S. Van, Vos, W. H. De, Creasy, H. H., Marques, P. X., Ravel, J., Vanrompay, D., Bavoil, P., & Hsia, R. (2016b). Analysis of polymorphic membrane protein expression in cultured cells identifies *pmpA* and *pmpH* of *Chlamydia psittaci* as candidate factors in pathogenesis and immunity to infection. *PLoS ONE*, 11(9), e0162392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162392>

Lenzko, H., Moog, U., Henning, K., Lederbach, R., Diller, R., Menge, C., Sachse, K., & Sprague, L. D. (2011). High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Veterinary Research*, 7(29), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-29>

Lepper A. W., & Power, B. E. (1988). Infectivity and virulence of Australian strains of *Moraxella bovis* for the murine and bovine eye in relation to pilus serogroup sub-unit size and degree of piliation. *Australian Veterinary Journal*, 65(10), 305–309. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb14512.x>

Li J., Guo, W., Kaltenboeck, B., Sachse, K., Yang, Y., Lu, G., Zhang, J., Luan, L., You, J., Huang, K., Qiu, H., Wang, Y., Li, M., Yang, Z., & Wang, C. (2016). *Chlamydia pecorum* is the endemic intestinal species in cattle while *C. gallinacea*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae*

associate with sporadic systemic infection. *Veterinary Microbiology*, 193, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.008>

Li, Z., Cao, X., Fu, B., Chao, Y., Cai, J. & Zhou, J. (2015). Identification and characterization of *Chlamydia abortus* isolates from yaks in Qinghai, China. *BioMed Research International*, 2015;658519. <https://doi.org/10.1155/2015/658519>

Libardoni, F., Scherer, C. F. C., Farias, L., Vielmo, A., Balzan, C., & Vargas, A. C. (2012). *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32(8), 743–746. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800011>

Limón-González, M.M., Hernández-Castro, R., Martínez-Hernández, F., Xicohtencatl-Cortes, J., Ramírez-Alvarez, H., Palomares-Resendiz, E.G., & Díaz-Aparicio, P. (2022). Genetic diversity of *Chlamydia pecorum* detected in sheep flocks from México. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(2),605-613.<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00682-9>.

Lindqvist, K. (1960). A *Neisseria* species associated with infectious keratoconjunctivitis of sheep: *Neisseria ovis* nov. spec., *The Journal of infectious diseases* 106, 162–165. <https://doi.org/doi:10.1093/infdis/106.2.162>

Liu, H., Yan, J., Wang, Y., Yan, Q., Zhao, L., Yan, R., & He, H. (2014). Isolation of *Moraxella bovoculi* from racehorses with keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(4), 585–587. <https://doi.org/10.1177/1040638714535601>

Longbottom, D., & Coulter, L. J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, 128(4), 217–244. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>

Loy, J. D., & Brodersen, B. W. (2014). *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(6), 761–768. <https://doi.org/10.1177/1040638714551403>

Lutz-Wohlgroth, L., Becker, A., Brugnera, E., Huat, Z. L., Zimmermann, D., Grimm, F., Haessig, M., Greub, G., Kaps, S., Spiess, B., Pospischil, A., & Vaughan, L. (2006).

Chlamydiales in guinea-pigs and their zoonotic potential. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 53(4), 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2006.00819.x>

Marrs, C. F., Schoolnik, G., Koomey, J. M., Hardy, J., Rothbard, J., & Falkow, S. (1985). Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. *Journal of Bacteriology*, 163(1), 132–139. <https://doi.org/10.1128/jb.163.1.132-139.1985>

Mayer, D., Degiorgis, M.-P., Meier, W., Nicolet, J. N., & Giacometti, M. (1997). Lesion associated with infectious keratoconjunctivitis in alpine ibex. *Journal Wildlife Disease*, 33(3), 413–419. <https://doi.org/https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.3.413>

McAuliffe, L., Ellis, R. J., Miles, K., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. J. (2006). Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology (Reading, England)*, 152(4), 913–922. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28604-0>

Mcauliffe, L., Gosney, F., Hlusek, M., Garnica, M. L. De, Spergser, J., Kargl, M., Rosengarten, R., Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J., & Ellis, R. J. (2011). Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(6), 803–811. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028159-0>

Mcauliffe, L., Ellis, R. J., Lawes, J. R., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. J. (2005). *16S rDNA* PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*, 54(8), 731–739. <https://doi.org/doi.org/10.1099/jmm.0.46058-0>

McCauley, L. M. E., Butler, M. J., & Ainsworth, C. G. V. (2010). Serological analysis of *Chlamydophila abortus* in Australian sheep and implications for the rejection of breeder sheep for export. *Australian Veterinary Journal*, 88(1–2), 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2009.00536.x>

Meseguer-Peinado, M. A., Acosta-Boga, B., Matas-Andreu, L., & Codina-Grau, G. (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.10.020>

Meylan, E., Tschopp, J., & Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442(7098), 39–44. <https://doi.org/10.1038/nature04946>

Mölleken, 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>

Montserrat, P. P., Jose, R. A. J., Miguel, F. M. L., Francisco, A. P. J., Juan, I. A., Francisco, I. L. and Angel, C. B. J. (2006). Exploración y patología ocular en pequeños rumiantes. Editorial Servet (España).

Mora-Diaz, C. J., Diaz-Aparicio, E., Herrera-Lopez, E., Suarez-Güemes, F., Escalante-Ochoa, C., & Arllano-Reynoso, B. (2015). Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Veterinaria México*, 2(1), 1–11.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S. & Pfaller, M.A. (2009). Microbiología médica. Sexta ed. Ed. Elsevier Mosby .

Mygind, P. H., Christiansen, G., Roepstorff, P., & Birkelund, S. (2000). Membrane proteins *PmpG* and *PmpH* are major constituents of *Chlamydia trachomatis* L2 outer membrane complex. *FEMS microbiology letters*, 186(2), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09098.x>

Nguyen, B. D., Cunningham, D., Liang, X., Chen, X., Toone, E. J., Raetz, C. R. H., Zhou, P., & Valdivia, R. H. (2011). Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10284–10289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107478108//DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1107478108>

Nicholas, R.A.J., Ayling, R. D., & Loria, G. R. (2008). Ovine mycoplasmal infections. *Small Ruminant Research*, 76(1–2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.014>

- O'Brien, T.P. & Hazlett, L.D. (1995). Pathogenesis of ocular infection. In: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR (eds). *Ocular Infection and Immunity*, Chap 15. Mosby: St Louis, MO,
- O'Connor, A. M., Shen, H. G., Wang, C., & Opriessnig, T. (2012). Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Veterinary Microbiology*, 155(2–4), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.011>
- Ostle, A.G. & Rosenbusch, R.F. (1985). Immunogenicity of *Moraxella bovis* hemolysin. *American Journal of Veterinary Research*, 46(5), 1011–1014.
- O'Neill, L. M. O., Driscoll, Á. O., & Markey, B. (2018). Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish Veterinary Journal*, 71(13), 1–9. <https://doi.org/doi.org/10.1186/s13620-018-0124-2>
- Olaogun, O. M., Kanci, A., Barber, S. R., Tivendale, K. A., Markham, P. F., Marendá, M. S., & Browning, G. F. (2015). Genetic diversity of *Mycoplasma arginini* isolates based on multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology*, 180(1–2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.028>
- Ojo, O.E., Oluwolé, O.A., & Adetosoye A.I. (2009). Isolation of *Moraxella bovis* from infectious keratoconjunctivitis in flock of goats. *Nigerian Veterinary Journal*, 30(1), 56–59. <https://doi.org/10.4314/nvj.v30i1.65162>.
- Ortega, N., Caro, M. R., Gallego, M. C., Murcia-Belmonte, A., Álvarez, D., del Río, L., Cuello, F., Buendía, A. J., & Salinas, J. (2016). Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Irish Veterinary Journal*, 69(8), 67–70. <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0067-4>
- Ortiz-Arana, G., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas. E., Palomares-Resendiz, E.G., Enrique-Gómez, E., Salgado-Miranda, C., & Acosta-Dibarrat, J. (2023) Characterization and antimicrobial resistance of *Moraxella ovis* isolates from clinical cases of contagious ovine. Vol, number and pages pending. *accepted in published*. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v37n1a4>

Osman, K. M., Ali, H. A., Eljakee, J. A., Gaafar, M. M., & Galal, H. M. (2012). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of multiple Chlamydiaceae species isolated from genital infection of women in Egypt. *Microbial Drug Resistance*, 18(4), 440–445. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0235>

Osman, K. M., Ali, H. A., Eljakee, J. A., & Galal, H. M. (2011). *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 30(3), 939–948. <https://doi.org/doi.org/10.20506/rst.30.3.2088>

Ostle, A.G., Rosenbusch, R.F., (1985). Immunogenicity of *Moraxella bovis* hemolysin. *American Journal of Veterinary Research*. 46(5), 1011–1014

Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., & Sachse, K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Veterinary Journal*, 181(2), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.025>

Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., & Sachse, K. (2010). Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.08.002>

Pedersen, K. B. (1972). Isolation and description of a haemolytic species of *Neisseria* (*N. ovis*) from cattle with infectious keratoconjunctivitis. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 80(1), 135–139. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1972.tb00140.x>

Pettersson, B., Kodjo, a, Ronaghi, M., Uhlén, M., & Tønjum, T. (1998). Phylogeny of the family Moraxellaceae by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1), 75–89. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-75>

Philips, H. L., & Clarkson, M. J. (1992). Culture of sheep *Chlamydia* in a sheep fibroblast cell culture. *Research in Veterinary Science*, 53(2), 267–268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90124-K](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90124-K)

Polkinghorne, A., Borel, N., Becker, A., Lu, Z. H., Zimmermann, D. R., Brugnera, E., Pospischil, A., & Vaughan, L. (2009). Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. *Veterinary Microbiology*, *135*(1–2), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.034>

Prieto, C. I., Aguilar, O. M., & Yantorno, O. M. (1999). Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Veterinary Microbiology*, *70*(3–4), 213–223. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00142-X)

Prieto, C., Serra, D. O., Martina, P., Jacobs, M., Bosch, A., & Yantorno, O. M. (2013). Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology*, *166*(3–4), 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.003>

Pudjiatmoko, Fukushi, H., Ochiai, Y., Yamaguchi, T., & Hirai, K. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on *16S rRNA* gene sequences. *International journal of systematic bacteriology*, *47*(2), 425–431. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-425>

Pugh, G.W. & McDonald, T.J. (1986). Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *America Journal of Veterinary Research*, *47*(11), 2343- 2345.

Rahman, K. S., Chowdhury, E. U., Poudel, A., Ruetzger, A., Sachse, K., & Kaltenboeck, B. (2015). Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of *Chlamydia* species. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, *22*(5), 539–552. <https://doi.org/10.1128/CVI.00102-15>

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (2007) *veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th Edition, Elsevier Saunders, London, 966-994.

Ramakers, B. P., Heijne, M., Lie, N., Le, T.-N., van Vliet, M., Claessen, V. P. J., & Hermans, M. H. A. (2017). Zoonotic *Chlamydia caviae* Presenting as Community-Acquired Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, *377*(10), 992-994. <https://doi.org/doi:10.1056/nejmc1702983>

Razin S., & Yogev, D. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094–1156.

Richard, Y., Borges, E., Favier, C., & Oudar, J. (1989). Flores nasale et pulmonaire de la chèvre. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 20(3), 269–276.

Rockey, D.D., Heinzen, R.A., and Hackstadt, T. (1995) Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Molecular Microbiology*, 15: 617-626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02371.x>

Rodolakis, A., & Laroucau, K. (2015). Chlamydiaceae and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology*, 181(1–2), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.010>

Rodolakis, A., & Souriau, A. (1980). Clinical evaluation of immunity following experimental or natural infection of ewes with *Chlamydia psittaci* (var. *ovis*). *Annales de Recherches Vétérinaires*, 11(2), 215–223.

Rodolakis, Annie, & Mohamad, K. Y. (2010). Zoonotic potential of Chlamydia. *Veterinary Microbiology*, 140(6), 382. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.014>

Rodolakis, Annie, Salinas, J., & Papp, J. (1998). Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Veterinary Research*, 29(3–4), 275–288.

Rosengarten, R., & Wise, K. S. (1990). Phenotypic switching in *Mycoplasmas*: Phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science*, 247(4940), 315–318. <https://doi.org/10.1126/science.1688663>

Rosengarten, R., & Wise, K. S. (1991). The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis*: combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating high-frequency surface antigenic variation. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4782–4793. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.173.15.4782-4793.1991>

Ruehl, W W, Marrs, C., Beard, M. K., Shokooki, V., Hinojoza, J. R., Banks, S., Bieber, D., & Mattick, J. S. (1993). Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas

in vitro. *Molecular Microbiology*, 7(2), 285–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01119.x>

Ruehl, William W., Marks, C. F., Fernandez, R., Falkow, S., & Schoolnik, G. K. (1988). Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *Journal of Experimental Medicine*, 168(3), 983–1002. <https://doi.org/10.1084/jem.168.3.983>

Rzomp, K. A., Scholtes, L. D., Briggs, B. J., Whittaker, G. R., & Scidmore, M. A. (2003). Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infection and Immunity*, 71(10), 5855–5870. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5855-5870.2003>

Rzomp, K. A., Moorhead, A. R., & Scidmore, M. A. (2006). The GTPase Rab4 interacts with *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT229. *Infection and immunity*, 74(9), 5362-5373. <https://doi.org/10.1128/IAI.00539-06>

Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehricht, R., & Slickers, P. (2008). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiology*, 8(63), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-63>

Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H. H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Ruettinger, A., Bavoil, P. M., Hufert, F. T., Rosselló-Móra, R., & Marz, M. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.004>

Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., & Longbottom, D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, 135(1–2), 2–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>

Sağlam, A. G., Erkiliç, E., Büyük, F., Kirmizigül, A. H., Gökce, G., Balyen, L., Akyüz, E., Aydın, U., Özba, B., & Salih, O. (2018). *Moraxella ovis* and *Mycoplasma conjunctivae* Isolation from an ovine infectious keratoconjunctivitis outbreak and fortified treatment

approaches. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 24(4), 551–556. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.19572>

Sánchez-Romano, J., Leijon, M., Hagström, Å., Jinnerot, T., Rockström, U. K., & Tryland, M. (2019). *Chlamydia pecorum* associated with an outbreak of infectious keratoconjunctivitis in semi-domesticated reindeer in Sweden. *Frontier in Veterinary Science*, 6(14), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00014>

Sánchez-Romano, J., Mørk, T., Laaksonen, S., Ågren, E., Nymo, I. H., Sunde, M., & Tryland, M. (2018). Infectious keratoconjunctivitis in semi-domesticated Eurasian tundra reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*): microbiological study of clinically affected and unaffected animals with special reference to cervid herpesvirus 2. *BMC Veterinary Research*, 14:15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1338-y>

Santos RT, Gaeta NC, Silveira BO, Zanette A, Riet-Correa B, Fraga E Silva Raimondo R. (2022). Bacteria associated with infectious keratoconjunctivitis outbreak in confined lambs. *Journal of medical microbiology*;71(5). doi: 10.1099/jmm.0.001534. PMID: 35613018.

Schautteet, K., & Vanrompay, D. (2011). Chlamydiaceae infections in pig. *Veterinary Research*, 42(29), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-29>

Schmiela, D. H., & Wyrick, P. B. (1994). Another putative heat-shock gene and aminoacyl-tRNA synthetase gene are located upstream from the grpE-like and dna-K-like genes in *Chlamydia trachomatis*. *Gene*, 145(1), 57–63. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90322-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/0378-1119(94)90322-0)

Seeger, M. G., Corrêa, L. F. D., Clothier, K. A., Loy, J. D., & Cargnelutti, J. F. (2021). Isolation of *Moraxella* spp. from horses with conjunctivitis in Southern Brazil. *Brazilian journal of microbiology [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 52(3), 1643–1648. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00507-1>

Seto, S., Layh-schmitt, G., Kenri, T., & Miyata, M. (2001). Visualization of the Attachment Organelle and Cytadherence Proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by Immunofluorescence Microscopy. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1621–1630. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1621>

Shahzad, W., Munir, R., Rana, M. Y., Ahmad, R., Khan, M. S., Akbar, G., Ijaz, M., & Mehmood, F. (2013). Prevalence , molecular diagnosis and treatment of *Mycoplasma conjunctivae* isolated from infectious keratoconjunctivitis affected Lohi sheep maintained at livestock experiment station , Bahadurnagar, Okara, Pakistan. *Tropical Animal Health and Production*, 45(3), 737–742. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0282-2>

Shen, H. G., Gould, S., Kinyon, J., Opriessnig, T., & O'Connor, A. M. (2011). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in pure culture isolates and lacrimal swabs collected from conventionally raised cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1037–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05123.x>

Silló, P., Pintér, D., Ostorházi, E., Mazán, M., Wikonkál, N., Pónyai, K., Volokhov, D. V., Chizhikov, V. E., Szathmary, S., Stipkovits, L., & Kárpati, S. (2012). Eosinophilic Fasciitis Associated with *Mycoplasma arginini* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 1113–1117. <https://doi.org/10.1128/JCM.05568-11>

Smith MC, Sherman DM. (2011) Goat medicine. John Wiley & Sons.

Sosa, V., Umpiérrez, A., Acquistapace, S., & Zunino, P. (2015). Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis cases. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(9), 1028–1032. <https://doi.org/10.3855/jidc.6222>

Sosa, V., & Zunino, P. (2013). Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7(11), 819–824. <https://doi.org/10.3855/jidc.3458>

Spradbrow, P. B. (1968). The bacterial flora of the ovine conjunctival sac. *Australian Veterinary Journal*, 44(3), 117–118. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb09038.x>

Stamm, W.E., Jones R.B., & Batteiger B.E. (2005) Part III. Infectious diseases and their etiologic agents, Section C. Chlamydial Diseases. In: Mandell GL et al (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, pp 2239–2253

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), 5560. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23897-z>

Storz J: Chlamydial abortions. In Kirkbride CA 1990: Laboratory Diagnosis of Livestock Abortions, ed 3. Ames, IA, Iowa State University Press, pp 37-48

Su, H., McClarty, G., Dong, F., Hatch, G.M., Pan, Z.K., and Zhong, G. (2004) Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* 279(10): 9409–9416.

Suchland, R.J., Jeffrey, B.M., Xia, M., Bhatia, A., Chu, H.G., Rockey, D.D., & Stamm W.E. 2008. Identification of concomitant infection with *Chlamydia trachomatis* IncA-negative mutant and wild-type strains by genomic, transcriptional, and biological characterizations. *Infection and Immunity*, 76(12), 5438–46. <https://doi.org/10.1128/iai.00984-08>

Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2015). Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: A revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. *Pathogens and Disease*, 73(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu009>

Teixera L. M., & Merquior, V. L. C. (2014). 22 *The Family Moraxellaceae* (Springer (ed.); The Prokar). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1>

Tiba, M. R., Nogueira, G. P., & Leite, D. D. S. (2009). Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(1), 58–62. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000100012>

Tryland, M., Neves, C. G. Das, Sunde, M., & Mørk, T. (2009). Cervid Herpesvirus 2 , the primary agent in an outbreak of infectious keratoconjunctivitis in semidomesticated reindeer. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3707–3713. <https://doi.org/10.1128/JCM.01198-09>

Tryland, M., Romano, J. S., Marcin, N., Nymo, I. H., Josefsen, T. D., Sørensen, K. K., & Mørk, T. (2017). Cervid herpesvirus 2 and not *Moraxella bovoculi* caused keratoconjunctivitis in experimentally inoculated semi-domesticated Eurasian tundra

reindeer. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(23), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0291-2>

Van Grootveld, R., Bilsen, M. P., Boelsums, T. L., Heddemma, E. R., Groeneveld, G. H., Gooskens, J., & De Boer, M. G. J. (2018). *Chlamydia caviae* causing community-acquired pneumonia: An emerging zoonosis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(11), 635–637. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2304>

Van Halderen, A., Van Rensburg, W. J., Geyer, A., & Vorster, J. H. (1994). The identification of *Mycoplasma conjunctivae* as an aetiological agent of infectious keratoconjunctivitis of sheep in South Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61(3), 231–237. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7596576>

Verbisck-Bucker, G., González-Candela, M., Gailán, J., Cubero-Pablo, J., Martín Atance, P., & León Vizcaino, L. (2008). Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* infection in free-ranging Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Andalusia, Southern Spain. *Journal Wildlife Disease*, 44(2), 369–380. <https://doi.org/doi.org/10.7589/0090-3558-44.2.369>

Vilei, E. M., Bonvin-klotz, L., Zimmermann, L., Ryser-Degiorgis, M., Giacometti, M., & Frey, J. (2007). Validation and diagnostic efficacy of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Mycoplasma conjunctivae* in the eyes of infected Caprinae. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 384–386. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.05.007>

Vorimore, F., Hsia, R. ching, Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., Sachse, K., Bavoil, P., Myers, G., & Laroucau, K. (2013). Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS ONE*, 8(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074823>

Walker, E., Lee, E., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2015). Chlamydia pecorum infections in sheep and cattle: A common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. *The Veterinary Journal*, 206(3), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.022>

Walker, E., Moore, C., Shearer, P., Jelocnik, M., Bommana, S., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2016). Clinical, diagnostic and pathologic features of presumptive cases of *Chlamydia*

pecorum-associated arthritis in Australian sheep flocks. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0832-3>

Watanabe, M., Hitomi, S., Goto, M., & Hasegawa, Y. (2012). Bloodstream infection due to *Mycoplasma arginini* in an immunocompromised patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3133–3135. <https://doi.org/10.1128/JCM.00736-12>

Wynn, E. L., Hille, M. M., Loy, J. D., Schuller, G., Kuhn, K. L., Dickey, A. M., Bono, J. L., & Clawson, M. L. (2022). Whole genome sequencing of *Moraxella bovis* strains from North America reveals two genotypes with different genetic determinants. *BMC microbiology*, 22(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02670-3>

Xiao, Y., Zhong, Y., Greene, W., Dong, F., & Zhong, G. (2004). Chlamydia trachomatis infection inhibits both Bax and Bak activation induced by staurosporine. *Infection and immunity*, 72(9), 5470–5474. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5470-5474.2004>

Yu, R.-H., & Schryvers, A. B. (2002). Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 81–90. <https://doi.org/10.1139/o01-235>

Yousef Mohamad, K., Rekiki, A., Myers, G., Bavoil, P. M., & Rodolakis, A. (2008). Identification and characterisation of coding tandem repeat variants in *incA* gene of *Chlamydophila pecorum*. *Veterinary research*, 39(6), 56. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008032>

Zaitoun, A.M.A., Elseleny, M.G.A., & El-Khabaz, K.A.S. (2021). Clinical study on *Moraxella*-associated infectious keratoconjunctivitis (IKC) of small ruminants. *Benha Veterinary Medical Journal*, 40, 1–4. <https://doi.org/10.9790/2380-0811199102>

Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F., & Huang, Y. (2001). Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *The Journal of experimental medicine*, 193(8), 935–942. <https://doi.org/10.1084/jem.193.8.935>

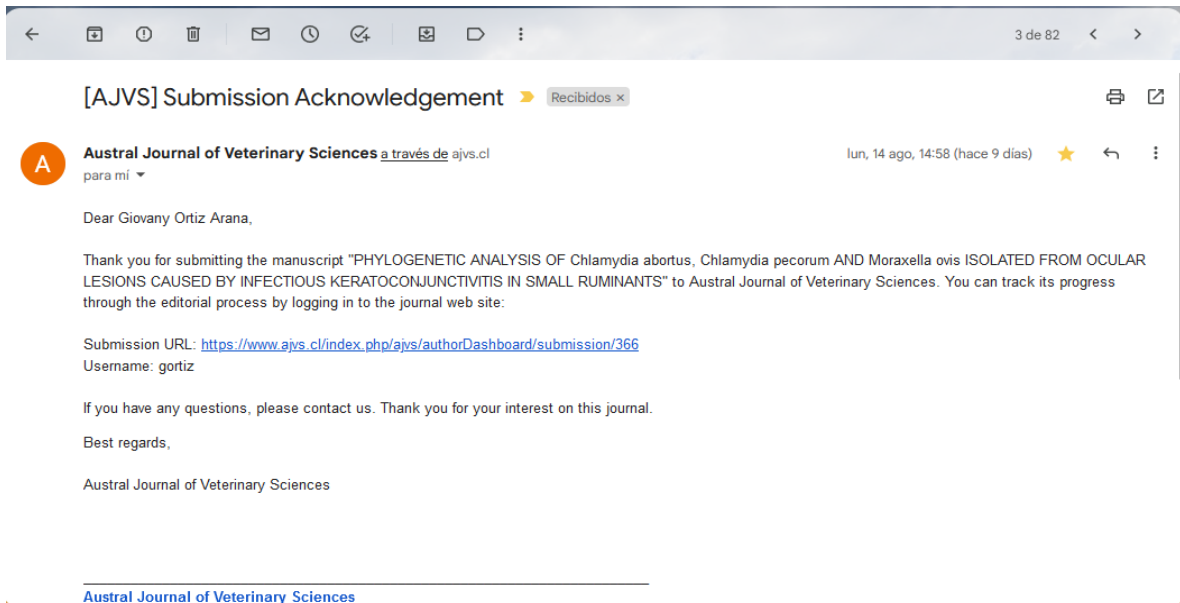
XI.-ANEXOS

Productos de Investigación Doctoral

Envío de Artículo Original

Revista Austral Journal of Veterinary Sciences

<https://www.ajvs.cl/>



The screenshot shows an email interface. At the top, the subject is "[AJVS] Submission Acknowledgement" with a "Recibidos" status. The sender is "Austral Journal of Veterinary Sciences" via "ajvs.cl", dated "lun, 14 ago, 14:58 (hace 9 dias)". The email body contains a greeting to "Dear Giovany Ortiz Arana," followed by a thank-you message for submitting a manuscript titled "PHYLOGENETIC ANALYSIS OF Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum AND Moraxella ovis ISOLATED FROM OCULAR LESIONS CAUSED BY INFECTIOUS KERATOCONJUNCTIVITIS IN SMALL RUMINANTS". It provides a submission URL and the username "gortiz". The email concludes with "Best regards," and the signature "Austral Journal of Veterinary Sciences". A footer link for "Austral Journal of Veterinary Sciences" is also present.

¶
1 ORIGINAL ARTICLE¶

2 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* AND *Moraxella ovis*
3 ISOLATED FROM OCULAR LESIONS CAUSED BY INFECTIOUS
4 KERATOCONJUNCTIVITIS IN SMALL RUMINANTS¶

5 Ortiz-Arana G.¹, Palomares-Reséndiz E.G.², Talavera-Rojas G.¹, Cerón-Téllez F.², Gutiérrez-Hernández
6 J.², Díaz-Aparicio E.², Miranda-Salgado C.¹, Acosta-Dibarrat J.¹¶

7 ¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y
8 Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atlacomulco, Km. 15.5, C.P.
9 50200 Toluca, Estado de México, México. Telefonos:¶

10 ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID-Salud Animal e
11 Inocuidad, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Colonia Palo Alto, Alcaldía Cuajimalpa, Ciudad de
12 México, México, C.P. 05110¶

13 Corresponding author: PhD. Jorge Acosta-Dibarrat¶

14 E-mail: jpacosta00@hotmail.com and jpacostad@uaemex.mx¶

15 Phone +52-(722)-5121833¶

16 ¶

17 ¶

18 ¶

19 ¶

20 ¶

21 ¶

28 SUMMARY

29 Infectious keratoconjunctivitis (IKC) in small ruminants is an ocular disease, which can lead to temporary
30 or permanent blindness in affected animals and has been associated with diverse microorganisms. In this
31 study, the detection and phylogenetic analysis of *Chlamydia* spp. and *Moraxella* spp. associated with
32 infectious keratoconjunctivitis were performed in clinical reports of 227 sheep and 3 goats in the State
33 of Mexico. *Moraxella* spp. was identified by microbial isolation, and PCR was used to sequence the *16S*
34 *rRNA* gene. The Chlamydiaceae family was detected by qPCR, of the *23S rRNA subunit*, using the
35 specific fragment of the *ompA* gene. The virulence-associated *incA* gene was also amplified in the
36 Chlamydiaceae-positive samples. Finally, phylogenetic analysis of the *Moraxella* spp. isolates was based
37 on the *16S rRNA* gene, while analysis of the Chlamydiaceae samples was based on the *incA* gene. Thus,
38 16.42% (46/280) *Moraxella* (*Mer. ovis*) and 12.14% (34/280) *Chlamydia* (*C. abortus* and *C. pecorum*)
39 were identified from the samples with ocular problems, and the virulence-associated *incA* gene was
40 determined in five of the samples positive to *C. abortus*. Sequence analysis and phylogenetic tree
41 construction proved that Mexican isolates of *Mer. ovis* and *C. abortus* are highly similar (97.96%) to
42 strains isolated in other countries. This is the first study to identify *C. abortus* and *C. pecorum* in IKC in
43 the State of Mexico. Present results offer new knowledge on the epidemiology of infectious
44 keratoconjunctivitis and the agents involved, and could provide tools for the prevention and control of
45 IKC or other agent-associated diseases, some of which are zoonotic in nature.

46 Key words: Infectious keratoconjunctivitis, sheep, goats, phylogenetic analysis.

47 INTRODUCTION

48 Infectious keratoconjunctivitis (IKC) is an ocular pathology of small ruminants, which causes temporary
49 or permanent blindness in affected animals. Initial symptoms are mild conjunctivitis which evolve into
50 unilateral or bilateral corneal ulcers, leading towards productive and reproductive losses in herds
51 (Williams *et al.*, 2019).

52 IKC is a disease of multifactorial origin that implicates host characteristics, environment, and a wide
53 variety of virulence-associated pathogens (Akerstedt & Hofshagen, 2004). Spreading is fast and occurs
54 via the presence of subclinical infectious animals introduced into the herds. Overcrowding enhances
55 direct contact with the infected animals and their secretions, which contaminate the feed troughs and
56 food (Williams *et al.*, 2019). Moreover, vectors such as flies (Fernández-Aguilar *et al.*, 2019) further
57 contribute to the spread of the disease.

Enviado y Aceptado.

Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

<https://revistamvz.unicordoba.edu.co/>

DOI: [10.17533/udea.rccp.v37n1a4](https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v37n1a4)

Characterization and antimicrobial resistance of *Moraxella ovis* isolates from clinical cases of contagious ovine keratoconjunctivitis in Mexico State, Mexico

Giovany Ortiz-Arana

Universidad Autónoma del Estado de México

Martín Talavera-Rojas

Universidad Autónoma del Estado de México

Edgardo Soriano-Vargas

Universidad Autónoma del Estado de México

Erika Gabriela Palomares-Reséndiz

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Edgar Enríquez-Gómez

Universidad Autónoma del Estado de México

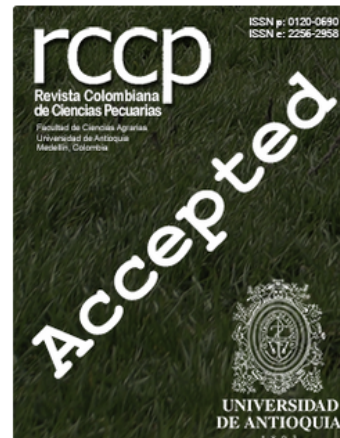
Celene Salgado-Miranda

Universidad Autónoma del Estado de México

Jorge Acosta-Dibarrat

Universidad Autónoma del Estado de México

DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v37n1a4>



 PDF

PUBLISHED

1 This unedited manuscript has been accepted for future publication.
2 The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and galley
3 review before final publication. Please note that this advanced version
4 may differ from the final version.



5
6 **Characterization and antimicrobial resistance of *Moraxella***
7 ***ovis* isolates from clinical cases of contagious ovine**
8 **keratoconjunctivitis in Mexico State, Mexico**

9
10 *Caracterización y resistencia antimicrobiana de aislamientos de **Moraxella ovis** de*
11 *casos clínicos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina en el Estado de México,*
12 *México*

13
14 *Caracterização e resistência antimicrobiana de **Moraxella ovis** isolados de casos*
15 *clínicos de ceratoconjuntivite contagiosa ovina no Estado do México, México*

16
17 Ortiz-Ariza Giovany¹, Talavera-Rojas Martín¹, Soriano-Vargas Edgardo¹, Palomares-Reséndiz
18 Erika Gabriela¹, Enriquez-Gómez Edgar¹, Salgado-Miranda Celene¹, Acosta-Dibarnat Jorge¹

19
20 ¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad
21 Autónoma del Estado de México, México.

22 ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Salud
23 Animal e Inocuidad Ciudad de México, México.

24
25

Received: March 22, 2023. Accepted: May 1, 2023

*Corresponding author: Jorge Acosta Dibarnat. Phone: +52 (722) 2925548. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. E-mail: jnacosta007@hotmail.com



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License, which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 Universidad de Antioquia. Published by Universidad de Antioquia, Colombia.

eISSN: 2256-2958

Rev Colomb Cienc Pecu

20

27 *To cite this article:*

28 Ortiz-Arana G, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Palomares-Reséndiz EG, Enriquez-Gómez E,

29 Salgado-Miranda C, Acosta-Dibarrat J. Characterization and antimicrobial resistance of *Moraxella ovis*

30 isolates from clinical cases of contagious ovine keratoconjunctivitis in Mexico State, Mexico. *Rev*

31 *Colomb Cienc Pecu. Year, Vol, number and pages pending.*

32 DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v37n1a4>

33

34 **Abstract**

35

36 **Background:** Contagious ovine keratoconjunctivitis (OKC) is a contagious disease that
37 causes temporary or permanent blindness in sheep and goats, this disease is associated

38 with a set of bacterial genus of which some of their species have reported antimicrobial

39 resistance. **Objective:** The aim of this study was to identify the phenotypic-genotypic

40 relationship of the antimicrobial resistance from *Moraxella* spp. isolates obtained of

41 clinical cases of contagious ovine keratoconjunctivitis (OKC) in the state of Mexico.

42 **Methods:** A total of 209 samples were obtained from clinical cases OKC in sheep and 60

43 *Moraxella ovis* isolates were identified by bacteriological techniques and amplification

44 of *16s rRNA* and *rtxA* genes by PCR. All isolates were evaluated in terms of antimicrobial

45 resistance by the method of disk diffusion susceptibility test and the amplification of

46 resistance genes by PCR respectively. **Results:** We determined 14 isolates of *Moraxella*

47 *ovis* with antimicrobial resistance (AMR) and five multiresistant (MDR) and amplified

48 the genes of antimicrobial resistance *sulI*, *sul2*, *tetB*, *qnrA*, *qnrB*, *Bla_{TEM}* and not

49 amplified the gene *floR*. **Conclusion:** Is the first report of isolation of *Moraxella ovis*

50 from ocular lesions in sheep's in the state of Mexico and the identification of six

51 antimicrobial resistance genes. Results suggested that *Moraxella ovis* plays an important

52 role in the course of the disease and provides a panorama of interest in molecular

53 epidemiological surveillance and bacterial resistance.

54 **Keywords:** *antimicrobial resistance; contagious ovine keratoconjunctivitis;*

55 *epidemiological surveillance; goat; Moraxella spp.; multiresistance; resistance genes;*

56 *sheep.*

57

58 **Resumen**

59

CAPITULO DE LIBRO

Envió y en revisión.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



DR. JORGE ACOSTA DIBARRAT
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS EN SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
P R E S E N T E.

Por este medio nos permitimos hacer de su conocimiento que hemos recibido el borrador de su capítulo del libro que Usted amablemente aceptó escribir, en colaboración con el M. en C. Giovany Ortiz Arana: "Moraxellas asociadas a Queratococonjuntivitis", para el libro "Enfermedades Bacterianas y micóticas de los animales domésticos. Temas selectos". Este libro tiene la intención de servir de apoyo a los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como a Médicos Veterinarios en el ejercicio de la profesión.

Le informamos que el capítulo fue recibido el día 13 de junio de 2022 y se encuentra en revisión por los editores por lo que pronto tendrá respuesta sobre observaciones y comentarios. Sabemos de sus conocimientos y de su experiencia en el área, por eso agradecemos su participación que consideramos será muy valiosa para el desarrollo de esta obra. Esperamos que la obra llegue a convertirse en un referente médico veterinario para México y el mundo de habla Hispánica sobre las enfermedades bacterianas y micóticas más comunes que afectan a los animales. Muchas gracias por su valiosa contribución.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARÁ MI ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria a 13 de junio de 2023.

DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO
FMVZ-UNAM
arerey@yahoo.com

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA
FMVZ-UNAM
delapenna@unam.mx

DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
CENID-SAL INIFAP
efrediaf@yahoo.com

DR. VLADIMIR MORALES ERASTO
FMVZ-UNAM
vmoralese@unam.mx

Moraxella asociadas a la Queratoconjuntivitis Infecciosa.

Ortiz-Arana, Giovany ¹; Acosta-Dibarrat, Jorge ². Incluir filaciones.

¹ Programa Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

² Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México.

La familia *Moraxellaceae* pertenece al orden Pseudomonadales a la clase Gamma proteobacteria y comprende los géneros *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y *Moraxella*, recientemente se ha unido al género *Alkanindiges*, *Paraperulocibaca* y *Perulocibaca*. Esta familia está compuesta por un grupo de bacterias heterogéneas distribuidas en una amplia variedad de nichos ecológicos y clínicos, la mayoría de estos microorganismos se consideran saprofitos que se encuentran distribuidos en el medio ambiente (agua, suelo y alimentos) y se consideran de poco interés clínico; sin embargo, existen otros microorganismos de esta familia que son considerados como importantes agentes patógenos ¹.

Las bacterias del género *MORAXELLA* se caracterizan por ser aeróbicas, microaerófilas y quimioorganotróficas lo que les permiten crecer de forma planctónica en diferentes ambientes de forma mesofílica o psicrófila. Se ha observado que estos microorganismos son ineficientes fermentadores de carbohidratos; Además, tienen la capacidad de obtener subproductos a partir de aminoácidos como lo hacen algunas otras especies bacterianas, por ejemplo, *Pseudomonas* y *Shewanella* y también se ha observado que algunas especies de *MORAXELLA* no tienen la capacidad de hidrolizar el ADN, a diferencia de *M. catarrhalis*, y los grupos butiratos con unión con ésteres.

Son bacterias Gram negativas con forma de bacilos cortos, coccobacilos o diplococos que pueden aparecer en forma de parejas o de cadenas cortas y con frecuencia se observan más coccoides a medida que envejecen los cultivos (fase estacionaria). El tamaño de estas bacterias oscila entre 0.6 a 2.5 µm de diámetro, a las pruebas bioquímicas son oxidasa y catalasa positivas y por lo general no producen indol.

SANIDAD

Aislamiento e identificación fenotípica y genotípica de *Moraxella ovis* de casos clínicos de queratoconjuntivitis ovina en el Estado de México

Glovely Ortiz-Arana, Martín Talavera Rojas, Edgardo Soriano Vargas, Celene Salgado Miranda, Luis Fernando Vega Castillo, Jorge Acosta-Díaz*

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Toluca, México

Resumen

La queratoconjuntivitis contagiosa ovina (QCO) es una enfermedad infectocontagiosa que produce ceguera temporal o permanente en ovinos y caprinos, se encuentra asociada a un conjunto de agentes infecciosos como *Moraxella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* y *Chlamydia psittaci*, el diagnóstico se realiza mediante un examen clínico y pruebas de laboratorio. De un total de 861 animales examinados, 209 presentaron algún tipo de lesión ocular resultando en una prevalencia del 24.27% de animales con lesiones compatibles con QCO. De las 209 muestras remitidas al laboratorio se lograron identificar 58 como *Moraxella ovis* mediante bacteriología y por la amplificación de los genes *16S rRNA* y *RtxA* por PCR. En virtud de los resultados podemos concluir que *Moraxella ovis* esta involucrada en los casos de QCO en establecimientos productores de ovinos en el Estado de México.

Palabras clave: *Moraxella ovis*. Queratoconjuntivitis contagiosa ovina. PCR. *rtxA*. *16s rRNA*.

Introducción

La queratoconjuntivitis contagiosa ovina por sus siglas (QCO) es una enfermedad infectocontagiosa que causa ceguera temporal o permanente, presentando diversos signos clínicos (Dagnall, 1994). Los microorganismos de importancia clínica son *Moraxella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* y *Chlamydia psittaci* (Akerstedt y Hofshagen, 2004). *M. ovis* también se ha aislado en la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) como agente de menor importancia (Gould et al., 2013). La diferenciación de las especies *Moraxella* por métodos bacteriológicos se basa en las reacciones positivas en las pruebas fenilalaninadesaminasa y gelatinasa aunque pueden ser inconsistentes (Angelos et al., 2007). Esta diferenciación se puede llevar a cabo a través de pruebas moleculares amplificando las regiones interespaciadores génicos *16S y 23S rRNA* (ITS) (Shen et al., 2011; Sosa y Zunino, 2013) y por el gen *RtxA* que codifica la citotoxina A (Farias et al., 2015).

Quick-Start Protocol

April 2018

QIAamp[®] DNA Mini Kit

The QIAamp DNA Mini Kit (cat. nos. 51304 and 51306) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 months.

Further information

- QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook: www.qiagen.com/HB-0329
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents. Refer to the handbook for required equipment and procedure.
- If a precipitate has formed in Buffer ATL or Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates, as indicated on the bottle.
- Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).
- Heat two water baths or heating blocks: one to 56°C for use in step 1 and one to 70°C for use in step 3.

Refer to the handbook for protocols for swabs, dried blood spots, cultured cells, fixed tissue, bacteria, yeast or other material.

Sample to Insight



1. Cut tissue (<25 mg) into small pieces and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 180 μ l Buffer ATL and 20 μ l Proteinase K, mix by vortexing and incubate at 56°C until completely lysed (1–3 h). Vortex occasionally during incubation.
2. Add 200 μ l Buffer AL. Mix thoroughly by vortexing for 15 s.
3. Incubate at 70°C for 10 min. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
4. Add 200 μ l ethanol (96–100%). Vortex for 15 s. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the lid.
5. Pipet the mixture onto the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube). Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
6. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW1. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
7. Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube and add 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Discard the flow-through and collection tube.
8. **Recommended:** Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and centrifuge at full speed for 1 min. This eliminates the chance of possible Buffer AW2 carryover.
9. Place the QIAamp Mini spin column in a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), add 200 μ l Buffer AE or distilled water and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min to elute the DNA.
10. **Optional:** Repeat step 10 for increased DNA yield with a further 200 μ l Buffer AE or distilled water.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group). 1113198 04/2018 HB-2530-001 © 2018 QIAGEN, all rights reserved.

Protocolo de Purificación de ADN.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282, AND A9285.

Quick
PROTOCOL

DNA Purification by Centrifugation

Gel Slice and PCR Product Preparation

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

Binding of DNA

1. Insert SV Minicolumn into Collection Tube.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn assembly. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.

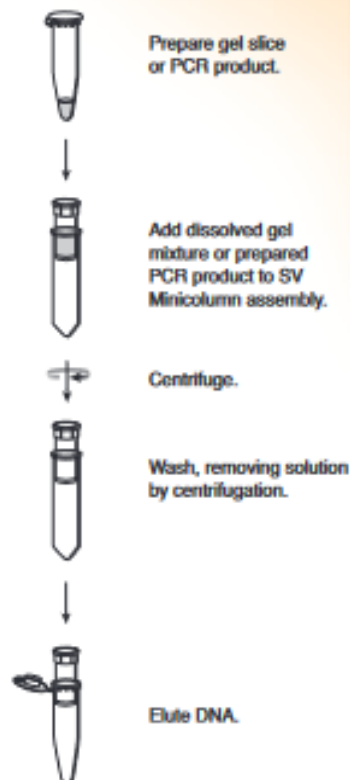
Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute. Discard flowthrough and reinsert Minicolumn into Collection Tube.
5. Repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Centrifuge at 16,000 × *g* for 5 minutes.
6. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

7. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
8. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute.
9. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.

Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB308, available online at: www.promega.com



8780VA07_2A

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A9280, A9281, A9282 AND A9285.

Quick
PROTOCOL

DNA Purification by Vacuum

Gel Slice and PCR Product Preparation

A. Dissolving the Gel Slice

1. Following electrophoresis, excise DNA band from gel and place gel slice in a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 10µl Membrane Binding Solution per 10mg of gel slice. Vortex and incubate at 50–65°C until gel slice is completely dissolved.

B. Processing PCR Amplifications

1. Add an equal volume of Membrane Binding Solution to the PCR amplification.

Binding of DNA

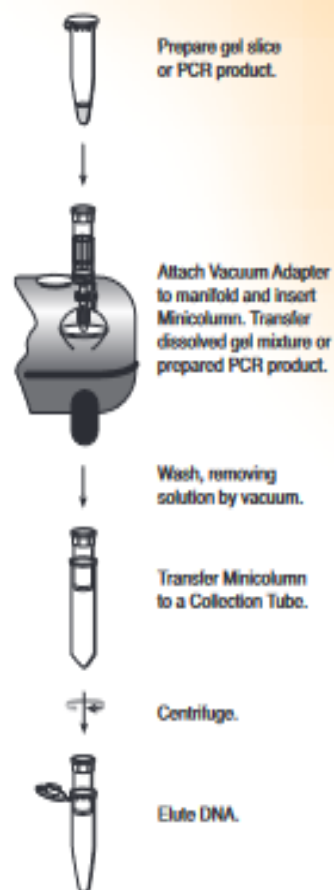
1. Attach Vacuum Adapter to manifold port and insert SV Minicolumn into Adapter.
2. Transfer dissolved gel mixture or prepared PCR product to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute.
3. Apply vacuum to pull liquid through Minicolumn. Release vacuum when all liquid has passed through Minicolumn.

Washing

4. Add 700µl Membrane Wash Solution (ethanol added). Apply a vacuum to pull solution through Minicolumn.
5. Turn off vacuum and repeat Step 4 with 500µl Membrane Wash Solution. Apply a vacuum to pull solution through Minicolumn.
6. Transfer Minicolumn to a Collection Tube. Centrifuge at 16,000 × *g* for 5 minutes.
7. Empty the Collection Tube and recentrifuge the column assembly for 1 minute with the microcentrifuge lid open (or off) to allow evaporation of any residual ethanol.

Elution

8. Carefully transfer Minicolumn to a clean 1.5ml microcentrifuge tube.
9. Add 50µl of Nuclease-Free Water to the Minicolumn. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 16,000 × *g* for 1 minute.
10. Discard Minicolumn and store DNA at 4°C or –20°C.



3769M AGT_2A

Additional protocol information is available in Technical Bulletin #TB308, available online at www.promega.com