

207  
2



**ENEP-C**

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES-GUAUTITLÁN**

**ELABORACION DEL ANTIGENO GRUPO-ESPECIFICO  
DE CHLAMYDIA SPP. PARA LA PRUEBA DE  
INMUNODIFUSION EN AGAR**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACO BIOLOGO  
p r e s e n t a  
**GERARDO HERNANDEZ LUGO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	8
III. MATERIAL Y METODOS	9
IV. RESULTADOS	12
V. DISCUSION	13
VI. CONCLUSIONES	14
VII. BIBLIOGRAFIA	15

## I. INTRODUCCION

### A. GENERALIDADES

Las clamidias son parásitos procariotes obligados intracelulares que infectan a células eucarióticas con un amplio rango de huéspedes (38) como son: aves y mamíferos. A los agentes del grupo psitacosis-linfogranuloma venéreo tracoma (PLT) se le reconocen dos especies (10) que son: Chlamydia psittaci y Chlamydia trachomatis, basandose en: a) Sus propiedades biológicas, b) La susceptibilidad a sulfadiazina y D-cicloerina y c) Su antigenicidad.

#### a) Sus propiedades biológicas:

Gordon y Quan (19,20), dividen varias cepas de clamidias en dos subgrupos (A y B) en base a las propiedades biológicas de los agentes. El subgrupo A incluye los agentes que forman en las células infectadas inclusiones compactas, las cuales contienen glucógeno (El agente de tracoma, conjuntivitis con corpúsculos de inclusión linfogranuloma venéreo y pneumonitis de ratón). El subgrupo B incluye los agentes que tienen un desarrollo difuso en el citoplasma de la célula huésped y no producen glucógeno (Los agentes meningopneumonitis humana y felina, ornitosis, psitacosis, meningopneumonitis, encefalomielitis bovina y otras con propiedades similares).

#### b) La susceptibilidad a Sulfadiazina y D-cicloerina:

Lin y Moulder (33) estudiaron las propiedades de los miembros de los subgrupos de Gordon y Quan (19,20) en base a la susceptibilidad a los antibióticos. Ellos encontraron que el subgrupo A fue ho-

mogéneo con respecto a la sulfadiazina y D-cicloserina, mientras que los miembros del subgrupo B fueron resistentes a sulfadiazina y mucho menos sensibles a D-cicloserina.

c) Su antigenicidad:

A los miembros de los dos subgrupos de las clamidias se les de terminó que contenían un antígeno específico de grupo (9,49), el cual fue determinado mediante la prueba de fijación de complemento (FC). Barwell (8) inactiva el antígeno grupo-específico y determina un antígeno específico de especie mediante la prueba de FC. Asimismo una reacción específica de especie de los miembros del subgrupo A fue reportada por Moulder y col., (39) mediante una prueba de hemoaglutinación indirecta.

Los agentes del grupo PLT son de forma esférica con un diámetro que varía de 200 - 1000 nm. dependiendo de su evolución en el ciclo de desarrollo (1,2,34,35), el cual consiste en una secuencia alternada de corpúsculos elementales o células infecciosas (200-300 nm.) y corpúsculos reticulados o células no infecciosas (500- - 1000 nm.) (36,37,59), que se multiplican por mecanismos de fisión binaria.

El ciclo de desarrollo comienza con una fagocitosis de las partículas infecciosas por la pared celular, estos corpúsculos elementales son retenidos en vacuolas contenidas por membranas derivadas de la superficie de la célula huésped, donde se lleva a cabo todo el proceso de desarrollo y reproducción, el cual dura 30 horas y puede

ser dividido en dos fases: La primera ocupa las primeras 20 horas, durante la cual, los títulos de infectividad intracelular permanecen constantes y las partículas son grandes, mayores de 500 nm. de diámetro. La segunda fase del ciclo, esta representada por un incremento logarítmico de la infectividad.

Estos agentes infecciosos inducen una gran cantidad de enfermedades en el hombre y los animales. Las alteraciones en el ser humano son:

- a) Aborto (53)
- b) Artritis (15,53)
- c) Conjuntivitis (60)
- d) Linfogranuloma venéreo (22,25,54)
- e) Psitacosis-orinitis (57)
- f) Tracoma (24,25)

Las alteraciones más importantes en los animales son:

- a) Aborto enzootico en ovinos (3)
- b) Aborto epizootico en bovinos (57)
- c) Enteritis en ovinos y bovinos (55)
- d) Neumonía en ovinos (56)
- e) Poliartritis en ovinos y bovinos (13)

## B. DIAGNOSTICO

Las pruebas de laboratorio que pueden indicar infección por cl am idias, incluyen: a) La demostración del agente por observación mi

croscópica en frotis teñidos, b) El cultivo del microorganismo y c)-  
Métodos serológicos.

a) Demostración del agente en frotis teñidos.

De las técnicas de tinción que demuestran las inclusiones del -  
agente en frotis de material sospechoso, las tinciones de lodo, tie-  
nen la ventaja de ser rápidas, simples y de bajo costo; sin embargo  
existe el riesgo de obtener falsos positivos que con las tinciones de  
Giemsa, Machiavello y Gimenez, aunque estas últimas son más tar-  
dadas, complicadas y costosas (29).

b) Cultivo.

Ya que los agentes del grupo PLT son parásitos obligados intra-  
celulares, para su crecimiento requiere de células vivas por lo que  
se utiliza:

1. Inoculación a embriones de pollo de 6-8 días de edad, vía  
saco vitelino. (48)
2. Ratones de 21 días de edad, inoculando vía intracerebral,  
intraperitoneal o intranasal (23).
3. Cuyes inoculados intraperitonealmente (50).
4. Cultivos celulares
  - 4.1 Células McCoy irradiadas (21).
  - 4.2 Células Hella tratadas con DEAE-dextran (32).

De los métodos anteriormente mencionados para el aislamiento de  
clamidias, la inoculación vía saco vitelino en embriones de pollo, es  
un método simple y muy empleado aunque sea lento, ya que general-

mente la muerte del embrión se produce entre el tercer y noveno día postinoculación. Las lesiones que se producen en el embrión, son tíficas y consisten principalmente en hiperemia y cianosis de las piernas y tarsos y en hemorragia en el resto de la piel. El saco vitelino aparece más delgado de lo normal presentando en sus vasos sanguíneos una congestión franca (57). La identificación de los agentes por cultivo de células McCoy irradiadas (22) ha demostrado ser un método más eficaz que los que utilizan animales de laboratorio y embriones de pollo. El método de cultivo en células Hella 229 tratadas con DEAE-dextran, descrito Kuo, Wang, Wentworth y Grayston (32), ofrece resultados altamente satisfactorios para el aislamiento de los agentes de tracoma, pero no para los de linfogranuloma venéreo.

c) Métodos serológicos:

Los agentes del grupo PLT poseen una estructura antigénica compleja, debido a esto, sus antígenos se clasifican en: 1) Antígeno específico de grupo, que identifica y es común para todas las clamidias y 2) Los específicos de especie. Nichols y McComb (40) dividen los antígenos de especie en dos subclases: El antígeno de tipo, que se asocia con diferentes cepas de la misma especie, que causan una enfermedad particular y el antígeno de cepa, asociado a una simple cepa.

1. Antígeno de grupo: El antígeno específico de grupo que se localiza en la pared celular clamidial, es estable a la temperatura y común para todos los agentes de clamidias (C. trachomatis y C. psittaci, tanto de cepas humanas como de animales) se le prepara por ebu-



llición de material parcialmente purificado por centrifugación (9). - Asimismo puede extraerse con Deoxycolato (28), álcali (15), ácido, dietil éter o agua (57). Este antígeno es un polisacárido ácido de alto peso molecular, (0.2-2 millones) cuyo grupo inmunodominante es el ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (15).

Las técnicas usadas para la detección de anticuerpos contra el antígeno de grupo son: Fijación de complemento (8,10,18,27,43,46), fluorescencia (30,40,51,58,61), hemaglutinación (6,16,52), intradermoreacción (11), radioinmunoensayo (18) e inmunodifusión (7,12,31, 42).

2. Antígenos de especie: Los antígenos específicos de especie - han sido demostrados por inactivación del antígeno de grupo mediante periodato de potasio (8) y absorción con anticuerpos homólogos - (12). Se utilizan para la detección de anticuerpos siguiendo los métodos anteriormente mencionados, además de las técnicas de reducción en placa (5,6,45,47) y la técnica de contrainmunoelectroferesis (26).

## C. PROBLEMATICA EN MEXICO

Estudios realizados en México (44) en pulmones de borregos sacrificados en el rastro de Ferrería demostraron que el 13.3% de 1,500 animales presentaron lesiones neumonicas apreciables a simple vista. - En 2 pulmones se demostró por medio de aislamiento que clamidia fue el agente causal. Esto muestra la presencia de este microorganismo en México. Sin embargo sabemos del problema que implica el aislamiento de este microorganismo, por lo cual es necesario contar con una -

técnica de diagnóstico rápida, sencilla y confiable.

## II. OBJETIVO

En base a la gran cantidad de enfermedades producidas por estos microorganismos y a el aislamiento de Chlamydia spp. en México (44) se crea la necesidad, de elaborar un antígeno de grupo, a partir de 3 cepas de clamidias que sea utilizado en la prueba de inmunodifusión en gel, la cual será utilizada como diagnóstico de las enfermedades producidas por clamidias, y así mismo para evaluar la incidencia de este microorganismo en México.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### A. PROPAGACION DEL AGENTE.

Tres cepas de clamidias (aborto ovino, enteritis ovina y enteritis bovina)\* fueron propagadas por inoculación a embriones de pollo de 6-8 días de edad vía saco vitelino (49). Se inocularon 100 embriones mensualmente, haciendo un total de 1200 (400 embriones aproximadamente para cada cepa). Los embriones que murieron antes del tercer día postinoculaciones fueron desechados, por considerarse errores de la técnica. Mientras los que murieron después del mismo, fueron refrigerados a 4 C., para después coleccionar el saco vitelino, el cual fue sembrado por impronta en agar sangre\*\*, para comprobar la ausencia de bacterias contaminantes. Estos sacos vitelinos fueron homogenizados a 4 C. en un vortis y la suspensión obtenida fue centrifugada a 2500 g durante 20 minutos, el sobrenadante fue recentrifugado a 10000 g durante 30 min., a 4 C. El sedimento fue entonces resuspendido en PBS y almacenado a -70 C. hasta su empleo.

#### B. PRODUCCION DEL ANTIGENO.

La suspensión de partículas de clamidias fue puesta a ebullición en baño maría durante 20 min. (9) para posteriormente ser recentrifugada a 6000 x g. durante 30 min. y obtener en el sobrenadante el antígeno específico de grupo.

\* Las cepas fueron proporcionadas por el Dr. Ricardo Flores C. de la Universidad de Cornell, U.S.A.

\*\* Agar Base Sangre. (Difco 0045-01)

### C. ANTISUERO DEL CONEJO.

El antisuero empleado en la prueba de inmunodifusión en agar, fue producido en conejos, siguiendo el siguiente modelo: El día -- 1<sup>a</sup> se inoculó una mezcla de 0.5 ml de antígeno más 0.5 ml de -- adyuvante completo de Freud vía intraplantar (IP); los días 8, 10, 12, 15, 17, y 19 se inocularon 0.5 ml de antígeno más 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freud, vía intramuscular e IP en forma alterna da. Los conejos fueron sangrados el día 22 y una última inoculación se efectuó el día 29 para sangrar los conejos el día 32 y titular el suero mediante la técnica de difusión en gel.

### D. TECNICA DE INMUNODIFUSION.

Las placas de inmunodifusión fueron preparadas de dos formas:- La primera contenía agar noble\* al 1.5% disuelto en buffer de barbituratos 0.32 M con un pH= 8.6 y en la segunda se empleó agarosa\*\* al 1.5% disuelta en buffer de fosfatos 0.1 M a pH=7.4 A las dos soluciones se les adicionó azida de sodio al 0.1% a una concentración final del 1%. Estas soluciones fueron servidas en cajas de Petri (10 cm. de diámetro) para la técnica de Macro-Ouchterlony y en placas de plastico (2 x 7 cm.) para la técnica de Micro-Ouchterlony (41).

Para comparar los dos métodos, se hicieron diluciones dobles del antígeno y antisuero, con el fin de observar la mejor línea de preci-

\* Agar noble (Difco 0142-01)

\*\* Agarosa (Biomedical Laboratories)

pitación. Se emplearon como controles, suero negativo de conejo y saco vitelino de embrión de pollo sin infectar, colectados entre el décimo y vigésimo día de edad mediante el sacrificio de los animales. Dichos sacos vitelinos fueron homogenizados y centrifugados a las constantes ya mencionadas, con la excepción de que este material no fue llevado a ebullición en baño maría. Las placas de inmunodifusión, fueron perforadas con moldes (figuras 1 y 2). En el centro de las mismas se colocó el antígeno y en la periferia las diluciones del suero.

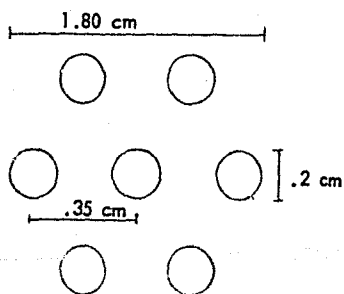


fig. 1

molde utilizado en la prueba de Micro-Ouchterlony

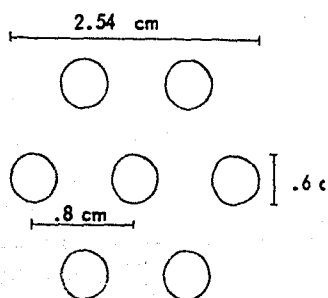


fig. 2

molde utilizado en la prueba de Macro-Ouchterlony

#### IV. RESULTADOS

Se observó en ambos métodos, una línea de precipitación (fig. 3) de identidad total entre las tres cepas de clamidias utilizadas -- contra sus sueros homólogos y heterólogos. Dicha línea fue observada a las 20 horas aproximadamente a temperatura ambiente, mostrando una mejor visibilidad de la línea, cuando se empleo el antígeno con centrado y el antisuero no diluido, sin embargo se obtuvo precipitado hasta una dilución de 1-16 del suero, y de 1-16 del antígeno. Por otro lado, los controles, no revelaron ninguna línea de precipitación en el gel.



fig. 3

Lineas de identidad total en la técnica de Inmunodifusión

## V. DISCUSION

Todos los agentes del grupo PLT, poseen un antígeno de grupo. Este antígeno de grupo clamidial ha sido demostrado por un gran número de procedimientos serológicos incluyendo entre otros; fijación de complemento, inmunofluorescencia e inhibición de la hemoaglutinación. En la presente tesis se uso la técnica de inmunodifusión en agar considerada como un método sensitivo (41), la cual utiliza antígeno de grupo, el que es empleado para detectar anticuerpos de grupo en sueros de casos de animales con infección por clamidias.

Parikh y Schechtmeister (42) usando extracción con fluorocarbón de cepas meningopneumonitis, crecidas en saco vitelino, observaron 7 líneas de precipitación, considerando 6 como específicas. De la misma forma Katzenelson y Bernkopf (31) encontraron 10 líneas, aunque estas mismas fueron obtenidas con el antígeno control de saco vitelino de embrión de pollo normal, sin embargo Barron y Collins (7) estudiaron la reactividad de los antígenos preparados por diferentes métodos de cepas de tracoma, meningopneumonitis, pneumonitis y psitacosis, observando una sola línea de precipitación, que correspondió al antígeno de grupo, posteriormente Collins y Barron (12), corroboran lo ya mencionado observando una línea de precipitación para el antígeno de especie y otra línea para el antígeno específico de grupo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.



## VI. CONCLUSIONES

El antígeno termoestable de grupo, obtenido a partir de las cepas de clamidia estudiadas, produjo una visible línea de precipitación con antisuero homólogo preparado en conejo, por lo que se sugiere su empleo en la técnica de inmunodifusión en gel, para el diagnóstico de las enfermedades causadas por clamidias, así como para efectuar estudios epizootiológicos con bases serológicas.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, D.R., and Hoopes, H.E., Barile, M.R., and Bernheim. (1965): Comparison of the ultrastructure of several Rickettsiae, Ornithosis virus, and Mycoplasma in tissue culture. J. Bact. 90: - 1387-1404.
- 2.- Armstrong, J.A., and Reed, S.E. (1964): Nature and origin of - initial bodies in lymphogranuloma venereum. Nature 201: 371-373.
- 3.- Ata, F.A., and Storz, J. (1973): Antigenic structure and clearance of Chlamydia from blood of convalescent Sheep. Am. J. Vet.- Res. 34: 915-917.
- 4.- Banks, J., Eddie, B., Sung, M., Sugg, N., Schachter, J., and Meyer, K.F. (1970): Plaque reduction technique for demonstrating - neutralizing antibodies for Chlamydia. Infection and Immunity 2: - 443-447.
- 5.- Banks, J., Eddie, B., Schachter, J., and Meyer, K.F. (1970): -- Plaque formation by Chlamydia in L cells. Infection and Immunity 1: 259-262.
- 6.- Barron, A.L., and Riera, M.C. (1969): Studies on hemagglutination by Chlamydia. Pro.Soc.Exp.Biol.Med., 131: 1087-1089.
- 7.- Barron, A.L., Collins, A.R. (1967): Studies on trachoma agent by double diffusion gel precipitation. Amer.J.Ophthalmology, 63:1487-1491.
- 8.- Barwell, C.F. (1952): Some observations on the antigenic of psittac

- cosis and lymphogranuloma venereum viruses. I. Preparation and use in complement fixation test of antisera from different sources. Brit. J. Exp. Path. 33: 258-267.
- 9.- Badson, S.P. (1936): Observations bearing on the antigenic composition of the psittacosis virus. Brit. J. Exp. Path. 17: 109-117.
- 10.- Bergey, Murray and Hitches. Manual of determinative bacteriology, 8th. ed., pp. 914-918. (Williams & Wilkins, Baltimore, 1973).
- 11.- Bietti, G.B., Buogo, A., Chione, M., and Milano, C. (1967): - Skin reactions with several trachoma antigens. Amer. J. Ophthalmology. 63: 1513-1519.
- 12.- Collins, A.R., and Barron, A.L. (1970): Demonstration of group-specific and species-specific antigens of chlamydial agents by gel diffusion. J. Infect. Dis. 121: 1-8.
- 13.- Cutlip, R.C., and Ramsey, F.K. (1973): Ovine chlamydial polyarthritis: Sequential development of articular lesions in lambs after intraarticular exposure. Am. J. Vet. Res. 34: 71-78.
- 14.- Dhir, S.P., Hakomori, S., Kenny, G.E., and Grayston, J.T. --- (1972): Immunochemical studies on chlamydial group antigen. (Presence of a 2-keto-3 deoxycarbohydrate as immunodominant group). J. Immunol. 109: 116-122.
- 15.- Dunlop, E.M., Hare, M.J., Darougar, S., Jones, B.R., and Rice, N.S.C. (1969): Detection of Chlamydia (Bedsonia) in certain infections of man II. Clinical study of genital tract, eye, rectum, and other sites of recovery Chlamydia. J. Infect. Dis. 120: 463-470.

- 16.- Frank, M., Gogolak. (1954): The mouse erythrocyte hemagglutinin of feline pneumonitis virus. *J. Infect. Dis.* 95: 220-225.
- 17.- Fraser, C.E., and Berman, D.T. (1965): Type-specific antigens in the psittacosis-lymphogranuloma venereum group of organisms. *J. Bacteriol.* 89: 943-948.
- 18.- Gerloff, R.K., and Watson, R.O. (1967): The radioisotope precipitation test for psittacosis group antibody. *Amer. J. Ophthalmology* 63: 1492-1498.
- 19.- Gordon, F.B., and Quan, A.L. (1965): Occurrence of glycogen in inclusions of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma agents. *J. Infect. Dis.* 115: 186-196.
- 20.- Gordon, F. B., and Quan, A.L. (1965): Isolation of trachoma agent in cell culture. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* 118: 354-359.
- 21.- Gordon, F.B., Dresler, H.R., and Quan, A.L. (1967) *Ibid.* 63: 1044. Citado por Jones, B.R. (1974): Laboratory tests for chlamydial infection. *Brit. J. Ophthalmology.* 58: 438-454.
- 22.- Gordon, F.B., Harper, I.A., Quan, A.L., Traharne, J.D., -- Dwyer, St. C., and Carland, J.A. (1969): Detection of Chlamydia (Bedsonia) in certain infections of man. I. Laboratory procedures: Comparison of yolk sac and cell culture for detection and isolation. *J. Infect. Dis.* 120: 451-462.
- 23.- Gordon, M.H., (1930): Virus studies concerning the etiology of psittacosis. *Lancet*, 1: 1174-1176.
- 24.- Grayston, J.T., Woolridge, R.L., and Wang, S.P. (1962): Trachoma

- vaccine studies on Taiwan. Ann. N. Y. Acad. Sci. 98: 352-366.
- 25.- Grayston, J.T., and Wang, S.P. (1975): New knowledge of - Chlamydiae and the diseases they cause. J. Infect.Dis. 132: - 87-105.
- 26.- Harlan, D., Caldwell and Cho-Cho Kuo (1977): Serologic diag-  
nosis of lymphogranuloma-venereum by counter-immunoelectropho-  
resis with a Chlamydia trachomatis protein antigen. J. Immunol.  
118: 442-445.
- 27.- Isa, A.M., Hanna, L., and Jawetz, E. (1969): Diversity of -  
human antibodies to TRIC agents (Chlamydiae) detected by di-  
fferent serological procedures. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130: --  
1087-1092.
- 28.- Jenkin, H.M. (1960): Preparation and properties of cell walls of  
the agent of meningopneumonitis. J. Bact. 80: 639-647.
- 29.- Jones, B.R. (1974): Laboratory test for chlamydial infection. Brit.  
J. Ophthal. 58: 438-454.
- 30.- Katzenelson, E., and Bernkopf. (1965): Serological differentiation  
of trachoma strains and other agents of psittacosis lymphogranulo-  
ma venereum trachoma group with the aid of direct fluorescent an-  
tibody method. J. Immunol. 94: 467-474.
- 31.- Katzenelson, E., and Bernkopf, H. (1967): Studies on PLT agents  
with the aid of the agar immune diffusion technique. Amer. J. -  
Ophthalmology. 63: 1463-1487.

- 32.- Kuo, Cho-Chou., Wang, San-pin., and Garyston, J.T. (1972): Differentiation of TRIC and LGC organisms based on enhancement of infectivity by DEAE-dextran in cell culture. *J. Infect.Dis.* - 125: 313-317.
- 33.- Lin, H. S., and Moulder, J.W. (1966): Patterns of response to - sulfadiazine, D-cycloserine, and D-alanine in members of the psittacosis group. *J. Infect. Dis.* 116: 372-376.
- 34.- Litwin, J. (1959): The growth cycle of the psittacosis group of microorganisms. *J. Infect. Dis.* 105: 129-160.
- 35.- Litwin, J., Officer, E., Brown, A., and Moulder, J. W. (1961) A comparative study of the cycles of different members of psittacosis group in different host cells. *J. Infect.Dis.* 109: 251-279.
- 36.- Manire, G.P. (1966): Structure of purified cell walls of dense forms of meningopneumonitis organisms. *J. Bacterio.* 91: 409-413.
- 37.- Manire, G.P., and Tamura, A. (1967): Preparation chemical composition of the cell walls of mature infectious dense forms of meningopneumonitis organisms. *J. Bacteriol.* 94: 1178-1183.
- 38.- Meyer, K.F. (1967): The host spectrum of psittacosis lymphogranuloma venereum agents. *Amer. J. Ophthalmol.* 63: 1225-1245.
- 39.- Moulder, J.W., Novosel, D.L., and Tribby, I.C. (1963): Diaminopimelic acid decarboxylase of the agent of meningopneumonitis. *J. Bacteriol.* 85: 701-706.
- 40.- Nichols, R.L., and McComb, D.E. (1962): Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. *J. Immunol.* 89: 545-554.

- 41.- Norman, E. M., Mochael, B., and Greich, G. J. (1968): Comparison of sensitivities of immunodiffusion methods. P.S.E.B.M. 128: 1098-1102.
- 42.- Parikh, G., and Schechmeister, I. L. (1964): Interaction of - meningopneumonitis virus with white blood cells. II. Antigenic subunits of meningopneumonitis virus. *Virology* 22: 177-185.
- 43.- Philip, R. N., Lackman, D. B., Frank, F. W., Morrison, J. D., - Casper, E. A., and Greaves, A. B. (1967): Serological reactions of psittacosis-lymphogranuloma venereum trachoma (PLT) group. - *Amer J. Ophthalmol.* 63: 1499-1505.
- 44.- Pijoan, A. P. (1977): Aislamiento de Chlamydia spp. de pulmones neumónicos de ovinos en México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México.
- 45.- Piraino, F., and Abel, C. (1964): Plaque assay for psittacosis - virus in monolayer of chick embryo fibroblasts. *J. Bacteriol.* 87: 1503-1511.
- 46.- Piraino, F. (1965): The occurrence of psittacosis virus complement-fixing (CF), monocomplement-fixing (NCF) and neutralizing (N) antibodies in domestic plogens. *J. Immunol.* 95: 1107-1110.
- 47.- Piraino, F. (1969): Plaque formation in chick embryo fibroblasts - by Chlamydia isolated from avian and mammalian sources. *J. Bacteriol.* 98: 475-480.
- 48.- Rahe, G., McKee, C. M., and Shaffer, M. F. (1940): Agent of - lymphogranuloma venereum in the yolk-sac of the developing chick

- embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 43: 332-335.
- 49.- Rake, G. (1953): The lymphogranuloma-psittacosis group. Ann. N.Y. Acad. Sci. 56: 557-560.
- 50.- Rivers, T.M., and Berry, G.P. (1931): Psittacosis III. Experimentally induced infections in rabbits and guinea pigs. J. Exp. Med. 54: 119-128.
- 51.- Ross, M.R., and Borman, E.K. (1962): Direct and indirect fluorescent-antibody techniques for the psittacosis-lymphogranuloma venereum trachoma group of agents. J. Bacteriol. 85: 851-858.
- 52.- Sayed, H. (1972): Antigens and Immunogens of trachoma and related agents. In. J.B.C. Kwapinski and F.A.A.M. (eds) Research in immunochemistry and immunobiology. Vol. II. University Park - Press.
- 53.- Schachter, J. (1967): Isolation of bedsoniae from human arthritis and abortion tissues. Amer. J. Ophthalmol. 63: 1082-56-1086/60.
- 54.- Schachter, J., Hanna, and Hill, E. (1975): Are chlamydial infections the most prevalent venereal disease. J. Am. Med. Ass. 231: 1252-1255.
- 55.- St. George, T.D. (1968): Psittacosis-lymphogranuloma agents in bovine pneumonia. J. Am. Vet. Med. Ass. 152: 814-815.
- 56.- Stevenson, R.G. (1969): Respiratory diseases of sheep. Vet. Bull. - 39: 747-759.
- 57.- Storz, J. (1971): Chlamydia and Chlamydia and Chlamydia-induced diseases (Thomas, Springfield).



- 58.- Surman, P.G., Hardy, D., and Howarth. (1967): The immunofluorescent staining technique applied to trachomatous eye smears in aboriginal school children in South Australia. *Amer. J. Ophthalmol.* 63: 1361-1372.
- 59.- Tamura, A., Matsumoto, A., and Higashi, N. (1967): Purification and chemical composition of reticulate bodies of the meningopneumonitis organisms. *J. Bacteriol.* 93: 2003-2008.
- 60.- Thygeson, P., Okumoto, M. (1967): A new type of chronic follicular conjunctivitis. *Amer. J. Ophthalmol.* 63: 1277-1278.
- 61.- Wang, San-pin and Grayston, J.T. (1974): Human serology in -- *Chlamydia trachomatis* infection with micro-immunofluorescence. - *J. Infect.Dis.* 130: 388-397.