

207
2e

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
División de Estudios Profesionales



Utilización de la Prueba de Intradermorreacción como
Técnica Diagnóstica en la Queratoconjuntivitis
Infecciosa Ovína por CHLAMYDIA psittaci

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
GLADYS MARIA SALAMANCA RIBA

Asesores: M.V.Z. Jesús Romero M.
M.V.Z. Ana Leticia Romo G.
M.V.Z. Jorge A. Pérez M.





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	24
LITERATURA CITADA	26
FIGURAS	28
CUADROS	30

RESUMEN

SALAMANCA RIBA, GLADYS MARÍA. Utilización de la prueba de intradermorreacción como técnica diagnóstica de la Queratoconjuntivitis infecciosa ovina por Chlamydia psittaci (bajo la dirección de: Jesús Romero M., Ana Leticia Romo G. y Jorge Pérez M.).

Los métodos diagnósticos actualmente disponibles en nuestro medio para el diagnóstico de la Queratoconjuntivitis infecciosa ovina (Q.C.I.O.), no son lo suficientemente específicos y sensibles. Existe la necesidad de nuevas técnicas diagnósticas para determinar rápidamente su etiología. Se cultivó una cepa tipo de C. psittaci en embriones de pollo y se elaboró el antígeno para ser utilizado en una prueba de intradermorreacción. Esta prueba se aplicó en tres grupos de animales: un grupo afectado con Q.C.I.O., otro grupo sano pero con antecedentes de Q.C.I.O. y un grupo libre de esta enfermedad. Se inoculó 0.1 ml de antígeno clamidial en el párpado inferior izquierdo y 0.1 ml de un antígeno testigo en el párpado inferior derecho. 24, 48, 72 y 96 horas postinoculación se determinó el aumento de grosor del pliegue palpebral, buscando aumentos de 2 o más milímetros para considerar a la prueba como positiva. Ningún animal mostró reacción positiva indicando una ausencia de estados de hipersensibilidad hacia C. psittaci.

INTRODUCCIÓN

La Queratoconjuntivitis infecciosa ovina (Q.C.I.O.) es una enfermedad infectocontagiosa caracterizada por conjuntivitis y queratitis que se encuentra distribuida a nivel mundial y cuya etiología es múltiple, dentro de la cual se encuentra Chlamydia psittaci (4, 10).

La Q.C.I.O. representa grandes pérdidas para los productores debido a que ocasiona una disminución en el peso vivo de los animales por incapacidad de los mismos en buscar el alimento (1, 6, 8).

Etiología: Dentro de ésta se encuentra: Chlamydia psittaci (1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 15, 16, 18, 21) Rickettsia spp. (2, 7, 8, 10, 11), Moraxella bovis (10), Branhamella ovis y Mycoplasma conjunctivae (3, 7, 10, 15) además de: Bacillus spp., Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Corynebacterium pyogenes, E. coli, Pseudomonas spp., Listeria monocytogenes, Mycoplasma mycoides var. capri, Acholeplasma oculi, difteroides y hongos (4, 10, 11). Debido a su múltiple etiología y a que por el momento no se cuenta con una técnica diagnóstica precisa para determinar el agente causal, su tratamiento se vuelve más costoso y prolongado.

La Q.C.I.O. es una enfermedad de carácter endémico y casi no existe lugar en donde se explote la industria ovina que no presente este problema, lo que justifica los esfuerzos y recursos invertidos en su investigación.

Historia: El estudio de las infecciones oculares causadas por Chlamydia spp. es relativamente reciente. Ahora se sabe que muchas enfermedades oculares en diferentes especies anima-

les son causadas por C. psittaci (2).

En 1960 se pudo aislar e identificar a Chlamydia a partir de exudado conjuntival de un gato que padecía conjuntivitis catarral aguda. En 1963 se aisló un agente infeccioso con características clamidiales de muestras conjuntivales de lechones con queratoconjuntivitis en Bulgaria. En 1959 se propuso que el género Chlamydia era la causa de la queratoconjuntivitis contagiosa de los borregos en Inglaterra. Estos estudios basaron sus conclusiones en exámenes citológicos de muestras conjuntivales y en tratamientos con quimioterapéuticos. No se tuvo éxito en el aislamiento del agente. Este agente fue posteriormente cultivado en embriones de pollo inoculados con muestras conjuntivales obtenidas de borregos con queratoconjuntivitis en los Estados Unidos en 1967. Esto fue confirmado por medio de estudios en borregos en Australia, Nueva Zelanda y África del Sur en 1974 (2).

En 1978 se aisló Chlamydia en cultivos celulares a partir de muestras conjuntivales de un búfalo salvaje africano de un año y medio de edad en Botswana y en 1981 se aisló a chlamydia de una muestra de ojo de un koala severamente afectado con queratoconjuntivitis en Australia (2).

Epizootiología de la Q.C.I.O. causada por Chlamydia: La Q.C.I.O. afecta a todas las razas ovinas sin importar sexo ni edad, aunque se ha visto con mayor frecuencia en los animales lactantes y los de engorda (8, 11). Los brotes se observan principalmente en la época de la lactancia debido a que las madres y los corderos se mantienen juntos, aumentando con ésto, la posibilidad de transmisión (3, 4).

La mayor incidencia de la Q.C.I.O. se observa durante el verano donde a causa de la sequía, aumenta la cantidad de polvo y moscas los cuales actúan como agentes mecánicos de transmisión (4, 8, 11). El hacinamiento también contribuye a la presentación de la enfermedad (4, 8, 10, 17). La morbilidad fluctúa desde 1 hasta 100% dependiendo de las condiciones del lugar y el estado general de los animales.

La inmunidad de la Q.C.I.O. es de corta duración y se ha encontrado que animales que padecieron la enfermedad en un año, la vuelven a padecer en años subsecuentes (3). La mayoría de los animales afectados presentan exclusivamente una conjuntivitis folicular de moderada a severa que cuando no es tratada persiste entre 10 y 15 días (3). Es de distribución mundial.

Propiedades del género Chlamydia: Este género sólo puede replicarse en el citoplasma de células animales vivas. Su tamaño es relativamente pequeño (300 nm) lo que la hace asemejarse a los virus (13). Son organismo procarióticos y su entidad celular se mantiene durante su ciclo de replicación.

Las clamidias contienen ADN y ARN; se dividen por fisión binaria; contienen ribosomas 70S; poseen una pared celular rígida carente de ácido murámico y una membrana externa similar a la envoltura de las bacterias Gram negativas; poseen plásmidos y son susceptibles a la acción de algunos antibióticos incluyendo a la tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y penicilina (13).

Las clamidias no son capaces de producir eficientemente compuestos de alta energía como el ATP por lo que necesitan obtener su energía metabólica a partir de la célula huésped. Son anaerobios por definición (4, 13). El alto contenido de lípi-

dos de su pared celular las hace susceptibles a la acción microbicida de los detergentes, de solventes orgánicos y de otros desinfectantes de uso común como el formaldehído y el fenol. Las clamidias también son susceptibles a la inactivación por medio del calor (13).

Patogenia: Los rayos ultravioleta, el polvo, el viento y el calor, producen daño en los ojos de los borregos lo que ocasiona que éstos se vuelvan susceptibles a la entrada de microorganismos tales como clamidia (8, 10).

El ciclo de replicación de las clamidias se inicia cuando la forma extracelular del microorganismo, el cuerpo elemental (CE), infecta una célula susceptible, que en este caso sería una célula del epitelio conjuntival (13). El periodo de incubación es de 24 a 36 horas. El CE se reorganiza en unas cuantas horas en una forma no infectante denominada cuerpo reticulado (CR), el cual se multiplica activamente mediante fisión binaria. Los CRs se reorganizan nuevamente en la nueva progenie de CEs. Los monómeros de proteína de la membrana externa se vuelven a entrelazar mediante puentes disulfuro para formar complejos poliméricos y la progenie infecciosa es liberada durante la lisis de la célula huésped ingresando a los fluidos lagrimales e infectando nuevas células (2, 13).

El curso de esta enfermedad dura entre 10 y 15 días pudiendo presentarse la recuperación del animal en forma espontánea. En algunas ocasiones la clamidia invade la sangre y migra al otro ojo y a las articulaciones (4, 8). Si el animal no se recupera de manera espontánea, la descarga ocular se vuelve más densa y purulenta debida a infecciones secundarias (2, 4). Toda clase de bacterias pueden estar involucradas en infecciones

secundarias y han sido implicadas en causar Q.C.I.O. porque es muy difícil distinguir entre colonización, infección secundaria y la causa primaria de la enfermedad.

Signos y lesiones: La severidad de la Q.C.I.O. causada por C. psittaci es variable. La mayoría de los animales afectados muestran únicamente una queratoconjuntivitis de moderada a severa, la cual, cuando no es tratada, persiste por 1 a 3 semanas (1, 6, 10).

Los signos clínicos tempranos consisten en quimosis, dilatación de los vasos conjuntivales en los márgenes palpebrales y blefaroespasmos (2, 4, 10). Un enrojecimiento difuso se ve posteriormente en los fórnix inferiores en donde también están presentes filamentos delgados de moco (2, 3, 4, 8). El desarrollo de folículos linfoides señalan estadios intermedios de la enfermedad (2, 8).

Los folículos linfoides empiezan como elevaciones pequeñas, discretas y pálidas en la conjuntiva, las cuales se van agrandando progresivamente llegando a un diámetro de 3mm; éstos confluyen y forman delicados dobleces con una tonalidad que va de rosa hasta rojo en el fórnix inferior y en el tercer párpado (2, 8). El desarrollo de los folículos de la superficie bulbar del tercer párpado, la hiperemia conjuntival y el edema causan una inflamación de los tejidos periorbitales (2, 4).

El drenaje de las lágrimas se obstruye y como consecuencia la epifora se presenta comúnmente y tiempo después una abundante descarga seropurulenta sella los párpados a manera de costra. Los borregos con este tipo de lesiones presentan fotofobia (1, 2, 4, 6, 10, 11, 17).

El edema perilimbal de la córnea refleja signos de conjuntivitis clamidial avanzada y se encuentra asociada con signos de inflamación severa de la conjuntiva bulbar y su extensión hacia la córnea en forma de queratitis (2, 3). Hay neovascularización de la córnea que ocurre principalmente en el limbo superior y que en el transcurso del tiempo se convierte completamente en perilimbal (2, 10). En un gran porcentaje de los casos ambos ojos se encuentran igualmente afectados (2, 17).

Son pocos los casos de Q.C.I.O. en los que hay complicaciones, en los cuales se observa una opacidad de la córnea y ulceración de la misma (2, 4, 8, 10, 11). Bajo estas circunstancias existe ceguera, panoftalmia y consecuente incapacidad para encontrar alimento y agua (1, 6, 10, 11).

En algunos animales con esta enfermedad puede persistir la turbidez corneal durante varias semanas o incluso ser permanente. En ocasiones la ulceración de la córnea causa colapso del globo ocular (4, 10). En otros animales se presenta una cicatrización y pigmentación permanente de la córnea (3).

En algunas regiones geográficas un porcentaje de los corderos con conjuntivitis padecen a su vez de poliartritis y virtualmente todos los corderos con poliartritis padecen conjuntivitis (2, 4, 8, 17). Se presenta una disminución en la ganancia de peso de los animales. Algunos de éstos se ven parcialmente anoréxicos y en una condición general pobre. En muy raros casos se llega a presentar la muerte por inanición (11).

DIAGNÓSTICO DE LA Q.C.I.O. PRODUCIDA POR C. psittaci:

1. Demostración directa del agente etiológico en la conjuntiva ocular:

a) Citología exfoliativa de raspados conjuntivales:

Esta técnica puede ser un instrumento para el diagnóstico de infecciones de conjuntiva por clamidias (4, 9). Muestras de conjuntiva son colectadas mediante un raspado de la superficie afectada. Dichas muestras son teñidas por el método de Giemsa y observadas en el microscopio de campo claro (3, 4, 10, 15, 17, 18).

La tinción de Giemsa es utilizada para determinar el tipo de respuesta inflamatoria observando en ésta el tipo de células epiteliales en la conjuntiva y para identificar inclusiones citoplásmicas características de clamidia (9).

La tinción de Giemsa tinte la periferia del núcleo de los leucocitos de color púrpura, el citoplasma de color azul claro, y los gránulos eosinofílicos y los eritrocitos de rosa. Las células epiteliales normales de la conjuntiva son ligeramente más grandes que los leucocitos (10 a 15 μ m de diámetro) y poseen un núcleo granular en el centro de color rosa con un citoplasma azul claro homogéneo. Las bacterias se tiñen de azul oscuro (9).

Los colorantes de la tinción de Giemsa deben ser preparados diariamente para su uso, con el objeto de asegurar una buena tinción de los elementos celulares (9).

Las inclusiones citoplásmicas son más frecuentemente encontradas en áreas donde existen gran cantidad de polimorfonucleares y en capas de células epiteliales (9). Las inclusiones citoplásmicas consisten de acúmulos de partículas pequeñas (300 nm) de color rojo-púrpura, conocidas como cuerpos elementales y de

partículas más grandes (1 μ m) de color azul oscuro conocidas como los cuerpos reticulados (9).

Cabe señalar que el método de Giemsa no es una técnica altamente específica ni sensible debido a que las inclusiones deben ser diferenciadas de gránulos de melanina, gránulos esparcidos en el citoplasma provenientes de células epiteliales adyacentes y de bacterias localizadas en la superficie de las células epiteliales, entre otras (9). Esta técnica puede dar falsos positivos y desafortunadamente las típicas inclusiones solamente están presentes en los primeros estadios de la enfermedad (16). El raspado de la conjuntiva para la obtención de la muestra puede agravar los signos (10).

A esta prueba se le ha determinado una efectividad del 50% (9).

b) Técnica de Inmunofluorescencia:

La sensibilidad y la especificidad de la demostración directa mediante microscopía podría mejorarse substancialmente mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia. Lamentablemente, estas técnicas no han sido evaluadas suficientemente como recurso diagnóstico de rutina en Medicina Veterinaria. *

La preparación de inmunofluorescencia puede ser posteriormente teñida con Giemsa o Giménez para reubicar las inclusiones.

c) Prueba de ELISA:

Recientemente ha sido descrita una prueba de ELISA que permite la detección de C. psittaci en moco vaginal de animales experimentalmente infectados. Será interesante ver los resulta-

* Pérez, L. Comunicación personal 1988.

dos de esta prueba una vez que se aplique al diagnóstico rutinario no solo de abortos sino también de otras infecciones causadas por clamidia (14).

2. Aislamiento del agente etiológico:

a) Aislamiento en embrión de pollo:

Consiste en la inoculación de raspados conjuntivales a diferentes diluciones decimales vía saco vitelino a embriones de pollo de 6 a 8 días de edad. Dichos embriones son incubados a 37° C y ovoscopiados diariamente para evaluar su viabilidad (2, 3, 15, 17, 18).

La muerte de los embriones en los primeros cuatro días de la inoculación es usualmente inespecífica (2), por lo que se espera que la mortalidad aparezca después del cuarto día postinoculación para sospechar de clamidia (15, 17).

Una forma presuntiva de diagnosticar infección clamidial en los embriones muertos es por medio de la observación directa de las lesiones causadas por Chlamydia psittaci en las células endodérmicas del saco vitelino y una evidente congestión del mismo (15, 16). A los embriones que presentan este tipo de lesiones se les extrae el saco vitelino, pues es en donde se reproduce la clamidia y por lo tanto se encuentra en mayor cantidad (15, 16). De dichos sacos vitelinos se realizan improntas fijadas al calor y teñidas bajo la técnica de Giménez para ser observadas en el microscopio de campo claro e intentar el hallazgo de cuerpos elementales característicos del género Chlamydia (3, 15, 17).

Entre las ventajas de esta prueba está su fácil realización así como el poco sofisticado material que se requiere (12). Den-

tro de sus desventajas se encuentra la incapacidad de algunas cepas de clamidia para reproducirse en embriones de pollo por falta de adaptación; el riesgo de que los embriones utilizados no se encuentren en buenas condiciones y la presencia de cuerpos elementales en cantidades insuficientes para ser detectados en el microscopio de campo claro. La obtención de resultados positivos mediante la técnica de Giménez nos puede llevar a un diagnóstico de forma rápida, pero el no hallazgo de cuerpos elementales bajo esta técnica no necesariamente descarta a clamidia como la causante de la infección (12).

El trabajo realizado por Stephenson, Storz y Hopkins (15), indica que esta prueba tiene alrededor de un 40% de efectividad.

b) Aislamiento en cultivos celulares:

Durante los últimos años, las condiciones para el cultivo in vitro de clamidia en cultivos celulares se han mejorado significativamente. Una gran cantidad de líneas celulares de origen mamífero o aviar, han sido utilizadas para el cultivo in vitro de C. psittaci, pero las células L (clonas 929 y 5b, fibroblastos de ratón) son las más utilizadas (13).

La mayoría de las cepas de C. psittaci aisladas de mamíferos, se adhieren en forma ineficiente a los cultivos celulares, pero la infectividad puede incrementarse auxiliando a las fases iniciales del proceso de infección, como son la fase de adherencia de los cuerpos elementales (CEs) a la membrana citoplásmica de la célula huésped y la endocitosis de los CEs una vez adheridos; y creando un ambiente intracelular más favorable para la multiplicación del parásito (13). El método más eficiente consiste en la centrifugación del inóculo sobre el monoestrato ce-

lular. El mecanismo por medio del cual funciona este método es incierto. La máxima infectividad se obtiene utilizando fuerzas centrifugas lo suficientemente grandes como para ocasionar la sedimentación de los CEs presentes en el inóculo (10,000 x g), aunque también fuerzas centrifugas mucho menores (como 70 x g) aumentan la infectividad de la clamidia significativamente, lo cual sugiere que la sedimentación de los CEs sobre el monoestrato celular no es el factor esencial para el aumento en la infectividad in vitro (13).

Se ha sugerido que la centrifugación induce cambios morfológicos tanto en la membrana citoplásmica como en el citoesqueleto de las células huéspedes y que estos cambios hacen que los receptores ocultos sean expresados en la superficie celular, promoviendo así, la adherencia y la endocitosis de las clamidias. Sin embargo, los estudios realizados por otros autores sugieren que durante la centrifugación, la primera fase del proceso de infección, la fase de adherencia, no se lleva a cabo (13).

Muchos otros procedimientos han sido utilizados para aumentar la entrada y la multiplicación de las clamidias en cultivos celulares. De éstos, el uso de dietilamino etil dextrano (DEAE dextrano) y el ciclohexamida han sido los mejores caracterizados. El primero es un polication que se utiliza para neutralizar cargas negativas en la superficie de la célula huésped con el fin de aumentar la infectividad de muchas cepas de C. psittaci de origen mamífero (13). El uso de este producto representa una alternativa a los laboriosos procedimientos de centrifugación antes descritos (13).

La ciclohexamida es un antibiótico glutarimídico que inhibe la síntesis de proteínas en células eucarióticas pero que no

afecta el metabolismo de organismos procarióticos. La presencia de este producto en cultivos celulares infectados con clamidias, aumenta consistentemente la formación de inclusiones citoplásmicas por cepas de ambas especies de Chlamydia. Se piensa que la ciclohexamida aumenta la infectividad de las clamidias aumentando la disponibilidad de aminoácidos en el citoplasma de la célula huésped y reduciendo la competencia celular por los mismos (13).

Cabe destacar que ésta es la técnica más indicada para el diagnóstico de Q.C.I.O. por C. psittaci, pero existen en México muy pocos laboratorios que presten este servicio.

c) Aislamiento en animales de laboratorio:

Esta es otra técnica de diagnóstico de la Q.C.I.O. causada por C. psittaci. Dentro de los animales utilizados para esta técnica se encuentran los ratones y cuyes principalmente, a los cuales se les inocula la muestra problema varias veces por vía intraperitoneal o por instilación nasal realizando pases cuando se trabaja con aislamiento de clamidia a partir de bovinos, ovinos o caprinos (3). Debido a que los ratones y cuyes también sufren infecciones naturales tales como neumonía natural del ratón producida por clamidia y la queratoconjuntivitis natural del cuyé también producida por este microorganismo, es necesario que estos animales estén libres de este germen para no alterar los resultados (3, 4).

3. Pruebas serológicas:

a) Prueba de fijación de complemento:

Es una prueba ampliamente usada para el diagnóstico de infección por C. psittaci (12).

La prueba de fijación de complemento se lleva a cabo en

dos etapas. En primer lugar, el antígeno y el suero problema (cuyo complemento se destruyó por calentamiento a 56° C) se cuban en presencia de suero normal de cobayo, el que suministra una fuente de complemento. Después de dejar reaccionar algún tiempo la mezcla Ag-Ac-C', se mide la cantidad de complemento libre en el sobrenadante añadiendo un "sistema indicador" formado por eritrocitos de carnero, cubiertos de anticuerpos. La lisis de estos eritrocitos, que se traduce por la aparición de una solución roja transparente, constituye un resultado negativo, pues significa que el complemento no fue fijado y por lo tanto, no había anticuerpos en el suero problema (19). Se puede considerar que el título es la dilución del suero más alta en la cual hay lisis de una cantidad inferior al 50 por 100 de los glóbulos rojos añadidos (19).

Dentro de las ventajas de la prueba de fijación de complemento está que nos permite identificar muchas interacciones inmunes. El punto final de las reacciones es fácil de leer y, a diferencia de las pruebas de hemaglutinación, no se depende de la precipitación de los eritrocitos. Además, la prueba de fijación de complemento no requiere disponer de suspensiones purificadas de antígenos, razón por la cual se utiliza frecuentemente para el diagnóstico de enfermedades virales (19).

Dentro de las desventajas de esta misma prueba está el inconveniente en su complejidad, sobretodo respecto a la estandarización y preparación de los reactivos (19). Además, es más útil en el diagnóstico de enfermedades sistémicas de origen clamidal tales como neumonía, poliartritis, encefalomielitis y aborto, no así en las infecciones de la mucosa como es el caso de la queratoconjuntivitis, artritis e infección del tracto ge-

nital (12).

b) Técnica de inmunofluorescencia:

Esta prueba es muy útil para el diagnóstico de la Q.C.I.O., prefiriéndose utilizar la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes. Esta técnica permite identificar y medir los anticuerpos en el suero. El colorante fluorescente a utilizar es el isotiocianato de fluoresceína (ITCF). El ITCF es un compuesto amarillo que se combina fácilmente con las inmunoglobulinas y no altera su capacidad de reacción (19).

Cuando se busca un anticuerpo para la técnica de inmunofluorescencia, el antígeno se utiliza bajo forma de frotis, un corte o un cultivo de células. El antígeno se incuba en presencia de un suero que pueda contener anticuerpos contra dicho antígeno; posteriormente el suero se lava, dejando los anticuerpos unidos con el antígeno. Es posible identificar estos anticuerpos fijados incubando el frotis con un suero anti-gammaglobulinas marcado con ITCF. El exceso de anti-gammaglobulinas se elimina por lavado y se examina el frotis. La fluorescencia indica que había anticuerpos en el suero problema. Su cantidad se establece por estudio de diluciones crecientes de suero frente a un número variable de preparados antigénicos diferentes (19).

Dentro de las ventajas de la prueba de inmunofluorescencia se encuentra la posibilidad de saber que clase de anticuerpos es pecíficos se encuentran en el suero, utilizando conjugados contra cada variedad de inmunoglobulinas (19). Una de las principales desventajas de esta prueba es que no se realiza en forma rutinaria en laboratorios clínicos (9).

c) Prueba de ELISA:

Esta prueba requiere del uso de anticuerpos marcados con enzimas. Se trata de una prueba destinada a medir la cantidad de anticuerpos en el suero. El antígeno queda químicamente unido a una superficie sólida, por ejemplo, el interior de un tubo de ensayo. Después de que el suero reaccionó con el antígeno, se lavan los complejos inmunes fijados a la superficie, con el fin de eliminar el anticuerpo que no formó complejos, y se añade la anti-gammaglobulina marcada con la enzima. Después de un segundo lavado, la cantidad de enzimas que permanecen en el tubo constituyen un indicio de la cifra de anticuerpos específicos en el suero y se presta a una medición sencilla mediante técnicas químicas ordinarias (19).

Dentro de las ventajas de la prueba de ELISA se encuentra su gran sensibilidad que resulta ser mayor que la de fijación de complemento; además, es capaz de determinar el tipo de inmunoglobulina presente en el suero (4, 12). Sus desventajas son la poca cantidad de laboratorios que realizan esta prueba en forma rutinaria y la frecuente aparición de interferencia (12).

4. Pruebas de inmunidad celular:

a) Prueba de intradermorreacción:

Cuando se inyectan en la piel de animales sensibilizados determinados antígenos, puede presentarse en el sitio de la inyección una respuesta inflamatoria que tarda varias horas para instalarse. Puesto que esta reacción de "Hipersensibilidad tardía" no es transferible de un animal sensibilizado a uno normal con el suero, sino solamente con el trasplante de linfocitos, no hay duda de que se debe a un fenómeno de inmunidad celular. Las reacciones de hipersensibilidad tardía del tipo mencionado

se clasifican como hipersensibilidad tipo IV y se deben a las interacciones entre el antígeno inyectado y los linfocitos T sensibilizados (19).

Esta prueba ha sido utilizada con buenos resultados para el diagnóstico en forma indirecta de Aborto Enzootico Ovino causado por C. psittaci (5, 22), así como para estudiar el mecanismo patogénico de la conjuntivitis clamidial en cobayos (20, 21). Los resultados de estos trabajos sugieren que las hembras que abortan después de una infección por C. psittaci son aquellas que no fueron capaces de dar una respuesta inmune celular ni en el momento ni en la cantidad adecuada (5, 22).

Títulos elevados de anticuerpos detectados por medio de la prueba de fijación de complemento a partir de muestras de animales enfermos no son indicativos de una adecuada protección. En animales gestantes existe evidencia de que existe una correlación inversa entre la prueba de intradermorreacción y la respuesta humoral (5, 22). Esto se debe a que C. psittaci es un parásito intracelular obligado, por lo tanto, requiere de una respuesta debida a células para proporcionar protección (5, 22).

Los resultados encontrados en los trabajos realizados por Dawson y col. (5) y Wilsmore y col. (22), indican que es mayor el número de animales tanto enfermos como infectados detectados por medio de la prueba de intradermorreacción que por medio de la prueba de fijación de complemento.

En México se realizó recientemente un estudio en el que se intentó aislar a C. psittaci de raspados conjuntivales de animales con Q.C.I.O. e improntas de saco vitelino de embriones de pollo infectados con muestras conjuntivales, observándose la

presencia de estructuras muy sugestivas de cuerpos elementales de clamidia pero no siempre en cantidades significativas (4). Debido a lo anterior y a que se carecen de laboratorios suficientes que realicen la técnica de aislamiento en cultivos celulares, se estableció la necesidad de buscar otras técnicas de diagnóstico de Q.C.I.O. por Chlamydia psittaci como es la prueba de intradermorreacción, representando con esto, una evidencia del papel etiológico de C. psittaci en esta enfermedad dentro del rebaño estudiado.

La realización de este trabajo se basó en la hipótesis de que utilizando animales que tuvieran antecedentes de haber padecido Q.C.I.O. y otro grupo con esta enfermedad, éstos reaccionarían de forma positiva a la prueba de intradermorreacción.

Dentro de los objetivos a alcanzar en el presente trabajo fue el de producir antígeno de C. psittaci para posteriormente ser utilizado en la prueba de intradermorreacción. En dicha prueba se esperó identificar a C. psittaci como el agente etiológico de la Q.C.I.O.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (C.O.P.E.A.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., ubicada en Topilejo, Distrito Federal México-Cuernavaca, con una altitud de 2,760m sobre el nivel del mar. Su ubicación geográfica es de 9°13' latitud N y 99°8' longitud O. El clima es subhúmedo templado, con una temperatura media de 10.07° C y una precipitación pluvial anual de 800-1,200 mm. La explotación es de tipo intensivo.

Procedimiento:

a) Obtención del antígeno:

Se requirió reproducir una cepa tipo de Chlamydia psittaci en embriones de pollo de 7 días de edad inoculados vía saco vitelino a diferentes diluciones decimales. Se utilizó la cepa C. psittaci LW613, originalmente aislada a partir de un cordeiro de queratoconjuntivitis y poliartritis (16), facilitada por el Dr. J. Storz, de la Universidad Estatal de Louisiana de los Estados Unidos.

Las diluciones se realizaron con el diluyente de Bovarnick, constituido por sucrosa, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , glutamato monosódico, estreptomycina y 1% de rojo de fenol en agua destilada (16). Los embriones inoculados fueron incubados a 37° C y diariamente fueron ovoscopiados para valorar viabilidad.

A los embriones muertos dentro de los 4 primeros días post-inoculación, se les realizó prueba de esterilidad en gelosa sangre (GS) y posteriormente fueron desechados.

Los embriones muertos después de los cuatro días postinoculación, se conservaron en refrigeración para realizar prueba

de esterilidad y la cosecha; la primera para desechar la posibilidad de muerte por algún contaminante y la segunda para buscar lesiones sugestivas de la infección por C. psittaci y confirmar así, la viabilidad de la cepa tipo.

Las lesiones presentes en los embriones de pollo infectados por C. psittaci son: Escaso desarrollo del embrión, congestión de los vasos sanguíneos del saco vitelino, adelgazamiento de la membrana vitelina, licuefacción y color intenso de yema, hemorragias en cabeza y tarsos.

A los embriones con este tipo de lesiones se les extrajo el saco vitelino para conservarlo en cajas de Petri estériles y realizarles improntas fijadas al calor y teñidas con la técnica de Giménez. Las improntas fueron observadas al microscopio de campo claro para confirmar la presencia de cuerpos elementales característicos del género Chlamydia (3, 15, 17).

Los sacos vitelinos que presentaron abundantes cuerpos elementales, fueron macerados con 2 ml/saco vitelino de solución de Bovarnick con 2% de suero fetal bovino y conservados a -70° C hasta obtener la cantidad de antígeno necesario (16). (Figura No. 1).

Una vez obtenida la cantidad suficiente de macerado de sacos vitelinos infectados, (48 sacos vitelinos), se procedió a elaborar el antígeno como lo describe Rodolakis y col. (citado en las referencias 5 y 22):

El macerado fue suspendido en 40 ml de solución amortiguadora de acetato con pH de 5.5, más cloruro de sodio 1 M (2.92 g) y 0.5% de formalina (0.25 ml). Esta mezcla fue homogeneizada para posteriormente dejarla en reposo por 24 horas a 4° C. Se centrifugó a 500 x g por 15 minutos a 4° C y se eliminaron los lí-

pidos acumulados en la superficie. Se procedió a centrifugar nuevamente a 27,000 x g a 4° C durante 30 minutos. Se retiró el sobrenadante para agregarle al precipitado 300 ml de solución amortiguadora de acetato con cloruro de sodio 2 M (35.06 g) y 68.1 g. de sucrosa. Se centrifugó a 27,000 x g a 4° C durante 30 minutos para obtener el sedimento y resuspenderlo en 400 ml de solución amortiguadora de acetato con cloruro de sodio 0.1 M (2.33 g). Se dejó a temperatura ambiente hasta iniciar la precipitación y luego 2 horas a 4° C. Se procedió a clarificar a 320 x g a 4° C durante 20 minutos obteniendo el sobrenadante y volviéndolo a centrifugar a 27,000 x g a 4° C por 30 minutos. El sedimento obtenido fue resuspendido en 5 ml de agua destilada estéril. Se sonificó la muestra en hielo y se liofilizó en alícuotas de 1 ml que fueron conservadas en refrigeración (5, 22). (Figura No. 2).

Para la preparación del antígeno testigo se obtuvieron 17 sacos vitelinos no infectados con aproximadamente la misma edad de los embriones infectados, evitando con ésto, alguna variación entre sus características como puede ser la cantidad de proteína contenida.

El antígeno testigo fue tratado de la misma manera que el macerado de sacos vitelinos infectados.

b) Aplicación del inóculo:

Se trabajó con 3 lotes de animales de los cuales un lote estaba constituido por 15 corderos de varias razas afectados en diversos grados con Q.C.I.O.; el segundo lote estaba constituido por 19 borregas con antecedentes de haber padecido Q.C.I.O. y el tercer lote estaba constituido por 20 borregas sin ningún antecedente al respecto.

Se identificaron perfectamente a los animales según el lote al que pertenecían y se procedió a medir con un vernier el grosor de los dos párpados inferiores de cada animal anotando los resultados (5, 22).

Se reconstituyeron las alicuotas de antígeno, cada una con 1 ml de solución salina isotónica estéril y se le aplicó a cada animal 0.1 ml del antígeno clamidial en el párpado inferior izquierdo en forma intradérmica; de la misma manera se aplicó 0.1 ml del antígeno testigo en el párpado inferior derecho de todos los animales (5, 22).

La lectura se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas postinoculación. Dicha lectura consistió en volver a medir el grosor de los 2 párpados inferiores de los animales, comparando los resultados con el grosor previo a la inoculación buscando un aumento en el grosor mayor o igual a 2 mm. para considerarlo como una respuesta positiva a la prueba (5, 22).

RESULTADOS

Dentro de los objetivos alcanzados en este trabajo fue el producir antígeno de C. psittaci (LW613-pase 12) para la realización de la prueba de intradermorreacción en el diagnóstico de la Queratoconjuntivitis infecciosa ovina, donde se observó un buen crecimiento del antígeno inoculado vía saco vitelino a embriones de pollo de 7 días de edad hasta obtener una cantidad suficiente de sacos vitelinos (48 sacos) para la elaboración del inóculo.

El rendimiento final de los sacos vitelinos infectados fue de 5 ml de antígeno.

Los cuadros 1, 2 y 3 muestran los resultados de las mediciones de los grosores de los párpados antes y después de la inoculación en los tres grupos de animales. La lectura de la prueba de intradermorreacción de los animales del primer lote fue realizada únicamente a las 72 horas. La lectura de la prueba en los lotes 2 y 3 se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas postinoculación.

En los cuadros 1, 2 y 3 se observa que no hubo aumento significativo (mayor o igual a 2 mm), en el grosor de los párpados de ninguno de los animales inoculados ya sea con el antígeno clamidial o con el antígeno testigo.

DISCUSIÓN

Estudios previos tendientes a demostrar el papel etiológico de C. psittaci en la Q.C.I.O. de los animales del C.O.P.E.A. mediante el aislamiento del microorganismo en embriones de pollo, no fueron concluyentes debido a las dificultades inherentes a este método de diagnóstico. Esto motivó el desarrollo y la aplicación de otras pruebas complementarias, tales como la Intradermorreacción.

La prueba de intradermorreacción no ha sido rutinariamente aplicada al diagnóstico de la Q.C.I.O. causada por C. psittaci, sin embargo, ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico del Aborto enzootico ovino, también causado por C. psittaci. Además, el hecho de que la intradermorreacción encuentre aplicación en el estudio de la patogenia de la queratoconjuntivitis por clamidia en cuyos experimentalmente infectados, sugiere la posibilidad de su utilización en el diagnóstico de la Q.C.I.O. causada por este mismo agente.

La ausencia de incrementos significativos en el grosor del pliegue palpebral de los animales incluidos en este estudio, es indicativo de una ausencia de hipersensibilidad celular frente al antígeno de C. psittaci. En el grupo 2 existe la posibilidad de que el estado de hipersensibilidad hubiera desaparecido tiempo después de que los animales se recuperaron de la Q.C.I.O. Sin embargo, el grupo 1 incluyó animales en diferentes fases clínicas de Q.C.I.O. unilateral o bilateral y tampoco éstos mostraron reacciones positivas frente al antígeno inoculado.

El hecho de que ningún animal resultara positivo a la prueba de intradermorreacción, podría ser interpretado en términos de que la etiología de las Q.C.I.O. observadas sea distinta a

C. psittaci.

En favor de esta interpretación se encuentran los resultados preliminares de otro estudio colateral que se está realizando actualmente en el mismo rebaño utilizando una prueba indirecta de ELISA para la determinación de anticuerpos específicos contra C. psittaci en el suero. * Sin embargo, antes de afirmar categóricamente que C. psittaci no se encuentra jugando un papel importante en la Q.C.I.O. del C.O.P.E.A., habrá que determinar en forma más precisa la utilidad diagnóstica de la intradermoreacción en animales con Q.C.I.O. por C. psittaci inducida en forma experimental. Las posibilidades de realizar un experimento de esta naturaleza están siendo estudiadas.

* Pérez, J. Comunicación personal 1988.

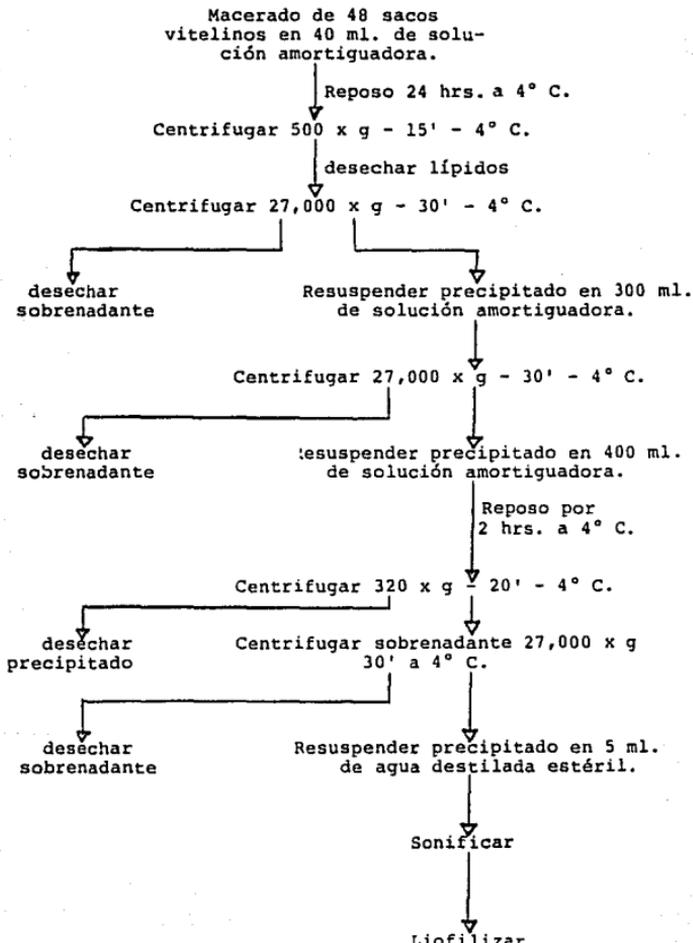
LITERATURA CITADA

1. Belschnep, H.G. : Sheep Management and Diseases. 9° ed. Angus and Robertson, London, Sydney, 1971.
2. Bohm, R., Richtner, R.E., Gilmour, M.J.L., Krauss, H., Nizchke, E., Pier, A.C., Ross, R.F., Schaal, E., Schlieber, Th., Stalheim, O.H.V. and Storz, J. : Handbuch der bakteriellen infektionen bei tieren. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. Berlín. 1985.
3. Cello, R.M. : Ocular Infections in Animals with PLT (Bedsonia) group agents. Am. J. Ophthalmol., 63 : 1270-1273 (1967).
4. Daniels, F.H. : Papel Etiológico de Chlamydia psittaci en la Queratoconjuntivitis Infecciosa Ovina en México. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1986.
5. Dawson, M., Zaghloul, A. and Wilsmore, A.J. : Ovine enzootic abortion: Experimental studies of immune responses. Res. Vet. Sci., 40 : 59-64 (1986).
6. Hiepe, T. : Enfermedades de la Oveja. Acribia, Zaragoza, España, 1972.
7. Hopkins, J.B., Stephenson, E.H., Storz, J. and Pierson, R.E. : Conjunctivitis Associated with Chlamydial Polyarthritits in Lambs. J. Am. Vet. med. Ass., 163 : 1157-1160 (1977).
8. Jensen, R. : Diseases of Sheep. Lea & Febiger, Philadelphia, 1974.
9. Jones, D.B., Liesegang, T.J. and Robinson, N.M. : Laboratory diagnosis of ocular infections. Cumitech., 13 : 1-28 (1981).
10. König, C.D.W. : Keratoconjunctivitis Infectiosa Ovis (KIO), "Pink eye" or "zere oogjes" (a survey). Vet. Q., 5 : 122-127 (1983).
11. Osuagwuh, A.J.A. and Akpokodje, J.U. : Infectious keratoconjunctivitis in goats and sheep in Nigeria. Vet. Rec., 105 : 125-126 (1979).
12. Pérez, M.J. and Storz, J. : Chlamydial infections in cattle (part 2). Modern Vet. Practice., 66 : 603-608 (1985).
13. Pérez, M.J. y Storz, J. : Género Chlamydia: Biología básica, propiedades antigénicas y potencial patogénico: Ciencia Veterinaria., 4 : 37-60 (1987).
14. Souriau, A. and Rodolakis, A. : Rapid detection of Chlamydia psittaci in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme

- linked immunosorbent assay (ELISA). Vet. Microbiol., 11 : 251-259 (1986).
15. Stephenson, E.H., Storz, J. and Hopkins, J.B. : Properties and frequency of isolation of Chlamydiae from eyes of lambs with conjunctivitis and polyarthritis. Am. J. vet. Res., 35 : 177-180 (1974).
16. Storz, J. : Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1971.
17. Storz, J., Pierson, R.E., Marriot, M.E. and Chow, T.L. : Isolation of psittacosis agents from follicular conjunctivitis of sheep. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 125 : 857-860 (1967).
18. Surman, P.G. : The isolation of Chlamydia agents from conjunctival scrapings of sheep with keratoconjunctivitis. Aust. vet. J., 55 : 401 (1979) (Abstract).
19. Tizard, I. : Inmunología Veterinaria. 2° Ed. Interamericana, México, D.F., 1985.
20. Watkins, N.G., Hadlow, W.J., Moos, A.B. and Caldwell, H.D. : Ocular delayed hypersensitivity: A pathogenetic mechanism of Chlamydial conjunctivitis in guinea pigs. Med. Sci., 83 : 7480-7484 (1986).
21. Watson, R.R., MacDonald, A.B., Murray, E.S. and Modabber, F.Z. : Immunity to Chlamydial infections of the eye. J. Immun., 3 : 618-623 (1973).
22. Wilsmore, A.J., AbdulJalil, S.A., Parsons, V.H. and Dawson, M. : Observations on a skin sensitivity test for ovine enzootic abortion. Br. vet. J., 140 : 468-477 (1983).

FIGURA No. 2

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA ELABORACIÓN DEL ANTÍGENO



CUADRO No. 1

RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DEL GROSOR DE
LOS PÁRPADOS DE LOS CORDEROS CON Q.C.I.O.

No. de Arete	Ojo	Signos de Q.C.I.O.	Medición previa a la inoculación (mm)	Medición a las 72 Hrs.	Interpretación de la prueba
5524	Der.	+	2.1	2.2	
	Izq.	-	2.1	2.2	Negativo
5527	Der.	+	2.2	2.1	
	Izq.	+	2.2	2.1	Negativo
5528	Der.	-	2.2	2.2	
	Izq.	+	2.2	2.2	Negativo
5531	Der.	+	2.2	2.2	
	Izq.	+	2.2	2.2	Negativo
5560	Der.	++	2.1	2.2	
	Izq.	+	2.2	2.2	Negativo
5582	Der.	+	2.2	2.2	
	Izq.	+	2.2	2.2	Negativo
5625	Der.	+	2.2	2.2	
	Izq.	+	2.1	2.2	Negativo
5706	Der.	-	2.2	2.2	
	Izq.	-	2.2	2.3	Negativo
5716	Der.	-	2.1	2.2	
	Izq.	+	2.1	2.2	Negativo
5742	Der.	+	2.1	2.1	
	Izq.	+	2.1	2.2	Negativo
5779	Der.	-	2.2	2.2	
	Izq.	-	2.2	2.2	Negativo
5786	Der.	-	2.2	2.2	
	Izq.	-	2.2	2.2	Negativo
5805	Der.	+	2.2	2.2	
	Izq.	+	2.1	2.2	Negativo
5832	Der.	-	2.2	2.1	
	Izq.	-	2.1	2.2	Negativo
5904	Der.	-	2.1	NR	
	Izq.	-	2.1	NR	

Der: Se inoculó 0.1 ml. del antígeno testigo en el párpado inferior derecho de cada uno de los animales.

Izq: Se inoculó 0.1 ml. de antígeno de C. psittaci en el párpado inferior izquierdo de cada uno de los animales.

- + Presencia de signos de Queratoconjuntivitis.
 - Ausencia de signos de Queratoconjuntivitis
- NR No se realizó debido a la muerte del animal.

CUADRO No. 2

RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DEL GROSOR
DE LOS PÁRPADOS DE LAS BORREGAS CON ANTECEDENTES
DE Q.C.I.O.

No. de arete	ojo	medición previa a la inoculación (mm)	medición a las 24 hrs.	medición a las 48 hrs.	medición a las 72 hrs.	medición a las 96 hrs.	Inter- preta- ción
109	Der.	3.0	3.0	3.2	3.0	3.0	
	Izg.	3.0	2.8	2.9	3.0	2.9	negativo
930	Der.	3.0	2.8	2.9	2.9	3.0	
	Izg.	3.0	2.8	2.8	2.9	2.8	Negativo
974	Der.	3.2	3.0	3.2	3.2	3.0	
	Izg.	3.0	3.0	3.0	3.1	3.0	Negativo
975	Der.	3.0	3.2	3.1	3.2	3.2	
	Izg.	3.0	3.0	3.2	3.2	3.2	Negativo
1201	Der.	2.8	3.0	3.0	2.8	3.0	
	Izg.	3.0	3.0	2.8	2.8	2.9	Negativo
1699	Der.	3.0	2.8	3.0	3.0	2.8	
	Izg.	3.2	3.0	3.0	2.9	3.0	Negativo
1729	Der.	3.2	3.0	2.8	2.8	3.0	
	Izg.	3.0	2.8	3.2	2.8	2.9	Negativo
1474	Der.	3.2	3.2	2.8	3.0	3.2	
	Izg.	3.2	2.8	3.0	3.0	3.1	Negativo
1923	Der.	3.0	3.2	2.8	2.8	3.0	
	Izg.	3.0	3.0	3.0	2.8	3.0	Negativo
1927	Der.	3.2	3.0	3.0	3.0	3.1	
	Izg.	3.2	3.0	3.2	3.0	2.9	Negativo
1970	Der.	3.0	3.2	3.2	3.2	3.0	
	Izg.	3.0	3.2	3.0	3.0	3.0	Negativo
3635	Der.	2.9	2.9	2.8	2.8	2.8	
	Izg.	3.0	2.8	2.8	2.8	3.1	Negativo
4005	Der.	3.0	2.9	2.8	2.8	2.9	
	Izg.	3.0	2.8	2.9	2.8	2.8	Negativo
4202	Der.	3.0	3.0	2.8	2.8	2.9	
	Izg.	2.8	2.8	2.8	3.0	2.9	Negativo
4203	Der.	3.0	2.8	3.0	2.8	3.0	
	Izg.	3.2	2.8	2.8	2.8	3.0	Negativo
4206	Der.	3.1	2.8	2.9	2.9	2.8	
	Izg.	3.0	2.9	2.8	2.9	2.8	Negativo
4321	Der.	2.9	2.8	2.8	2.8	2.8	
	Izg.	2.8	2.9	2.8	2.9	2.8	Negativo
4451	Der.	2.9	2.8	2.8	3.0	3.0	
	Izg.	3.0	2.8	3.0	3.2	3.1	Negativo
4655	Der.	3.0	3.0	2.8	3.0	3.0	
	Izg.	2.8	3.0	3.0	2.8	2.8	Negativo

Der: Se inoculó 0.1 ml. del antígeno testigo en el párpado inferior derecho de cada uno de los animales.

Izg: Se inoculó 0.1 ml. de antígeno de C. psittaci en el párpado inferior izquierdo de cada uno de los animales.

CUADRO No. 3

RESULTADOS DE LAS MEDICIONES DEL GROSOR
DE LOS PÁRPADOS DE LAS BORREGAS SIN ANTECEDENTES
DE Q.C.I.O

No. de arete	Ojo	Medición previa a la inoculación (mm)	medición a las 24 hrs.	medición a las 48 hrs.	medición a las 72 hrs.	medición a las 96 hrs.	Interpretación.
1980	Der.	2.9	2.9	2.5	2.9	3.0	
	Izq.	3.0	2.8	2.5	2.8	2.8	Negativo
2045	Der.	2.8	3.0	3.0	3.0	3.0	
	Izq.	2.8	3.0	3.0	3.0	3.0	Negativo
2061	Der.	3.0	3.2	3.0	2.9	3.0	
	Izq.	3.2	3.2	3.0	3.2	3.2	Negativo
2215	Der.	2.8	3.0	2.8	2.8	3.0	
	Izq.	2.8	3.0	3.0	2.8	2.8	Negativo
2219	Der.	3.0	3.0	2.8	3.0	2.8	
	Izq.	3.0	3.0	3.0	3.0	3.2	Negativo
2220	Der.	3.0	3.0	2.9	3.0	3.0	
	Izq.	3.2	3.2	3.2	3.0	3.2	Negativo
2442	Der.	2.9	3.1	3.0	3.0	3.0	
	Izq.	3.2	3.2	3.2	3.0	3.0	Negativo
2462	Der.	2.8	2.8	2.8	2.9	2.9	
	Izq.	2.8	2.9	2.5	2.5	2.8	Negativo
2486	Der.	2.8	2.8	3.0	3.0	3.0	
	Izq.	2.8	2.8	2.8	2.8	3.0	Negativo
2496	Der.	2.8	2.9	3.0	3.0	2.8	
	Izq.	3.0	2.9	2.9	2.8	2.8	Negativo
2628	Der.	3.0	3.2	3.2	3.0	3.0	
	Izq.	3.2	3.2	3.4	3.1	3.2	Negativo
2629	Der.	3.0	3.0	3.0	3.0	2.9	
	Izq.	3.0	2.8	3.0	3.0	3.1	Negativo
2630	Der.	2.9	3.0	3.0	3.2	3.2	
	Izq.	2.9	3.0	3.2	3.0	3.0	Negativo
2667	Der.	3.2	3.0	2.9	3.1	2.9	
	Izq.	3.5	3.0	3.2	2.8	3.0	Negativo
2738	Der.	3.2	2.8	2.9	3.0	3.0	
	Izq.	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	Negativo
2768	Der.	3.2	2.9	3.2	3.0	2.9	
	Izq.	3.0	3.2	3.0	3.0	3.0	Negativo
2780	Der.	3.0	2.9	2.8	3.1	3.1	
	Izq.	2.8	3.0	3.0	3.0	2.9	Negativo
2788	Der.	3.0	3.2	3.0	2.9	3.1	
	Izq.	2.8	2.9	3.0	3.0	3.1	Negativo
2880	Der.	3.0	2.8	3.0	2.9	2.8	
	Izq.	2.8	2.9	3.0	2.8	2.8	Negativo
2909	Der.	2.9	2.9	2.9	3.1	3.0	
	Izq.	3.0	2.9	3.0	3.0	2.9	Negativo

Der: Se inoculó 0.1 ml. del antígeno testigo en el párpado inferior derecho de cada uno de los animales.

Izq: Se inoculó 0.1 ml. de antígeno de C. psittaci en el párpado inferior izquierdo de cada uno de los animales.