

225  
Res



**DETERMINACION DE INFECCIONES SUBCLINICAS  
INTESTINALES POR *Chlamydia psittaci*  
EN OVINOS ADULTOS**

**TESIS PRESENTADA ANTE LA  
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FALLA DE ORIGEN**

**PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
POR  
ALEJANDRO RIVERA FLORES**

ASESOR M.V.Z. M. Sc. CRISTINA ESCALANTE OCHOA



MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 95



## **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.

**DEDICATORIAS**

**A LA MEMORIA DE MI PADRE:**

**ANTONIO RIVERA VÁZQUEZ**

**A QUIEN RECUERDO CON MUCHO CARIÑO.**

**A MI MADRE:**

**MARÍA DE LOS ÁNGELES FLORES**

**POR TODO EL CARIÑO QUE LE TENGO.**

**A MIS HERMANOS:**

**MARCELA Y EDUARDO**

**RICARDO**

**JOSÉ ANTONIO**

**ROSA ELVIRA Y PEDRO ANTONIO**

**JUAN CARLOS**

**A MIS SOBRINOS:**

**JORGE ANTONIO**

**RICARDO EMMANUEL**

**ROSA MERCEDES**

**PEDRO ANTONIO**

**PAULA**

**A CARMINA:**

**POR EL AMOR QUE SIENTO POR ELLA.**

**A MIS AMIGOS:**

**PILAR DE JESÚS**

**JORGE ESCAMILLA**

**ROBERTO MIRAMONTES**

**ANA PALOMARES**

**SABINO RAMÍREZ**

**ARMANDO RODRIGUEZ**

**FERNANDO FOSADO**

**A CRISTINA ESCALANTE.**

**A TODOS MIS TÍOS, PRIMOS Y DEMÁS AMIGOS.**

**A LA FAMILIA MARTÍNEZ RIVERA**

**AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS POR ESTAR SIEMPRE CON NOSOTROS**

**A MIS PADRES:**

**PORQUE GRACIAS A ELLOS HE PODIDO LLEGAR A CUMPLIR  
UNA DE MIS METAS, POR TODO SU APOYO Y CONFIANZA Y  
POR AYUDARME A ESTAR EN ESTE MOMENTO.**

**A MIS HERMANOS:**

**POR SU APOYO INCONDICIONAL**

**A LA M.V.Z. CRISTINA ESCALANTE:**

**POR LA GRAN AYUDA QUE HE RECIBIDO Y POR  
TODA LA CONFIANZA QUE ME HA BRINDADO**

**A LA P.M.V.Z. CARMINA MARTÍNEZ:**

**POR SU AYUDA EN LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

**A LA M.V.Z. GRACIELA TAPIA:**

**POR SU AYUDA PARA LA REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS  
ESTADÍSTICO.**

**A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO:**

**POR EL APOYO FINANCIERO OTORGADO A TRAVÉS DE SU  
PROGRAMA PAPIID IN-301592 DE LA U.N.A.M., CON EL CUAL  
SE REALIZÓ ESTA INVESTIGACIÓN.**

**A LA F.M.V.Z.:**

**POR HABERME FORMADO**

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>29</b>
<b>CUADROS.....</b>	<b>31</b>

## RESUMEN

Rivera Flores Alejandro. Determinación de infecciones subclínicas intestinales por *Chlamydia psittaci* en ovinos adultos (bajo la asesoría de M.V.Z. Cristina Escalante Ochoa).

Se realizó un estudio en dos diferentes hatos ovinos, con la finalidad de poder determinar si existen infecciones subclínicas persistentes por *Chlamydia psittaci* en hembras adultas. Fueron analizadas 94 muestras de heces procedentes del rancho C.E.P.I.E.R. de la U.N.A.M. (39 muestras), y del rancho San Isidro (55 muestras) de un productor particular, para intentar el aislamiento bacteriano. El total de muestras fueron procesadas e inoculadas, previa dilución al 50% con Sucrosa-Fosfato-Glutamina (SPG), sobre monoestratos celulares utilizando fibroblastos de ratón L-929 a una concentración de  $0.9 \times 10^5$  cel/ml, una vez infectados e incubados por 48 hs se fijaron y tificaron con la técnica de Giemsa por un tiempo de 1:30 hs de coloración con 4 seg. de decoloración. Los monoestratos se observaron en microscopio óptico con el objetivo de 40x para poder detectar las inclusiones intracitoplasmáticas características de la bacteria. De las 94 muestras analizadas, se encontró un 93.62% (88 muestras) positivas al aislamiento de *C. psittaci*, y un 6.38% (6 muestras) negativas. Con base en los resultados obtenidos se determina que no hay diferencia significativa en cuanto a los aislamientos por rancho, lo cual fue analizado por la elaboración de una prueba de  $\chi^2$ .

## INTRODUCCIÓN

El género *Chlamydia* consiste en organismos procarióticos intracelulares obligados, Gram negativos carentes de peptidoglicano que parasitan a células eucarióticas y que presentan un ciclo de desarrollo con formas infecciosa y reproductiva morfológicamente diferentes, el Cuerpo Elemental (CE) y el Cuerpo Reticular (CR) (7).

El CE es pequeño, denso y de forma esférica, aproximadamente de 200 a 300 nm de diámetro. Esta es la forma infecciosa del microorganismo, responsable de la adhesión a la célula blanco y la promoción de su internalización. Es altamente resistente al medio ambiente ya que resiste la acción de enzimas proteolíticas (26, 32).

El CR es la partícula intracelular metabólicamente activa, responsable de la multiplicación del microorganismo por fisión binaria. Éste es más grande que el CE, midiendo aproximadamente de 800 a 1000 nm de diámetro y es osmóticamente frágil (26, 32).

Las clamidias son bacterias de características particulares por las cuales durante mucho tiempo se les consideró virus. Al igual que el resto de las bacterias tienen pared celular, poseen ADN y ARN, se multiplican por fisión binaria y son sensibles a los antibióticos como la penicilina y la tetraciclina (1, 7, 24). Sin embargo; como los virus, las clamidias únicamente pueden multiplicarse dentro de la célula huésped viva y muestran un ciclo único de desarrollo en fases alternas intracelulares y extracelulares, asociadas con los dos tipos de partículas mencionadas anteriormente. (1)

El ciclo de la infección clamidial se inicia cuando el cuerpo elemental (CE) se adhiere a la membrana de la célula huésped y es introducida hacia el citoplasma por un proceso al parecer semejante a la endocitosis mediada por receptores. En la célula, el CE metabólicamente inerte se transforma en CR metabólicamente activo que se multiplica activamente mediante fisión binaria (1, 24). Las bases moleculares de este proceso de diferenciación no han sido completamente elucidadas; sin embargo, coinciden con la reducción de los enlaces disulfuro que entrelazan a la proteína principal de la membrana externa (PPME) y a otras tres proteínas menos abundantes de la membrana externa que son ricas en cisteína (24).

Después de varios ciclos de fisión binaria, los CRs se reorganizan nuevamente en la nueva progenie de CEs y la progenie infecciosa es liberada durante la lisis de la célula huésped para continuar el ciclo de infección (1, 24, 32).

Como resultado del parasitismo obligado y su capacidad de infectar a los seres humanos y otros animales, estos agentes causan un gran número de enfermedades en una amplia diversidad de individuos. En los animales domésticos, *Chlamydiae* puede ocasionar queratoconjuntivitis, infecciones placentarias y fetales, aborto, vesiculitis seminal, infertilidad, mastitis, neumonías y artritis, entre otros.

Sólo se conocen 3 especies de *Chlamydia*: *C. trachomatis* la cual, con excepción del biovar causante de la neumonitis del ratón, es patógena exclusivamente para los seres humanos, con afinidad por el tejido ocular y urogenital (16, 19); *C. pneumoniae* que es patógena para el

humano provocando problemas de tipo respiratorio (19) y por último, *C. psittaci* la cual afecta a aves y mamíferos tanto domésticos como silvestres, así como también a anfibios y reptiles e incluso al hombre (1). Recientemente, se ha propuesto una cuarta especie *C. pecorum*, la cual afecta a bovinos y ovinos (13).

El diagnóstico de clamidias se puede llevar a cabo por medio del aislamiento de la bacteria, frotis con tinciones de Giemsa, Giménez, Machiavello, Wright o Ziehl-Neelsen modificado y por medio de pruebas serológicas (1, 3, 4, 21, 28).

El aislamiento se lleva a cabo en medios biológicos como son:

- a) Cultivo celular
- b) Inoculación de embriones de pollo vía saco vitelino
- c) Inoculación de animales de laboratorio como ratón y cuye.

Los métodos de cultivos celulares establecidos utilizan líneas, tales como células McCoy (fibroblastos de ratón), una sublínea de células Hela (Hela 229 de cervix humano) y células L (clones 929 y 56 fibroblastos de ratón), entre otras (3, 4, 9, 16, 17, 21, 22).

La demostración de las inclusiones citoplasmáticas características se lleva a cabo por medio de la tinción de improntas directas a partir de órganos, tejidos o secreciones infectadas, así como de monoestratos celulares infectados, usando la tinción de Giemsa donde las inclusiones se ven basófilas, o la tinción de Giménez modificada o Machiavello donde se observan de color rojo. Para la observación directa de los cuerpos elementales se utiliza la tinción de Giménez, Wright o Ziehl-

**Neelsen modificado con los que los cuerpos elementales se observan como estructuras cocoides muy pequeñas de color rojo (21).**

**Dentro de las pruebas serológicas se encuentran la Fijación del Complemento, la cual es más usada para el diagnóstico, Inmunofluorescencia, Radioinmunoensayo y ELISA (4, 9, 16, 21, 22, 23, 29, 30).**

**La aplicación de pruebas tales como Inmunofluorescencia, ELISA o Radioinmunoensayo han significado un perfeccionamiento en el diagnóstico de infecciones en humanos, aves y animales de laboratorio (23).**

**La técnica de Inmunofluorescencia indirecta ha sido utilizada para diferenciar antigénicamente los diversos tipos de *Chlamydia*, así como para diferenciar cepas abortivas de entéricas (12).**

**Los agentes clamidiales pueden ser transmitidos por ingestión, inhalación, monta natural o inseminación artificial (1, 3, 21, 22).**

**Cepas de *C. psittaci* aisladas de bovinos y ovinos trabajadas por pruebas de reducción de placas manifiestan que los antígenos específicos pudieran ser factores de virulencia específicos de enfermedad. Con este método, las diferentes cepas fueron subdivididas en dos amplios inmunotipos. El inmunotipo 1 incluyó a cepas asociadas con abortos, enteritis e infecciones intestinales subclínicas en ambas especies. El inmunotipo 2 fue representado por cepas asociadas a conjuntivitis, poliartritis y encefalomiелitis, también en ambas especies (24).**

En los rumiantes, el intestino parece ser un hábitat natural para algunas cepas, desarrollándose así infecciones subclínicas persistentes comunes en bovinos, ovinos y caprinos (1, 31). En algunas ocasiones llegan a causar diarreas en animales jóvenes, así como a iniciar eventos de patogenicidad en diferentes órganos dando origen posiblemente a otras afecciones clamidiales como el aborto enzoótico ovino y el aborto epizoótico bovino (8, 9, 18, 31).

Los primeros signos de una infección intestinal son enteritis y diarrea, los cuales fueron estudiados en ganado recién nacido. Las clamidias fueron aisladas de mucosa de abomaso, duodeno, yeyuno, ileon, ciego y colon. Dentro de las lesiones causadas por clamidias en el tracto digestivo se encuentran: las hemorragias de las acrosas duodenal y cecal, la congestión y las petequias de la mucosa del intestino delgado, la distensión por el edema del yeyuno, la congestión con numerosas petequias de la válvula ileocecal y la hiperemia de la mucosa cecal. Los nódulos linfáticos mesentéricos se encuentran agrandados y edematosos (31).

Estudios con anticuerpos fluorescentes revelaron que las células epiteliales de las puntas de las vellosidades del intestino y de las zonas entre las mismas, así como de algunas células de las criptas de Lieberkühn y las zonas de transición estaban infectadas (31).

El aborto enzoótico ovino (AEO) causado por *Chlamydia psittaci* es la enfermedad más comúnmente diagnosticada en borregas como causante de aborto en Inglaterra. La enfermedad es reportada de muchas áreas de Inglaterra y Gales; desde las tierras bajas criadoras de ovejas en Escocia (2) y en muchas otras áreas de Europa y Norteamérica (1). Esta

enfermedad es causante de grandes pérdidas económicas. Es de gran preocupación en la industria de las ovejas, así como para un dueño independiente, no sólo por la importancia económica y las dificultades en su diagnóstico y control, sino porque el microorganismo (*C. psittaci*) puede causar infecciones en humanos (zoonosis) siendo especialmente peligroso para las mujeres embarazadas (2).

A partir de exámenes de material de campo y de un estudio cronológico de ovejas gestantes, experimentalmente infectadas, queda claro que la placentitis es el componente patológico más importante y típico del aborto enzoótico ovino (AEO) (1, 6, 24). Las membranas fetales de fetos abortados y corderos prematuros y débiles revelan cambios importantes, principalmente decoloración y necrosis de parte de los cotiledones, edema o engrosamiento del tejido intercotiledonario, aunado a un sucio exudado color de rosa que contiene escamas de material similarmente coloreado.

La lesión más importante se registra en el placentoma vascular, la oposición íntima del carúnculo endometrial con el cotiledón coriónico, que es la unidad anatómica y fisiológica para la transferencia de oxígeno y nutrientes de la madre al feto. Las clamidias que llegan al placentoma en la circulación materna infectan y se reproducen dentro de las células epiteliales trofoblásticas de las vellosidades coriónicas en las que producen inclusiones clamidiales citoplasmáticas. La infección placentomal también induce la infiltración local de macrófagos, neutrófilos y linfocitos. La característica patológica principal es la infección y destrucción de las células epiteliales coriónicas. El lado fetal del corion permanece sin afectarse.

No todos los placentomas se infectan y, en aquéllos donde sucede, el grado y la extensión del cambio inflamatorio y destructivo es variable. Sin embargo, la pérdida o reducción de la integridad funcional afecta el intercambio materno-fetal y éste probablemente sea uno de los factores fundamentales de la muerte del feto. En las últimas etapas de la gestación, las células epiteliales coriónicas constituyen la fuente principal de progesterona, la hormona responsable de mantener la gestación. Una disminución en el nivel de progesterona que cause la destrucción de estas células más que la muerte fetal, puede ser un factor desencadenante del aborto y los nacimientos prematuros.

Los cambios patológicos en el feto están confinados al desarrollo de focos inflamatorios o necróticos dentro de los órganos parenquimatosos y linfáticos y en los pulmones, piel y cerebro (1, 28, 31).

Las cabras y las ovejas clínicamente normales poseen agentes clamidiales en el tracto intestinal y excretan estos organismos en cantidades fácilmente detectables (10, 15, 18, 22, 31).

Las clamidias liberadas al medio ambiente por células de animales infectados resisten la acción proteolítica de algunas enzimas y son capaces de sobrevivir en heces secas durante algunos meses (24). Sin embargo, el alto contenido de lípidos de su pared celular las hace susceptibles a la acción microbicida de los detergentes, de solventes orgánicos y otros desinfectantes de uso común, como el formaldehído y el fenol (6, 24, 31).

Muchas ovejas que han sufrido un aborto o han tenido una infección de placenta quedan como portadores intestinales de clamidias por un

período indefinido. Un número variable de clamidias son excretadas intermitentemente en las heces teniendo un potencial de infección intestinal en otras ovejas, aunque el significado de la excreción fecal en el mantenimiento y transmisión del AEO no ha sido del todo establecido. Las ovejas gestantes portadoras intestinales de clamidias no son inmunes al AEO, mientras que las ovejas infectadas con cepas del AEO presentan anticuerpos contra las cepas intestinales. Los carneros pueden adquirir la infección intestinal y aunque las clamidias son capaces de colonizar el tejido genital e infectar el semen, no hay evidencia de que los carneros jueguen un papel importante en la transmisión del AEO (1).

Una vez que las ovejas quedan infectadas por la ingestión o inhalación de *C. psittaci* se sugiere que en primer instancia la lesión se establece en tonsilas, desde donde es diseminada por la sangre hacia otros órganos. En el organismo *C. psittaci* persiste en una forma de latencia y eventualmente en grados bajos intermitentes ocurre la clamidiosis, infectando a la placenta. El mecanismo por el cual migran las clamidias desde el lado materno (placenta) al feto es aún incierto (5).

En México no hay reportes de casos de Aborto Enzoótico Ovino; sin embargo, estudios realizados por Escalante-Ochoa, C. (1988,1991) han detectado la presencia de anticuerpos contra *C. psittaci* sugerentes de infecciones ocasionadas tanto por cepas entéricas como de aborto. Estos estudios comprenden la realización de pruebas de ELISA, Inmunofluorescencia indirecta, Fijación del complemento e Inmunoelectrotransferencia (11, 12).

Tomando en cuenta que los hatos ovinos de nuestro país se han conformado en gran parte por animales provenientes de lugares donde la clamidiosis se ha reportado como una enfermedad enzoótica y que también las ovejas clínicamente normales pueden alojar agentes clamidiales en el tracto intestinal y excretar estos organismos a través de las heces, es posible identificar infecciones subclínicas por *C. psittaci* en los diversos hatos ovinos mexicanos.

## OBJETIVO

Demostrar la presencia de *Chlamydia psittaci* en el intestino de ovinos mediante su aislamiento en cultivo celular.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.- LÍNEA CELULAR

Se utilizó la línea celular L-929, clonas de fibroblastos de ratón\* para el aislamiento de *C. psittaci*. Esta línea celular fue propagada a 37°C en botellas de poliestireno de 25 y 80 cm<sup>2</sup> utilizando el medio de cultivo celular Iscove's suplementado con 12.5% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, Estreptomicina 100 mg/ml, Vancomicina 100 mg/ml y Kanamicina 100 mg/ml. Una parte de la línea celular fue mantenida con Dimetil Sulfoxido a -196°C por si se requería su uso posterior.

### 2.- CONTROLES

Se incluyeron controles positivo y negativo a lo largo de todo el desarrollo de la investigación, los cuales fueron tratados de la forma descrita en el punto 7. Como control positivo se utilizaron monoestratos celulares infectados con la cepa intestinal T 23 de *C.*

---

\* In vitro, S.A. de C.V.

*psittaci*". Como control negativo se utilizaron monoestratos celulares no infectados.

### 3.- MUESTRAS A ANALIZAR

Se analizaron 94 muestras de heces de ovinos hembras adultas, las cuales fueron colectadas en 2 diferentes muestreos con un intervalo de tiempo de 8 a 9 meses entre cada uno. Los muestreos se realizaron en 2 diferentes ranchos:

- a) Centro de Enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R.) perteneciente a la F.M.V.Z., U.N.A.M., ubicado en Topilejo, D. F., con un total de 39 muestras. El rancho contaba con 110 vientres al momento de la colección.
- b) Rancho San Isidro, perteneciente a un productor independiente, ubicado en el Bravo, Querétaro, con un total de 55 muestras. El rancho contaba con 400 vientres al momento de la colección.

Las muestras se colocaron en frascos estériles con medio de transporte para *Chlamydia* *Sucrosa*-Fosfato-Glutamina (SPG) (Cuadro No. 1) y se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

### 4.- PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La preparación del inóculo se llevó a cabo macerando las muestras de heces con SPG, en una relación de 1 g de heces en 9 ml de SPG. El macerado se sometió a centrifugación a 3000 xg por 30 minutos a 4°C,

---

\*\* Donada por el Dr. Peter Griffiths del Laboratorio Central Veterinario, Weybridge, Inglaterra.

al término de la cual se obtuvo el sobrenadante; a éste se le agregó nuevamente SPG en una relación de 1:1, repitiéndose el proceso de centrifugación descrito hasta completar 2 ciclos. El sobrenadante final o inóculo procesado se mantuvo a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 5.- ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

La estandarización del inóculo se llevó a cabo infectando monoestratos celulares con diferentes concentraciones de la cepa T 23 de *C. psittaci*, diluyendo ésta con SPG a fin de determinar aquella dilución en la cual se observarían con más claridad las inclusiones intracitoplasmáticas producidas por el microorganismo.

Las diluciones utilizadas fueron:

- a) Neto 100 % ( $4 \times 10^8$  UFI\* /ml)
- b) 90 % ( $3.6 \times 10^8$  UFI/ml)
- c) 50 % ( $2 \times 10^8$  UFI/ml)
- d) 10 % ( $4 \times 10^7$  UFI/ml).

El procedimiento de infección se realizó tal como se describe en el inciso 7.1. A las 48 hs postinfección los monoestratos fueron teñidos con Giemsa y observados en el microscopio de campo claro.

#### 6.- ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE GIEMSA

Con base en que se han reportado diversos tiempos de coloración con Giemsa, de 1 a 5 horas, para la observación de inclusiones por *Chlamydia* se realizó la estandarización de los tiempos de coloración y

---

\* UFI = Unidades Formadoras de Inclusiones.

de decoloración sobre monoestratos infectados con la cepa intestinal T 23 de *C. psittaci*.

Los tiempos de coloración fueron de 1:00 h, 1:15 hs, 1:30 hs, 1:45 hs y 2:00 hs, mientras que los tiempos de decoloración fueron de 2, 3, 4 y 5 seg. para cada tiempo de tinción mencionado.

## 7.- PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO

### 7.1.- INFECCIÓN DE MONOESTRATOS CELULARES

De las muestras a analizar se realizaron diluciones al 50% en SPG (dilución óptima de trabajo), las cuales fueron colocadas en refrigeración durante la noche anterior a la inoculación de los monoestratos.

Para su infección, la línea celular fue colocada en viales que contienen un cubreobjetos de 13 mm de diámetro\* a una concentración celular de  $0.9 \times 10^5$  cel/ml e incubada a 37°C en el medio Iscove's suplementado.

Cuando se observó entre un 70-80% de confluencia del monoestrato celular, aproximadamente a las 15 hs de incubación, se procedió a la infección con los inóculos y la cepa control T 23 de *C. psittaci*.

Previo al momento de llevarse a cabo la inoculación, se retiró el medio y se agregó medio fresco adicionado con Polietilenglicol a una concentración de 7% peso/volumen (14) (1 ml/vial); ésto con el objeto

---

\* Trac tubes, Sterilin.

de favorecer la introducción del microorganismo al facilitar la adhesión membranal, y así aumentar la presentación de inclusiones.

Se infectaron 2 viales por muestra (100 ml muestra/vial), uno de los cuales fue utilizado para la realización de pases ciegos, cuando éstos fueron requeridos. En todo caso, el procedimiento a seguir fue el que se explica a continuación.

Una vez infectados los viales, se centrifugaron a 3500 xg por 1 hora a 25°C con el objeto de facilitar la penetración de *C. psittaci* al interior de la célula.

Posterior a la centrifugación los viales fueron incubados por 48 hs a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas las 48 hs se retiró el medio de los viales y se llevó a cabo la fijación de los monoestratos celulares con alcohol absoluto por 5 minutos al término de los cuales, previo secado a temperatura ambiente, se les agregó la tinción de Giemsa por 1:30 hs en agitación, utilizándose un tiempo de 4 seg. de decoloración. Las preparaciones fueron montadas con resina sobre portaobjetos y observadas al microscopio de campo claro, con el objetivo de 40 x.

#### 7.2.- IDENTIFICACIÓN DE *C. psittaci*

La detección de *C. psittaci* se puso de manifiesto mediante la presencia de las inclusiones intracitoplasmáticas provocadas por la misma.

La observación de éstas se llevó a cabo por medio de la Tinción de Giemsa y sólo en el caso de muestras sospechosas se utilizó la inmunofluorescencia indirecta.

En caso de no observarse inclusiones intracitoplasmáticas, se realizaron 1 ó 2 pases ciegos a partir del cultivo infectado.

Para la realización del pase ciego el cultivo era colocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante la noche (15 hs aproximadamente) y descongelado a la mañana siguiente a fin de provocar lisis celular y la consecuente liberación de los cuerpos elementales del microorganismo. Una vez realizado ésto, se tomaban 100 ml/vial para la infección de monoestratos celulares sanos, siguiendo la metodología descrita en el punto anterior.

Una muestra se determinó como positiva si el monoestrato infectado presentaba las inclusiones intracitoplasmáticas basófilas características de *C. psittaci*.

Una muestra se determinó como negativa cuando no se observaron las inclusiones intracitoplasmáticas tras la ejecución de 2 pases ciegos.

## 8.- TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se llevó a cabo la técnica de Inmunofluorescencia indirecta para la observación de muestras sospechosas, utilizándose suero policlonal de ovinos infectados con *C. psittaci*<sup>\*</sup>, y conjugado anti IgG de ovino marcado con fluoresceína<sup>\*\*</sup>.

---

<sup>\*</sup> Donado por el Dr. Andersen del Departamento de Agricultura, E.U.A.  
<sup>\*\*</sup> SIGMA, Co.

Una muestra se consideró sospechosa cuando en un segundo pase se observaron formas similares a inclusiones citoplasmáticas sin poder llegar a su plena confirmación.

Se utilizaron cubreobjetos preparados con células infectadas y se fijaron con alcohol absoluto, retirándose éste a los 5 minutos. Una vez secos, se les agregó 100 ml de suero por cubreobjetos.

Se incubaron a 37°C durante 15 minutos al término de los cuales se llevaron a cabo 2 lavados (2 minutos/lavado) con PBS (pH 7.4). Una vez lavados los cubreobjetos se les agregó 100 ml/cubreobjeto del conjugado (1:1000 por recomendación del proveedor) contrastado con azul de Evans (1:2000); tras lo cual fueron incubados y lavados en la forma descrita anteriormente.

Finalmente los cubreobjetos se montaron con resina (6 µl/cubreobjeto) sobre portaobjetos y se observaron bajo microscopio de luz ultravioleta.

## 9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MUESTRAS

Se realizó una prueba de  $\chi^2$  para homogeneidad y así poder determinar si existe alguna diferencia significativa entre los aislamientos de las muestras de los 2 ranchos.

## RESULTADOS

### ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

De las diluciones del inóculo se determinó que la dilución más adecuada para la infección de los monoestratos es aquella en la cual el inóculo y el diluyente (SPG) se encontraban en una relación 1:1, es decir 50%.

### ESTANDARIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE GIEMSA

Se determinó que el tiempo de coloración de 1:30 hs y el tiempo de decoloración de 4 seg. son los más indicados; ya que estos tiempos permiten un adecuado contraste entre célula, núcleo e inclusión, además de que permite un tiempo relativamente corto para la observación de las preparaciones (Cuadro 2).

### MUESTRAS ANALIZADAS

Los monoestratos celulares fueron preparados con una concentración celular de  $0.9 \times 10^5$  cel/ml, lo cual permite un crecimiento en los cubreobjetos entre 70-80% de confluencia a las 15 hs, que es el momento de la infección; posteriormente esta concentración celular proporciona de 80-90% de confluencia al momento de fijar las muestras, facilitando así la visualización de las inclusiones citoplasmáticas características de *C. psittaci*.

De las 94 muestras analizadas, se encontró un 93.62% (88 muestras) positivas a aislamientos de *C. psittaci* y un 6.38% (6 muestras) negativas (Figura 1).

Particularmente, en el caso del rancho de la U.N.A.M. (C.E.P.I.E.R.), de un total de 39 muestras se obtuvo un 92.30% (36 muestras) de aislamientos, mientras que el restante 7.70% (3 muestras) fue de muestras negativas. Así mismo, del rancho San Isidro con 55 muestras, los aislamientos fueron del 94.55% (52 muestras) y un 5.45% (3 muestras) fueron negativas.

En cuanto a los aislamientos por tiempo de muestreo, tenemos que en el primero de ellos los aislamientos fueron del 95.45% (42 muestras) con un 4.55% (2 muestras) de negativos, y en el segundo de 92% (46 muestras) con un 8% (4 muestras) de negativos (Cuadro 3).

Del total de las muestras positivas fueron identificadas 60 en una primera infección (68.18%), 23 muestras al primer pase (segunda infección) (26.13%) y, finalmente 5 muestras (5.68%) fueron identificadas al segundo pase (tercera infección) (Figura 2).

Con base en los datos anteriores y observando los resultados obtenidos en cada rancho, tenemos que en el caso de C.E.P.I.E.R. con un total de 36 muestras positivas, los aislamientos en la primera infección fueron de 25 (69.44%), 8 muestras en un primer pase (22.22%) y 3 de ellas se identificaron en un segundo pase (8.33%). En el rancho San Isidro con 52 muestras positivas, 35 de ellas (67.30%) se determinaron en una primera infección, 15 (28.84%) en un primer pase y 2 muestras (3.84%) en una tercera infección.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS MUESTRAS**

Una vez que se realizó la prueba de  $\chi^2$ , el resultado que se obtuvo fue de 0.17, por lo tanto no existe diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de los 2 ranchos (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos, se demuestra que un alto porcentaje de ovejas adultas (93.62%) son portadoras de *Chlamydia psittaci*. Estos aislamientos pueden ser debidos a 2 posibles causas, la primera y más importante es que el rebaño haya adquirido a la bacteria (*C. psittaci*) como causante de aborto o de cualquier otra enfermedad clamidial, y una segunda causa puede ser debida a infecciones intestinales subclínicas persistentes como ha sido reportado en estudios previos (1, 20, 22, 24).

Una vez que los animales entran en contacto con el microorganismo éste puede permanecer en un estado de latencia y en un momento dado resurgir cuando las condiciones se lo permitan. Así, este evento puede ser detectado cuando los niveles de anticuerpos son captados por diferentes pruebas serológicas, como son Inmunofluorescencia Indirecta, Fijación del Complemento e Inmunolectrotransferencia, observando que las 3 pruebas reaccionan tanto en cepas entéricas como abortivas (12).

Debido a que se están obteniendo los aislamientos a partir de ovejas clínicamente sanas tal como lo reporta la literatura (10, 15, 25) se demuestra que se encuentran bajo una infección subclínica, ya que no presentan ningún tipo de signología sugerente de enfermedad, como podrían ser diarreas, poliartritis y conjuntivitis excretando a la bacteria (*C. psittaci*) en cantidades fácilmente detectables a través de las heces (31) y, por lo tanto, el cordero al nacer puede adquirir al microorganismo por ingestión e inhalación (20) quedando como portador. Particularmente en el caso de las hembras, una vez que están

gestantes, la bacteria lleva a cabo su tropismo al llegar a las células epiteliales trofoblásticas y provoca así la placentitis característica por la cual se lleva a cabo el aborto.

En lo que a la línea celular se refiere, este trabajo de tesis difiere de lo reportado por Johnson *et al.* en 1983 (17), ya que estos autores recomiendan una concentración celular de  $1.5 \times 10^5$  cel/ml, la cual tuvo que ser disminuida hasta la concentración de  $0.9 \times 10^5$  cel/ml con la que se trabajó debido a que de esta manera se obtuvieron mayores facilidades para la observación de los monoestratos, ya que esta concentración permite un crecimiento celular adecuado a los tiempos de infección y tinción evitando sobrecrecimiento de células y, por lo tanto, mejorando la distribución de las mismas en los cubreobjetos.

De las muestras procesadas utilizadas para este estudio se elaboraron diluciones al 50% con sucrosa-fosfato-glutamina (SPG) las cuales fueron utilizadas como diluciones de trabajo, este manejo de diluciones se llevó a cabo con la finalidad de que se observaran con más claridad las inclusiones intracitoplasmáticas provocadas por *C. psittaci*, ya que se contaba con un marco de referencia con idénticas diluciones de la cepa control T 23 de este microorganismo. En dicho trabajo se observó que a diluciones mayores (90 y 100%) al transcurrir el tiempo de incubación (48 hs) y llevar a cabo la observación por medio de la tinción de Giemsa se observa una gran cantidad de cuerpos elementales y difícilmente se encuentran inclusiones intracitoplasmáticas, en contraparte a concentraciones menores (10%) se observan muy pocas inclusiones aumentando la dificultad de búsqueda y visualización de las mismas.

La técnica de tinción de Giemsa que se llevó a cabo para la detección de inclusiones intracitoplasmáticas características de *Chlamydia psittaci*, difiere a lo reportado por Schachter en 1991 (27), en lo que se refiere a tiempos de decoloración, ya que el tiempo de tinción recomendado es aquel que va desde 1 hasta 5 horas y un tiempo de decoloración indefinido, y el utilizado para el presente trabajo fue de 1:30 hs de tinción utilizando 4 seg. de decoloración, con lo cual se obtenían buenos resultados ya que se mejoraba la visualización de las inclusiones y a la vez se disminuía el tiempo de trabajo.

Lo mencionado anteriormente se fundamenta en el trabajo realizado con distintos tiempos de tinción (1:00, 1:15, 1:30, 1:45 y 2:00 hs) y decoloración (2, 3, 4 y 5 seg.), determinándose que con tiempos de 1 a 1:15 hs con todas las combinaciones de decoloración se observa un mal contraste citoplasmático debido a una coloración deficiente, en cuanto a los tiempos de tinción 1:30, 1:45 y 2:00 hs con 2 y 3 seg. de decoloración se observa un mal contraste citoplasmático debido esta vez, a una coloración excesiva; mientras que con tiempos de tinción de 1:30, 1:45 y 2:00 hs con 4 y 5 seg. de decoloración, se observa un buen contraste entre célula, núcleo e inclusión.

Ahora bien, teniendo en consideración el tiempo de trabajo y tomando en cuenta que se obtenían los mismos resultados en cuanto a los tiempos 1:30, 1:45 y 2:00 hs de tinción con 4 y 5 seg. de decoloración, se decidió utilizar el de 1:30 hs con 4 seg., ésto con la finalidad de disminuir el tiempo de trabajo.

Tomando en cuenta los datos arrojados por este estudio, aparentemente las condiciones ambientales, de manejo y la alimentación no influyen

en la presentación y aislamiento de *C. psittaci* en los ovinos de las explotaciones analizadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los animales se encuentran con infecciones subclínicas, las cuales pueden llegar a desencadenar alguna de las múltiples enfermedades clamidiales, siendo importante reafirmar que la contaminación fecal juega un papel importante en la transmisión y la diseminación de la clamidiosis en cualquier hato ovino infectado.

## LITERATURA CITADA

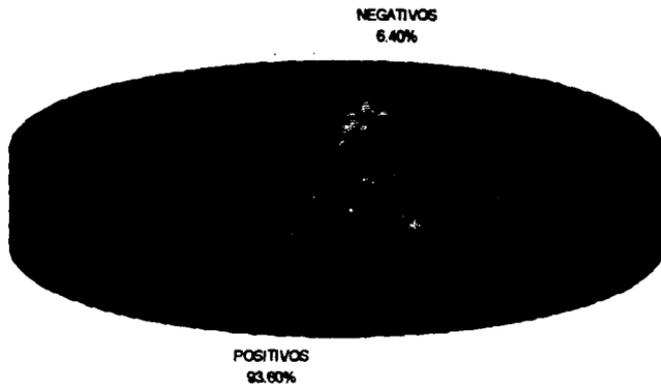
1. AITKEN, I. D.: Enzootic (chlamydial) abortion. Diseases of sheep. Blackwell Scientific Publications, Oxford., 119-123 (1983).
2. AITKEN, I. D., CLARKSON, M. J. and LINKLATER, K.: Enzootic abortion of ewes. Vet. Rec., 136-138 (1990).
3. ALLAN, I. and PEARCE, J. H.: Amino acid requirements of strains of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* growing in McCoy cells: relationship with clinical syndrome and host origin. J. Gen. Microbiol., 129: 2001-2007 (1983).
4. ANDERSEN, A. A.: Comparison of avian *Chlamydia psittaci* isolates by restriction endonuclease analysis and serovar-specific monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol., 29: 244-249 (1991).
5. ANDERSEN, A. Chlamydia. In GYLES, C. L. and THOEN, C. O.: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2nd ed. Iowa, State University. PRESS/AMES (1993)
6. ANDERSON, I. E., TAN, T. W., JONES, G. E. and HERRING, A. J.: Efficacy against ovine enzootic abortion of an experimental vaccine containing purified elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. Vet. Microbiol., 24: 21-27 (1990).
7. BECKER, Y.: The *Chlamydia*: molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryocytes. Microbiol. Rev., 42: 274-306 (1978).
8. BUZONI-GATEL, D., LAYACHI, K., DUBRAY, G. and RODOLAKIS, A.: Comparison of protein patterns between invasive and non-invasive ovine strains of *Chlamydia psittaci*. Res. Vet. Sci., 46: 40-42 (1989).

9. DAWSON, M., ZAGHLOUL, A. and WILSMORE, A. J.: Ovine enzootic abortion: experimental studies of immune responses. Res. Vet. Sci., **40**: 59-64 (1986).
10. DIXIT, S. N. and KAIRA, D. S.: A note on the isolation of *Chlamydia* from faeces of apparently healthy sheep. Indian J. Anim. Sci., **49**: 863-865 (1979).
11. ESCALANTE, O. C.: Determinación de anticuerpos contra *Chlamydia psittaci* en ovinos adultos del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (COPEA), mediante una prueba indirecta de ELISA. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., (1988).
12. ESCALANTE, O. C.: Comparative serological investigation of a sheep flock from México for evidence of *Chlamydia psittaci* infection. Tesis de maestría. University of Surrey, United Kingdom, (1991).
13. FUKUSHI, H. and HIRAI, K.: Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. I. J. of Systematic Bacteriol., **42**: 306-308 (1992).
14. GIBSON, J. P., EGERER, R. M. and WIEDBRAUK, D. L.: Improved isolation of *Chlamydia trachomatis* from a low-prevalence population by polyethylene glycol. J. Microbiol., **31**: 292-295 (1993).
15. GRIFFITHS, P. C., PHILIPS, H. C., DAWSON, M. and CLARKSON, M.J.: Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin. Vet. Microbiol., **30**: 165-1667 (1992).
16. HELMUT, N. and DETLEF, P.: The significance of the ipazyme IgA and IgG antibody test in the diagnosis of urogenital chlamydial infections. Zbl. Bakt. Hyg., **270**: 373-378 (1989).

17. JOHNSON, F. W. A., CLARKSON, M. J. and SPENCER, W. N.: Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell cultures. Vet. Rec., **113**: 413-414 (1983).
18. JOHNSON, F. W. A.: Abortion- continuing foetal problem: enteric infections in sheep associated with enzootic abortion (*Chlamydia psittaci*). Irish Vet. News, 10-15 (1984).
19. OSSER, S. and PERSSON, K.: Immune response to genital chlamydial infection and influence of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) antibodies. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **8**: 532-535 (1989).
20. PEREZ-MARTINEZ, J. A. and STORZ, J.: Chlamydial infections in cattle part 1. Modern Veterinary Practice, (1985).
21. PEREZ-MARTINEZ, J. A. and STORZ, J.: Chlamydial infections in cattle part 2. Modern Veterinary Practice, 603-608 (1985).
22. PEREZ-MARTINEZ, J. A. and STORZ, J.: Persistent infection of L-cell with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. Infect. Immunol., **50**: 453-458 (1985).
23. PEREZ-MARTINEZ, J. A., SCHMEER, N. and STORZ, J.: Bovine chlamydial abortion: Serodiagnosis by modified complement-fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., **47**: 1501-1506 (1986).
24. PEREZ-MARTINEZ, J. A.: Género *Chlamydia*: biología básica-propiedades antigénicas y potencial patogénico. Ciencia Veterinaria, **4**: 37-49 (1987).
25. PHILIPS, H. L. and CLARKSON, M. J.: Culture of sheep *Chlamydia* in a sheep fibroblast cell culture. Resch. in Vet. Sci., **53**: 267-268 (1992).
26. SCHACHTER, J.: The intracellular life of *Chlamydia*, Current topics in Microbiol. and Immun., **138**: 109-139 (1988).

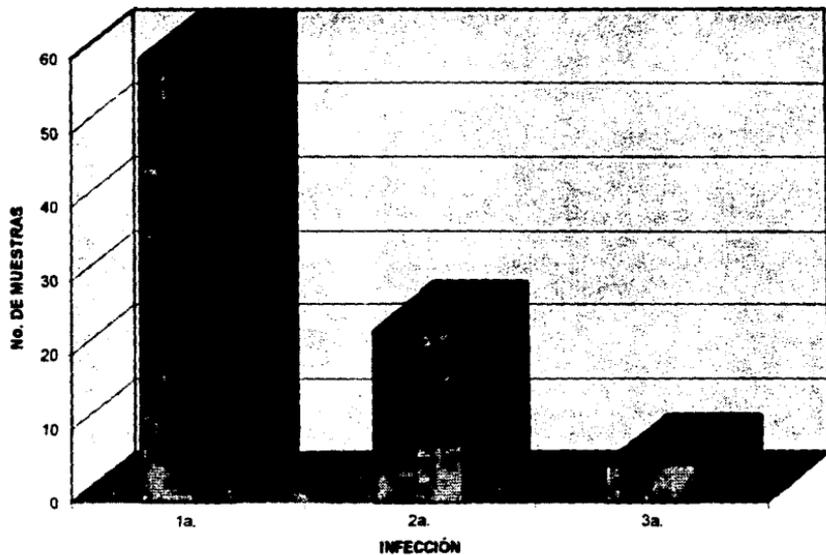
27. SCHACHTER, J.: Chlamydiae. In: Manual of Clinical Microbiology. Edited by: Balows, A., Hausler, W.J., HERRMANN, K.L., ISENBERG, H.D. and SHADOMY, H.J. 5th ed. American Society For Microbiology, Washington, D. C. (1991).
28. SEAMAN, J. T.: Chlamydia isolated from abortion in sheep. Aust. Vet. J., **12**:436 (1985).
29. SOURIAU, A. and RODOLAKIS, A.: Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goat by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Vet. Microbiol., **11**: 251-259 (1986).
30. STAMP, J. T., WATT, J. A. A. and COCKBURN, R. B.: Enzootic abortion in ewes. J. Comp. Path., **62**: 93-101 (1952).
31. STORZ, J.: Microbiology of Chlamydia. Almen L. Barron, E.E.U.U. (1988).
32. WYRICK, P. B. and RICHMOND, S. J.: Biology of Chlamydiae. JAVMA., **195**: (11) 1507-1512 (1989).

**Figura No. 1. Porcentaje de aislamientos de *Chlamydia psittaci* a partir de 94 muestras de heces de ovinos adultos.**



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Figura No.2. Detección a diferentes fases de inclusiones citoplasmáticas por *Chlamydia psittaci* en fibroblastos de ratón (L-929) infectados a partir de muestras de heces de ovinos adultos clínicamente sanos.**



## CUADROS

## CUADRO No. 1

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE  
SUCROSA-FOSFATO-GLUTAMINA (SPG)

SUCROSA	74.6 g/l
KH PO	0.512 g/l
K HPO	1.237 g/l
L-ÁCIDO GLUTÁMICO	0.721 g/l
<hr/>	
<b>ESTERILIZAR POR AUTOCLAVE Y AGREGAR</b>	
SFB	10%
VANCOMICINA	100 mg/ml
ESTREPTOMICINA	100 mg/ml
NISTATINA	50 mg/ml
GENTAMICINA	50 mg/ml
<b>PUEDA SER USADO COMO MEDIO DE TRANSPORTE, DILUENTE Y MEDIO PARA CONGELACIÓN DE <i>Chlamydia</i></b>	

CUADRO No. 2

**DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS UTILIZADOS EN LA TINCIÓN DE GIEMSA  
PARA LA VISUALIZACIÓN ÓPTIMA DE LAS INCLUSIONES  
INTRACITOPLASMÁTICAS POR  
*Chlamydia psittaci***

FASE DE COLORACIÓN (horas)	FASE DE DECOLORACIÓN (segundos)			
	2	3	4	5
1:00	A	A	A	A
1:15	A	A	A	A
1:30	B	B	C	C
1:45	B	B	C	C
2:00	B	B	C	C

- A: Mal contraste del contenido citoplásmico debido a coloración deficiente.  
 B: Mal contraste del contenido citoplásmico debido a coloración excesiva.  
 C: Buen contraste del contenido citoplásmico.

## CUADRO No. 3

AISLAMIENTOS DE *C. psittaci* A PARTIR DE HECES DE OVINOS  
 ADULTOS EN DOS MUESTREOS

RANCHO	PRIMER MUESTREO				SEGUNDO MUESTREO			
	POSITIVOS			NEG.	POSITIVOS			NEG.
	1a. Inf.	2a. Inf.	3a. Inf.		1a. Inf.	2a. Inf.	3a. Inf.	
CEPIER	12	3	1	-	13	5	2	3
SAN ISIDRO	20	5	1	2	15	10	1	1

No. total de muestras: C.E.P.I.E.R. = 39

SAN ISIDRO = 55

CUADRO No. 4

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

PRUEBA DE  $\chi^2$ 

	<b>RANCHO SAN ISIDRO</b>	<b>RANCHO C.E.P.I.E.R.</b>
<b>POSITIVOS</b>	Esperado: 51.48% Observado: 52%	Esperado: 36.48% Observado: 36%
<b>NEGATIVOS</b>	Esperado: 3.51% Observado: 3%	Esperado: 2.48% Observado: 3%

$$\chi^2 = 0.17$$