



**AVANCES REALIZADOS DE 1983  
A 1993 EN EL DIAGNOSTICO DE  
Chlamydia psittaci: ESTUDIO  
RECAPITULATIVO.**



Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Para la obtención del título de:  
Médico Veterinario Zootecnista  
Por  
**ANA BERTHA CORTES DORANTES**

**ASESOR: MVZ. M Sc. CRISTINA ESCALANTE OCHOA**

**MEXICO, D.F.**

**DICIEMBRE, 1995**

**FALLA DE ORIGEN**



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.

**AGRADECIMIENTOS:**

A todo los hombres les gusta creer,  
que pueden hacer las cosas s3los,  
pero un hombre en verdad,  
sabe que no hay nada como el apoyo,  
el est3mulo y un equipo (mi familia).  
Tien Allen.

Todo le llega a quien se afana,  
mientras trabaja esperando .  
T3mas A. Edison.

Agradezco a DIOS por todo su amor,  
manifestandose en cada paso  
que doy por mi vida.  
*Am3 Cort3s de Chigoro.*

### III

**A mi mamá (Carol Dorantes)  
por enseñarme con todo su amor a afrontar  
la vida con perseverancia y optimismo.**

**A mi Daddylucito (Enrique Cortés),  
por su cariño incondicional y su apoyo  
al guiarme en las decisiones importantes de mi vida.**

**A mi Mila por todo su cariño  
que siempre la ha distinguido.**

**Al compañero de toda mi vida,  
Mario Cházaro,  
por mantenerme siempre entusiasta;  
con tu apoyo y  
con tu inmenso amor,  
permitiendo, así mi realización  
como mujer y profesionalista.**

#### IV

Y mi más grande amor,  
tú, mi Joshua (Du)  
por la alegría que me has dado todos los días;  
al ser la chispa de mi vida.

Con sinceridad al Ing. Evelio Aris y a Ing. Marisela  
del Depto. Ingeniería en Sistemas de las oficinas de Pemex, en  
Mocambo, Veracruz, por su apoyo brindado.  
Y en especial a Esperanza Espinoza  
por mecanografiar parte de este trabajo.

A mi asesora MVZ: Cristina Escalante por su  
confianza y gran paciencia, durante estos años.

A mis familiares y amigos,  
que de alguna forma  
me ayudaron a alcanzar esta meta.

Con especial cariño a Joel Rojas  
por colaborar en la realización de este trabajo.

**V**

**A todos los doctores de mi querida FMVZ,  
quienes ayudaron en mi formación  
como persona y profesionalista.**

**A mis sinodales que ayudaron al perfeccionamiento  
de este trabajo, MVZ. Alejandro De la Peña,  
MVZ. Rosa Elena Miranda,  
MVZ. Edgar Alfonseca, MVZ. Marcela Figueras  
y  
MVZ. Cristina Escalante.**

## VI

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	3
1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO <i>Chlamydia</i> ...	4
1.2. CICLO DE DESARROLLO.....	5
1.3. ANTIGENOS CLAMIDIALES.....	7
1.4. METABOLISMO DE <i>Chlamydia</i> .....	9
1.5. ESPECIES SUSCEPTIBLES.....	11
1.6. METODOS DE DIAGNOSTICO.....	12
II. METODOS BACTERIOLOGICOS.....	15
2. METODOS DE TINCION.....	15
2.1. TINCION DE GIMENEZ.....	17
2.2. TINCION DE GIEMSA.....	18
3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR.....	19
III. METODOS SEROLOGICOS.....	29
3.1. METODOS SEROLOGICOS DE UNION PRIMARIA.....	30
3.1.1. INMUNUFLUORESCENCIA.....	30
3.1.2. ELISA.....	32
3.1.3. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.....	42
3.1.4. INMUNOPEROXIDASA.....	44
3.2. METODOS SEROLOGICOS DE UNION SECUNDARIA.....	46
3.2.1. AGLUTINACION.....	46
3.2.2. FIJACION DE COMPLEMENTO.....	48
IV. PRUEBA INTRADERMICA.....	52
V. HIBRIDACION CON SONDA DE ADN.....	54
VI. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	55
LITERATURA CITADA.....	57

## R E S U M E N

**CORTES DORANTES, ANA BERTHA:** Avances realizados de 1983 a 1993 en el diagnóstico de *Chlamydia psittaci*: estudio recapitulativo (bajo la dirección de MVZ. Cristina Escalante Ochoa).

Se utilizó información proveniente del Banco de Información Veterinaria (BIVE) y del programa FOCUS ON del Institute for Scientific Information, utilizando diferentes discos de información referente a los métodos de diagnóstico para *C. psittaci*. Analizándose métodos tales como tinciones de frotis, el aislamiento de la bacteria en cultivo celular y métodos serológicos como ELISA, inmunoelectrotransferencia, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, aglutinación en látex, fijación de complemento también abarca una prueba intradérmica, además técnicas sofisticadas como hibridación con sonda genética con ADN y la reacción en cadena de la polimerasa. Observando que la sensibilidad y especificidad de las técnicas disponibles para *Chlamydia*, depende del tipo de anticuerpo empleado y del antígeno elegido para su identificación. La elección de la técnica dependerá de la disponibilidad del material para llevarse al cabo el diagnóstico veterinario.

## AVANCES REALIZADOS DE 1983 A 1993 EN EL DIAGNOSTICO DE *Chlamydia psittaci* : ESTUDIO RECAPITULATIVO.

### I. INTRODUCCION:

La clamidiosis es un término que abarca a un sin número de manifestaciones clínicas y subclínicas producidas por el patógeno *Chlamydia spp.*

En 1993 en París se detectó por primera vez una infección transmitida de un papagayo al hombre, causándole síntomas de resfriado. La enfermedad se denominó psittacosis que proviene del latín *psittacus* que significa papagayo (39).

Bedson y Western (1930) aislaron a *Chlamydia psittaci* a partir de muestras de ave y posteriormente Simpson de muestras de hombre (15).

En Escocia en 1950, Stamp *et al.* aislaron por primera vez esta bacteria a partir de aborto ovino. Su importancia como causante de enfermedad se incrementó al manifestarse la infección en personas que tuvieron contacto con animales enfermos (121). Hasta 1966 *Chlamydia* se consideraba un virus y fue Moulder quien observó que era una bacteria (Ver cuadro 1) (37,78).

**Cuadro 1. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE CHLAMYDIA.**

CARACTERISTICAS	CLAMIDIAS	VIRUS	BACTERIAS
DIAMETRO MENOR 300nm.	-	+	-
CRECIMIENTO EN MEDIO INERTE.	-	-	+
FISION BINARIA.	+	-	+
ADN Y ARN.	+	-	+
RIBOSOMAS.	+	-	+
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.	+	-	+
SENSIBILIDAD A GAMMA INTERFERON	+	+	-
MEMBRANA EXTERNA SIMILAR A BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.	+	-	+
ENZIMAS METABOLICAMENTE ACTIVAS.	+	-	+

Posteriormente se les consideró dentro del grupo de *Rickettsia* pero al encontrarse que a diferencia con estos organismos, la clamidia carece de sistema de transporte de electrones, citocromos y no sintetizan ATP ni GTP se les clasificó en un orden independiente de microorganismos bacterianos (133).

### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENERO *Chlamydia*.

Moulder *et al.* (1974) llamaron a *Chlamydia* parásito de energía, ya que no tiene habilidad de sintetizar compuestos de alta energía como el ATP y GTP por lo que utilizan el de la célula huésped para obtener su energía (79).

Las clamidias son microorganismos procarióticos, esféricos de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, inmóviles, intracelulares obligados que no tienen habilidad para replicarse en células tratadas con linfocinas (32,92). Se pueden clasificar como bacterias Gram negativas pero difieren de este grupo bacteriano en su singular morfología, su ciclo de desarrollo y sus grupos de antígenos (133).

Este agente patógeno pertenece al orden: *Chlamydiales*, familia: *Chlamydiaceae* con varias especies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, ambas como patógenos principales del hombre, y *C. psittaci* que afecta una gran gama de animales e incluso al hombre; siendo propuesta recientemente una cuarta especie, *C. pecorum* (Fukushi *et al.*, 1992) (42). Esta clasificación taxonómica, sin embargo, no es totalmente satisfactoria ya que no se consideran los reportes de clamidia como agente infeccioso en animales invertebrados (13).

*C. pecorum* se aisló por primera vez en 1953 a partir de cerebro de becerro que había presentado encefalomiелitis esporádica bovina. Posteriormente, se aisló a partir de animales con neumonía, encefalomiелitis y poliartritis, y de heces de animales sanos (42). Entre los parámetros considerados por Fukushi *et al.*, para diferenciarla de *C. psittaci* se encuentra la morfología de las inclusiones. (Ver cuadro 2).

Por inmunoelectrotransferencia de la proteína de la membrana externa se encontraron 3 serovariedades de *C. pecorum* (13,42,81).

**Cuadro 2. DIFERENCIAS ENTRE *C. psittaci*, *C. pecorum* Y *C. trachomatis*.**

CARACTERISTICA	<i>C. psittaci</i>	<i>C. pecorum</i>	<i>C. trachomatis</i>
MORFOLOGIA DE INCLUSION	VARIABLE, DENSA.	OVAL, DENSA.	OVAL, DIFUSA.
CONTENIDO DE GLUCOGENO.	NO.	NO.	SI
SUSCEPTIBILIDAD A SULFONAMIDAS.	NO	SI	SI
HOSPEDADORES NATURALES.	AVES, MAMIFEROS.	BOVINOS, OVINOS.	HUMANO, RATON.
TINCION DE INCLUSION CON YODO.	NO	NO.	SI
Mol % G+C.	41.3	39.3	44-45

En *C. psittaci* se han encontrado 8 biotipos basándose en la morfología de las inclusiones intracitoplasmáticas y su comportamiento en cultivos celulares (92).

Pérez-Martínez y Storz (1985) estudiaron 25 aislamientos por microinmunofluorescencia y encontraron 9 inmunotipos que se relacionan con los biotipos encontrados por Spears y Storz (1979) al analizar 29 aislamientos de *C. psittaci* de diferentes hospedadores como borrego, ganado bovino, ratón, conejo, cobayo, cerdo, gato y papagayo de diferentes enfermedades tales como: aborto, conjuntivitis, poliartritis, enteritis, vesiculitis seminal, encefalomiелitis esporádica, diarrea y de animales aparentemente sanos (37,92).

Las clamidias libres en el medio resisten la acción proteolítica de algunas enzimas y son capaces de sobrevivir en materia fecal por algunos meses. Sin embargo, por el alto contenido de lípidos en su pared celular son susceptibles a los detergentes, solventes orgánicos, formaldehído, fenol y al calor. Las clamidias son susceptibles además a algunos antibióticos como las tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y penicilina, aunque por ser de tipo intracelular su estancia en el individuo es persistente (92).

## 1.2. CICLO DE DESARROLLO.

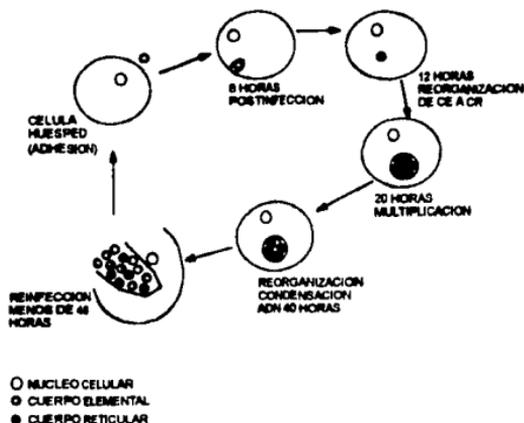
Para llevar al cabo su multiplicación intracelular la clamidia realiza un ciclo de desarrollo muy particular. La partícula infecciosa es el cuerpo elemental (CE) que es circular y mide 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro, conteniendo un nucleóide electrodenso donde se encuentra la mayor parte de ADN. Los CE nunca se dividen siendo su única función infectar células. Los cuerpos reticulares (CR) que es la forma de replicación, son circulares y miden 0.5-1  $\mu\text{m}$ , el ADN distribuido en todo el citoplasma (11).

El ciclo inicia cuando el microorganismo penetra a la célula, por medio de endocitosis inducida por el CE, siendo innecesaria la presencia de ATP, al no depender esta actividad del microorganismo. Varios estudios sugieren la presencia de receptores específicos para las diferentes cepas de *Chlamydia*. Al penetrar el CE a la célula huésped queda contenido en una vacuola, logrando inhibir la fusión fagolisosomal por medio de un mecanismo desconocido; siendo para esto necesario que los antígenos de superficie de clamidia estén intactos (13,39,92).

El CE se reorganiza en unas horas en una partícula más grande llamada CR. El CR dentro de la vacuola unida a la membrana aumentando de tamaño y se divide por fisión binaria. Después de varios ciclos de fisión los CR se reorganizan en CE y la progenie infecciosa se libera por medio de la lisis celular (13,39,92,133). (Ver fig. 1).

El ciclo de desarrollo requiere en promedio de 20-48 horas dependiendo de la cepa infectante.

**FIG. 1. CICLO DE DESARROLLO DE CLAMIDIA.**



### 1.3. ANTIGENOS CLAMIDIALES.

Todos los miembros del género *Chlamydia* poseen varios tipos de antígenos, clasificándose en antígenos de grupo, antígenos específicos de especie y antígenos específicos de serovariedad. La función biológica de los antígenos en los estadios iniciales de infección de clamidia son: aproximación a la célula huésped, adherencia, endocitosis inducida, obtención de nutrientes celulares, inhibición de la fusión fagolisosomal y toxicidad (13,92). Allan y Pearce (1983) sugirieron que la disminución de triptofano actúa como un mecanismo de defensa por parte de la célula huésped infectada con clamidia, además de la intervención de gamma interferón (3).

Las clamidias comparten un Ag específico de género que es termoestable y cuya naturaleza química es de glicolípido con constituyentes típicos de LPS como, ácido 2ceto-3desoxioctónico (KDO), D-glucoamida, ácidos grasos hidroxílicos de

cadena larga y fosfato. El Ag de clamidia esta compuesto por un LPS que posee una parte del lipido A que es similar al de enterobacterias y 3 residuos de KDO. No se sabe la función biológica del LPS clamidial, aunque por su naturaleza tal vez sea el que permite la existencia intracelular de la bacteria al inhibir la fusión fagolisosomal. Este antígeno está presente en toda las fases del ciclo evolutivo (92).

Schachter y Caldwell (1980) describieron un antígeno termolábil específico del género *Chlamydia*, pero aún no ha sido bien caracterizado. Los anticuerpos para este grupo de antígenos se detectan por medio de fijación de complemento e inmunofluorescencia (112).

Los antígenos que confieren especificidad de especie y de serovariedad son principalmente epítopes de una proteína principal de la membrana externa (PPME) que en el caso de *C. psittaci* posee un peso molecular de aproximadamente 40.5 kDa (9,31,35,114). Los antígenos específicos sólo son compartidos por un pequeño grupo de clamidias, pero una clamidia puede contener varios antígenos específicos (39,61). La función biológica de los antígenos específicos de serovariedad es aún desconocida, pero parecen representar factores de virulencia que operan en las fases iniciales del proceso infeccioso; modulando la adherencia, endocitosis inducida, inhibición de la fusión fagolisosomal, toxicidad y la respuesta inmune del huésped (92).

Por medio de un análisis estructural se mostró que la PPME de *C. psittaci* y *C. trachomatis* son antigénicamente distintas y mediante análisis con anticuerpos monoclonales y sueros policlonales inducidos con moléculas de PPME desnaturalizadas con duodecil sulfato de sodio, se identificaron epítopes específicos de especie, de subespecie y de serovariedad, lo que demostró que la PPME de *Chlamydia* es un antígeno de estructura compleja (11,92).

Wills y Watson (1990) observaron por medio del análisis de electroforesis con gel de agarosa al 1% , teñido con bromuro de etidio, a un plásmido clamidial diferente al resto de plásmidos observados, siendo la presencia de éste, útil para marcar la

diferencia taxonómica de *C. psittaci* que afecta a equinos, también se encontró un plásmido a partir de *Chlamydia* cepa aviar, cuyo peso es de 7.9kb; aunque aún no se saben las funciones que desempeñan los plásmidos, se ha observado su presencia durante la infección celular (133,140).

#### 1.4. METABOLISMO DE *Chlamydia*.

Clamidia es un microorganismo considerado como parásito dependiente de energía, por lo que realizar estudios sobre su metabolismo es sumamente difícil, debido al laborioso procedimiento de aislamiento y desarrollo en medios biológicos (137).

El CR tiene la capacidad de sintetizar su propio ADN, ARN y proteínas (133). Weiss *et al.*, (1970) observaron la conversión de glucosa en  $\text{CO}_2$  y piruvato a partir de suspensiones de *C. psittaci* (cepa de meningoencefalitis) y de *C. trachomatis* (cepa TE55 LGV), posteriormente se demostró que esto realmente sucedía a partir de glucosa-6-fosfato y no de glucosa como tal (136).

Sólo algunas de las enzimas que intervienen en los ciclos bioquímicos pertenecen a la célula huésped. Moulder *et al.*, encontraron las enzimas de *C. psittaci* que actuaban en el ciclo de pentosa-fosfato, siendo éstas: glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, 6-fosfogluconato dehidrogenasa y fosfoglucosa isomerasa (4,79). Las clamidias poseen la capacidad de llevar a cabo parte de los ciclos de biosíntesis como el del ácido cítrico, pentosa fosfato y glicolítico por poseer algunas enzimas pero aún así no logra la producción de ATP (4,92) (Ver cuadro 3). Debe existir un sistema específico de transporte para el paso de moléculas como el ATP, pero este acceso es aún desconocido (5).

**Cuadro 3. PARAMETRO METABOLICO DE *Chlamydia*.**  
(Mecanismos bioquímicos característicos de *Chlamydia*)

ADHESION DEPENDIENTE DE ENERGIA.	NO
FORMACION ATP A PARTIR DE LA OXIDACION DE GLUCOSA Y GLUTAMATO.	NO
SINTESIS DE ACIDO NUCLEICO INDEPENDIENTE.	SI
SINTESIS DE PROTEINA INDEPENDIENTE.	SI
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.	SI
POR MEDIO DE GLUCONOGENESIS.	NO
POR GLICOLISIS.	NO
METABOLISMO DE AMINOACIDO Y PIRUVATO POR CICLO KREBS.	SI
METABOLISMO DE LIPIDOS.	SI

A la fecha no se conocen los ciclos ni la naturaleza de los precursores que ocupan las clamidias para la síntesis de lípidos. Sin embargo algunos experimentos señalan la presencia de precursores simples como piruvato, glutamato, aspartato e isoleucina para la biosíntesis de lípidos (4,5).

Fan y Jenkin, (1975) demostraron que el glucógeno de las inclusiones de *C.trachomatis* se obtiene por medio de enzimas específicas como glucógeno sintetasa que utiliza ADP-glucosa como sustrato (36).

Varios investigadores han observado los efectos de aminoácidos en cultivos clamidiales, determinando que existen necesidades específicas de aminoácidos en relación con ciertas cepas clamidiales (4).

El omitir por completo aminoácidos como, leucina, fenilalanina y valina inhibe la multiplicación del microorganismo (5); así como el privar de cisteína a *C. trachomatis* serotipo E le causa severo retardo en la reorganización de CR a CE, lo cual tiene relación con la constitución de la membrana externa de los CE que es rica en cisteína e impermeable a solutos hidrofílicos (4,137).

La habilidad de clamidia para crecer desprovista de aminoácidos esenciales sugiere la capacidad de síntesis para ciertos aminoácidos. Treuhaft y Moulder (1968), demostraron esta capacidad para sintetizar lisina y arginina (128).

Las clamidias incluyendo las cepas de *C. trachomatis* y *C. psittaci* cepa 6bc son susceptibles a sulfonamidas lo que indica la capacidad de síntesis de ácido fólico (39).

### **1.6. ESPECIES SUSCEPTIBLES**

Algunas de las enfermedades comunes en los animales producidas por clamidia son psitacosis, ornitosis, conjuntivitis, encefalomielititis, artritis, enteritis, y aborto, pero la infección con frecuencia es subclínica (61).

La mayoría de las cepas de *C. psittaci* que excretan las aves y algunas de las cepas que excretan los mamíferos pueden causar enfermedad en humanos principalmente en veterinarios, trabajadores de campo, dueños de explotaciones o procesadoras de alimentos, y en ocasiones suele ser asintomática (58,61).

Se ha reportado que la frecuencia de individuos en grupo seropositivos pero asintomáticos puede llegar de 20 a 80% en borregos, 25% en bovinos, 80% en pichones, 0 al 80% en gorriones y de 50 a 75% en pavos (39).

Los pacientes con psitacosis tienen títulos de anticuerpos elevados, mismos que persisten por meses, e incluso por años en los portadores (39).

Algunas de las enfermedades provocadas en los animales por clamidia, se mencionan en el cuadro 4 (27,39,133,140).

**Cuadro 4. ENFERMEDADES EN ANIMALES CAUSADAS POR *Chlamydia psittaci***

ENFERMEDAD	HUESPED
PSITACOSIS.	AVES PSITACIDAS, HUMANO.
ORNITOSIS.	AVES NO PSITACIDAS.
QUERATOCONJUNTIVITIS.	OVINOS, COBAYOS, GATOS, KOALAS, HAMSTER.
POLIARTRITIS.	BOVINOS, OVINOS, PORCINOS, EQUINOS.
ENCEFALOMIELITIS ESPORADICA.	BOVINOS, CANIDEOS.
GASTRITIS.	GATOS.
ABORTO O INFERTILIDAD (ABORTO ENZÓOTICO OVINO, ABORTO EPIZÓOTICO BOVINO).	KOALAS, CAPRINOS, OVINOS, BOVINOS, PORCINOS.
NEUMONIA.	GATOS, CONEJOS, RATONES, OVINOS, CAPRINOS, PORCINOS, EQUINOS, CANIDEOS, BOVINOS, TORTUGAS.
INFECCION INTESTINAL SUBCLÍNICA PORTADORES ASINTOMÁTICOS ELIMINADORES DE LA BACTERIA.	BOVINOS, OVINOS, PORCINOS, EQUINOS, CANIDEOS, AVES.
VESICULITIS SEMINAL.	BOVINOS, PORCINOS, CONEJOS, RATONES.
HEPATITIS.	RANAS.

**1.6. METODOS DE DIAGNOSTICO.**

Los métodos actualmente disponibles para el diagnóstico de clamidiosis incluyen: tinciones, aislamiento en medios biológicos, pruebas serológicas como inmunofluorescencia (IF), microinmunofluorescencia, aglutinación en látex, inmunoelectrotransferencia (IET), fijación de complemento (FC), ensayos inmunoenzimáticos como ELISA y técnicas más reciente y sofisticadas como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (26).

La reacción de las clamidias con la tinción de Gram modificación de Reed, es variable por lo tanto es poco útil para su identificación (93).

Una manera de detectar la presencia de *C. psittaci* extracelularmente o en el citoplasma de las células es mediante un frotis de exudados frescos o impresiones de órganos y con ayuda del microscopio y de tinciones específicas.

Para observar la forma extracelular se utiliza la tinción de Giménez, otra tinción es la de Macchiavello donde se tiñen de rojo los CE en contraste con el azul que adquiere el citoplasma de la célula huésped (27,39).

Para observar la fase intracelular de las clamidias una de las tinciones utilizadas es la de Giemsa, observándose las inclusiones intracitoplasmáticas púrpura y los cuerpos reticulares de color azul (27).

Para el aislamiento sólo es necesaria una pequeña porción de tejido, colectado asépticamente. El microorganismo se puede aislar a partir de muestras como: raspado conjuntival, líquido sinovial, raspado traqueal, sangre heparinizada completa (obtenida en estado febril), muestras de heces, muestras de tejidos como placenta, pulmón, hígado y bazo (13,61).

En ocasiones, al coleccionar estas muestras es casi imposible evitar agentes contaminantes por lo que se recomienda utilizar solución salina fosfatada amortiguadora de pH 7.2, o medio de transporte sucrosa-fosfato-glutamina (SPG) con pH 7.4 adicionado con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (ATB) como estreptomycin, vancomicina y kanamicina para controlar el crecimiento de organismos contaminantes que impidan el crecimiento y desarrollo de clamidia (13).

Los animales de laboratorio utilizados frecuentemente para el aislamiento de clamidia son ratones, cobayos y embriones de pollo (EP) (27,76). Existe también una gran variedad de líneas celulares de origen humano y animal, que permiten el crecimiento *in vitro* de clamidia. Entre las líneas adecuadas están las células McCoy (fibroblastos de ratón), células HeLa (HeLa 229 de cérvix humano), las células L (fibroblastos de ratón clonas 929 y 5b) y GBM (Green Buffalo Monkey).

A finales de 1950 se logró establecer un cultivo de células HeLa permanentemente infectado transfiriéndose el microorganismo durante la multiplicación celular (69).

Para facilitar la infección de las células, varios autores recomiendan la centrifugación del CC inoculado. Otros métodos que facilitan la infección celular

es el uso de dietilamino etil dextrano (DEAE-D), así como ciclohexamida y algunos inhibidores metabólicos (92).

Para el diagnóstico serológico se requiere de la demostración de un aumento en el título de anticuerpos de por lo menos al cuadruple al analizar sueros pareados colectados con una diferencia de 7-10 días (92).

El antígeno de género, LPS, se utiliza ampliamente para la detección de anticuerpos anticlamidiales en el suero de los animales infectados (92). Los anticuerpos monoclonales contra LPS de clamidia revelaron al menos tres campos antigénicos, dos de ellos se comparten con los LPS de algunos microorganismos Gram negativos de vida libre y el otro es específico de clamidia (27). La prueba de fijación de complemento (FC) puede emplearse con sueros de mamíferos que han tenido la infección. Para aves se prefiere utilizar la prueba indirecta de FC ya que los sueros aviares cuando reaccionan con antígeno de clamidia no se fijan normalmente con el complemento de cuye. La prueba FC directa puede ser utilizada con el suero de aves si se añade suero normal de gallo para ayudar a fijar el complemento (27,92).

Tanto en mamíferos como en las aves los anticuerpos tardan en desarrollarse de 7 a 10 días y el uso de ATB puede retardar su aparición hasta 20 ó 40 días o incluso suprimirla (39).

Los inmunoensayos enzimáticos son de alta sensibilidad y son métodos precisos teniendo la ventaja de poder manejar gran número de muestras analizándolas en menos de 24 horas. Esta prueba es la de ELISA, pudiendo ser directa, indirecta, tipo sandwich y competitiva (28,34).

Para un mejor diagnóstico se pueden demostrar las inclusiones intracitoplasmáticas, utilizando un conjugado fluorescente homólogo de anticuerpos monoclonales o por anticuerpos policlonales de género específico (inmunofluorescencia) (27).

## II.- METODOS BACTERIOLOGICOS:

### 2. METODOS DE TINCION.

La observación con diferentes técnicas de tinción de inclusiones intracitoplasmáticas características en células infectadas por *C. psittaci* permite el diagnóstico del microorganismo.

Para la observación de las clamidias en las diferentes etapas del ciclo de desarrollo se utilizan tinciones diversas, como son: Giménez, Giemsa, Ziehl-Neelsen modificada, azul de metileno, yodo, naranja de acridina, Macchiavello.

Las partículas del microorganismo adquieren diferente color según el colorante utilizado (8,27,93,113). (Ver cuadro 5.).

#### Cuadro 5. DIFERENTES TINCIONES PARA INCLUSIONES CLAMIDIALES.

TINCION	CUERPO ELEMENTAL	CUERPO RETICULAR
GIEMSA	ROJO	AZUL
MACCHIAVELLO	ROJO	AZUL
GIMENEZ MODIFICADA	ROJO	VERDE.
CASTAÑEDA	AZUL.	PURPURA.

Nayak *et al.*, (1982) tomaron muestras de pulmón de carnero y tñieron los frotis con tinción de Giemsa (TG), observándose sincitios con CE teñidos de rojo o rosado pero sólo en algunas muestras mientras otros autores opinan que los CE se observan sólo ocasionalmente en cortes de pulmón (82).

Nicolas y Lamachère (1984) mediante el uso de técnicas de tinción sobre frotis de placentas provenientes de pequeños rumiantes, lograron determinar a *C.psittaci* como el segundo microorganismo bacteriano involucrado en abortos, siendo el causante de 24.9% del total de los casos diagnosticados (84).

Khanna *et al.*, (1987) y Seaman (1985) aislaron, identificaron y caracterizaron a clamidia a partir de muestras de aborto ovino. Inocularon estas muestras en EP para posteriormente realizar frotis y teñirlos con Giménez, observándose inclusiones rojas (65,115).

Arizmendi y Grimes (1992), lograron identificar a *Chlamydia psittaci* cepa de artritis de ovino a partir de una toracocentesis realizada en un perro. El líquido se tiñó con tinción de Wright modificada y se observó las inclusiones intracitoplasmáticas en macrófagos, posteriormente se cultivó la muestra en cultivo celular y embrión de pollo, para confirmar el diagnóstico con la tinción de Giménez y con fijación de complemento encontrando una elevación de los niveles de anticuerpos de 4 hasta 256 al noveno día (99).

También son útiles los métodos citológicos directos. En estos exámenes se busca la presencia de células con inclusiones y elementos no celulares. Una de las enfermedades frecuentes es la conjuntivitis cuyo diagnóstico se realiza tomando un raspado conjuntival, recomendándose tomar 4 a 5 raspados por paciente para posteriormente teñirlos con TG, siendo este un examen rápido y simple (62).

Jégou y Liotet (1991) mencionan que al trabajar con infecciones en pequeñas especies causadas por clamidias, al observar las células infectadas en los frotis directos el número de inclusiones es menor a 10, por lo que se debe revisar cuidadosamente (62).

Hoover (1978) observó que las inclusiones clamidiales formadas a partir de muestras conjuntivales de perros y gatos pueden observarse ya sea una enorme o pocas y pequeñas de diámetro o se visualizan los CR en agregados de 0.5  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  (59).

Debe tenerse cuidado al observar los frotis teñidos para clamidia a fin de evitar confusiones con la observación de: aglomeración de cromatina, sobreposición de núcleos de células epiteliales o linfocitos, granulaciones de mastocitos, pigmentos de melanina y corpúsculos no específicos intracitoplasmáticos (62).

**Algunos factores que provocan falsos negativos en el diagnóstico de clamidias al realizar tinciones son:**

1. **Presencia de contaminantes (Giménez, 1964).**
2. **Previas terapias con antimicrobianos (2-3 semanas anteriores a la toma de las muestras).**
3. **Utilización de medio de transporte inadecuado, aumentando así la población de bacterias contaminantes y afectando la viabilidad de clamidia.**
4. **Largo tiempo del transporte, provocando la pérdida de clamidias viables o con menor capacidad infectante (27,44,62).**

**La gran desventaja de las tinciones es la falta de especificidad para clamidias, por lo que se pueden tefir rickettsias y ciertas bacterias intracelulares lo que puede ocasionar resultados falsos positivos (13).**

**Debido a la sensibilidad de tefir clamidias, las tinciones más utilizadas son la tinción de Giménez modificada y la tinción de Giemsa, por lo que son las que a continuación se describirán con mayor detalle.**

## **2.1. TINCION DE GIMENEZ.**

**Para esta tinción se utiliza un colorante primario, carbol-fucsina básica al 10%, solución amortiguada de fosfato de sodio, decolorante y un colorante contraste, oxalato de verde malaquita al 0.8%.**

**Procedimiento:**

1. **Se realiza un frotis, se fija con calor.**
2. **Se añade el colorante primario junto con la solución buffer durante 1-2 minutos.**
3. **Se lava con agua corriente.**
4. **Se decolora con ácido acético durante 6-9 segundos.**
5. **Nuevamente se lava y se deja secar para su observación (93,113).**

El diagnóstico presuntivo de clamidias muchas veces se basa en la observación de lesiones macroscópicas sugestivas a partir de las cuales se realizan frotis que se tifen con la tinción de Giménez (TGz). Sin embargo es necesaria experiencia en la realización de la técnica de tinción y en la observación de laminillas y aún así los resultados ocasionalmente son incorrectos. Es por ello que Kirkbride (1993) recomienda verificar los resultados obtenidos por medio de esta tinción, con la prueba de IF. Mientras Nanda (1992) determinó que la técnica de FC en cortes para histopatología de muestras de tejido fetal bovino, es superior a la TGz. Así mismo otros autores han observado que la IF directa es más específica que la TGz modificada (66,81).

Vanrompay (1992) comparó la sensibilidad y especificidad de la TGz modificada e IF directa para detectar clamidias a partir de aves vivas y muertas; obteniendo resultados satisfactorios preferentemente para TGz, ya que el 80% de resultados positivos con la tinción se confirmaron con IF directa. Se utilizó TGz modificada, diferenciándose por el lavado de los monoestratos con PBS durante 5 minutos, para fijarse con metanol por 30 minutos y poder ser tefidas con el colorante primario (diluido 1:50) por 30 minutos. Después lavar dos veces con agua destilada, se añade el colorante verde malaquita al 3% durante 30 segundos, por último se realizan 3 lavados con agua destilada y se dejan secar para su observación (130).

## **2.2. TINCION DE GIEMSA.**

**Procedimiento:**

1. Se realiza un frotis fijándose con calor o metanol absoluto durante 5-10 minutos, y se deja secar.
2. Se le añade la tinción de Giemsa durante 1-5 horas (preparada el mismo día).
3. Se lava rápidamente con alcohol etílico al 95% y se deja secar para su observación (93,113).

Dagna y Wilsmore (1990) evaluaron 3 diferentes técnicas de tinción; TG con fondo oscuro, tinción Ziehl-Neelsen (TZN) modificado y tinción con azul de metileno con fondo oscuro (TAM); utilizando membranas fetales de ovino provenientes de aborto enzootico como inóculo. Después de inocular a clamidia en EP, se obtuvieron frotis de saco vitelino y se tificaron con TG, TZN y TAM, siendo la mas especifica TAM ya que al utilizarse no se observaron agregados refractarios ni CE con halos y se tificó en menor proporción el fondo de la observación. Esta es una técnica muy sencilla de realizar, aunque su desventaja es la necesidad de un objetivo 100x sustituible para utilizarlo con fondo oscuro (29).

Rivera y colaboradores (1995), estandarizaron la técnica de Giemsa para ser utilizada sobre monoestratos infectados con *C.psittaci* cepa intestinal T23. Basándose en reportes que mencionan diversos tiempos de coloración con esta tinción, debiendo esperar de 1 a 5 horas, para la observación de inclusiones. Los tiempos de coloración fueron de 1:00 hora, 1:15 horas, 1:30 horas, 1:45 horas y 2:00 horas, mientras que los tiempos de decoloración fueron de 2, 3, 4 y 5 segundos para cada tiempo de tinción mencionado. Determinándose que el tiempo de coloración de 1:30 horas y el tiempo de decoloración de 4 segundos 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 (100).

### **3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR.**

Un método para aislar a *C. psittaci* es la utilización de cultivos celulares (CC). El primer paso para llevar a cabo este método es obtener muestras que pudieran contener cuerpos clamidiales y mantenerlas en un medio de transporte adecuado y con un buen manejo (16).

Dagna y Wilsmore (1990) evaluaron 3 diferentes técnicas de tinción; TG con fondo oscuro, tinción Ziehl-Neelsen (TZN) modificado y tinción con azul de metileno con fondo oscuro (TAM); utilizando membranas fetales de ovino provenientes de aborto enzótico como inóculo. Después de inocular a clamidia en EP, se obtuvieron frotis de saco vitelino y se tificaron con TG, TZN y TAM, siendo la más específica TAM ya que al utilizarse no se observaron agregados refractarios ni CE con halos y se tificó en menor proporción el fondo de la observación. Esta es una técnica muy sencilla de realizar, aunque su desventaja es la necesidad de un objetivo 100x sustituible para utilizarlo con fondo oscuro (29).

Rivera y colaboradores (1995), estandarizaron la técnica de Giemsa para ser utilizada sobre monoestratos infectados con *C.psittaci* cepa intestinal T23. Basándose en reportes que mencionan diversos tiempos de coloración con esta tinción, debiendo esperar de 1 a 5 horas, para la observación de inclusiones. Los tiempos de coloración fueron de 1:00 hora, 1:15 horas, 1:30 horas, 1:45 horas y 2:00 horas, mientras que los tiempos de decoloración fueron de 2, 3, 4 y 5 segundos para cada tiempo de tinción mencionado. Determinándose que el tiempo de coloración de 1:30 horas y el tiempo de decoloración de 4 segundos 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 (100).

### **3. AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR.**

Un método para aislar a *C. psittaci* es la utilización de cultivos celulares (CC). El primer paso para llevar a cabo este método es obtener muestras que pudieran contener cuerpos clamidiales y mantenerlas en un medio de transporte adecuado y con un buen manejo (16).

De acuerdo a lo reportado por algunos investigadores, la viabilidad de las clamidias en muestras de tejido puede conservarse indefinidamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o a menor temperatura, debiéndose evitar la fluctuación de temperatura entre  $0$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  ya que pueden destruirse las clamidias por la formación de cristales de hielo (120). Otros autores, sin embargo, mencionan sólo haber logrado mantener muestras de clamidia en CC, por largos períodos en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pearson (1989) ha reportado que *C. psittaci* ha sobrevivido hasta 30 días sin refrigeración y durante 34 días a  $4^{\circ}\text{C}$  (87).

Para realizar el aislamiento de clamidias a partir de animales vivos se puede obtener raspados de cloaca (aves), raspados de conjuntiva, tráquea o heces frescas; añadiéndose al medio de transporte, debiéndose mantener a  $4^{\circ}\text{C}$  por poco tiempo (87).

Existen 3 tipos de medios de transporte comúnmente utilizados a base de fosfato de sucrosa en diferentes combinaciones;

1.  $0.2$  M sucrosa y  $0.04$  M fosfato.
2.  $0.4$  M sucrosa y  $0.02$  M fosfato y fosfato de sucrosa glutamato (17).
3. Infusión cerebro corazón (dextrosa y fosfato).

Spencer (1983), probó diferentes ingredientes en el medio de transporte para clamidia sin variar los ATB ni sus concentraciones, (ver cuadro 6), observando que el medio de transporte influye directamente en la capacidad infectante de las clamidias (120).

**Cuadro 6. DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE UTILIZADOS PARA *Chlamydia*.**

MEDIO TRANSPORTE	MEDIO 199	% SFB	% GLUCOSA	% SUCROSA	% SSFG	BICARBONATO DE SODIO
A	+	10	10	10	--	10
B	+	10	10	--	--	10
C	+	10	--	--	50	10
D	-	10	--	--	100	--
E	-	20	--	--	100	--

SSFG= solución sucrosa fosfato glutamato.

Spencer utilizó diferentes combinaciones de sustratos en el medio de transporte sin variar los ATB ni su concentración (Ver cuadro 7).

El medio de transporte D resultó ser el ideal porque permite mantener a *C. psittaci* viable a temperatura ambiente hasta 36 días mientras que en las otras combinaciones analizadas la infectividad de los CE disminuía dentro de las primeras 24 horas decrecentándose hasta en 4 unidades log<sub>10</sub> a las 96 horas llegando a perderse totalmente en el transcurso de 8 a 10 días, o hasta los 19 días cuando se mantenían a 4°C. Con este medio no se detectó contaminación por bacterias u hongos, llegándose a presentar sólo en muestras de heces (120). Para aumentar las cualidades protectoras del medio se les puede añadir, 1% de albumina, 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de vitaminas, 1% de L-glutamato (63,87,130).

Estos medios por ser muy enriquecidos permiten la reproducción de cualquier contaminante impidiendo así el mantenimiento de clamidia. Es por ello importante el uso de antibioticos, que ejerzan su efecto sobre microorganismos contaminantes pero no sobre *Chlamydia*. Existen diversos reportes sobre el uso de los mismos y diferentes combinaciones utilizadas. (Ver cuadro 7).

**Cuadro 7. SUSTRATOS UTILIZADOS PARA EL MEDIO DE CRECIMIENTO Y TRANSPORTE PARA CLAMIDIAS.**

ATB / AUTOR *	(6)	(63)	(87)	(94)	(92)	(120)	(119)
ESTREPTOMICIN A	200 µg	100 µg	500 µg	100µg	200 µg	100µg	500 µg
VANCOMICINA		100 µg	500 µg	100µg		100µg	75 µg
NISTATINA						50µg	
GENTAMICINA			50 µg			50 µg	
MICOSTATINA	50 u.						
KANAMICINA			500 µg				
ANFOTERICINA B			5 µg				
ADICIONADOS:	A, B	B, C	D, F	C, E	B, C	B, C	C

A.- Caldo triptosa fosfato (TPB).

B.- Bicarbonato de sodio (Puede inactivar los CE).

C.- SFB (Estable el pH).

D.- Albúmina.

E.- Clortetraciclina (10 g/ml).

F.- L-Glutamina.

(\*) Los números entre parentésis corresponden a las citas bibliográficas de cada autor.

Phillips y Clarkson (1992) al aislar a clamidia a partir del duodeno ovino utilizaron clortetraciclina en el medio de las células en una concentración de 10µg/ml durante 3 semanas para evitar la contaminación durante su transporte (94).

Las líneas celulares adecuadas más utilizadas para el aislamiento de este microorganismo comprenden, células McCoy, células HeLa 229, células L (clona 929), BGM (Buffalo green monkey), BHK-21 (Baby Hamster Kidney cells) y células Vero (87). (Ver cuadro 8). El tiempo en que se obtiene el aislamiento varia según la línea celular y la cepa con la que se trabaje (130).

**Cuadro 8. LINEAS CELULARES UTILIZADAS CON DIFERENTES CEPAS DE *C. psittaci*.**

LÍNEA CELULAR	CEPA DE <i>C. psittaci</i>	AUTOR*
CEL. L	BBC	(34, 52, 90, 100, 104)
CEL. L 1/2 DEAE-D 1/2 CICLOHEXAMIDA	COBAYO, CONEJO, OVINO, GATO, CERDO, LORO, RATÓN.	(118)
CEL. MCCOY 1/2 CICLOHEX.	AVIAR.	(16, 27, 87)
CEL. MCCOY 1/2 CICLOHEX.	AEO	(83, 77)
CEL. MCCOY 1/2 CICLOHEX. 1/2 EMETINA	FELINA.	(64, 138)
CEL. MCCOY 1/2 IDU 1/2 CICLOHEX. 1/2 CITOCALA.	OVINA	(8)
CEL. MCCOY 1/2 CICLOHEX.	EQUINA	(140)
CEL. BHK 1/2 IDU 1/2 CICLOHEX. 1/2 CITOCALASINA.	OVINA	(8, 8)
CEL. BGMK	KOALA	(22)
CEL. BGMK 1/2 CICLOHEX.	AVIAR+++	(130)
CEL. MCCOY 1/2 CICLOHEX.	AVIAR+	(130)
CEL. VERO	AVIAR++	(130)

(\*) Los números entre parentésis corresponden a las citas bibliográficas de cada autor.

(+) Indica el nivel de sensibilidad de las células a la infección por clamidia permitiendo su crecimiento.

Vanrompay (1992) ha reportado que las células BGM son tan sensibles como los embriones de pollo para el aislamiento de *C. psittaci*, y se logra obtener el aislamiento en 2-3 días aproximadamente. Mientras que el procesamiento de los embriones de pollo tarda hasta 10 días. (130).

Anderson menciona que las células Vero no permiten el crecimiento de clamidias de cepas intestinales y cepas de poliartitis aunque son excelentes para clamidia aviar<sup>1</sup>.

Johnson (1983) sugiere una forma de replicar células, utilizando células McCoy de 4 días en cajas de 250 ml con medio 199 (Wellcome) adicionado con 10% de SFB, 18-20 mM bicarbonato de sodio y antibióticos como vancomicina,

<sup>1</sup> Comunicación verbal.

estreptomycin en concentraciones de 100 µg/ml Conteniendo cada caja 2 X 10<sup>7</sup> células. Se debe tripsinizar para resuspender las células en medio de crecimiento y así obtener una concentración de 1.5 x 10<sup>5</sup> células/ml. Para tener una distribución uniforme, se vuelve a centrifugar 150 g durante 15 minutos.

Se incuban estos cultivos toda la noche a 37°C y posteriormente se inoculan con la muestra sospechosa para volverse a incubar a 37°C de 24 a 48 horas con 5% de dióxido de carbono. La cantidad a inocular en CC es de 100 ml de suspensión ó 1g. de muestra macerada y homogenizada (63,87).

Allan y Pierce (1978), mencionan que la centrifugación modifica morfológicamente la membrana citoplásmica y el citoesqueleto de las células lo que permite expresar los receptores, facilitando la adherencia y endocitosis. Aunque otros autores como Moulder y Levy (1981), mencionan que durante la centrifugación no se lleva a cabo la adherencia (2,80).

La máxima infectividad se obtiene al utilizar fuerzas centrífugas lo suficientemente grandes, como para sedimentar los CE del inóculo (1000xg) y también centrifugar con fuerzas menores (70 g) que aumente la infectividad por clamidia (92).

Existen diferentes opiniones en las velocidades utilizadas para centrifugar los inóculos de clamidia, lo cual puede incrementar la infección de CE hasta 50 veces más que la infección obtenida sin llevarla a cabo (63). (Ver cuadro 9).

#### **Cuadro 9. FUERZAS DE CENTRIFUGACION UTILIZADAS PARA ACELERAR LA INFECCION CLAMIDIAL.**

<b>CENTRIFUGACION</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>AUTOR*</b>
2,500 g	1hr.	20°C	(18)
2,000 g	1hr.	35°C	(87,94,130,138)
500 g	15 min.	37°C	(52)
300 g	1hr.	25°C	(63)

(\*) Los números entre parentésis corresponden a las citas bibliográficas de cada autor.

Es favorable el centrifugar antes y después de infectar las células (Vanrompay, 1992 (130).

Existen otros procedimientos además de la centrifugación para facilitar la infección celular como son el utilizar sustancias que inhiban parcialmente el metabolismo celular. Entre estos se encuentran:

1.- CICLOHEXAMIDA:

Es un ATB glutarámico que inhibe la síntesis de ARN en células eucarióticas (Reed *et al.*, 1961). Aumenta la disponibilidad de aminoácidos en el citoplasma celular al interferir con la síntesis proteica de la célula eucariótica disminuyendo la competencia, del microorganismo por éstos, y aumentando así el número de inclusiones observables. Se puede utilizar junto con emetina como pretratamiento al CC. Se recomienda su utilización en 1 µg/ml al momento de inocular las células (34,63,87,92,98).

2.- 5-YODO-2-DEOXIURIDINE (IDU):

Es un análogo de ADN que puede interactuar con las enzimas sintetizadoras de precursores de ADN, también puede ser incorporándose a nucleótidos en lugar de timidina lo que produce un ADN no funcional. Se recomienda utilizar 3 días antes de inocular el CC en una concentración de 80 µg/ml (4,100).

3.- CITOCALASINA B:

Es un metabolito fungal proveniente de *Helminthosporium dematioidium* que provoca células gigantes multinucleadas por la fusión de la membrana celular. Se utiliza 3 días antes de inocular el CC a una concentración de 1-5 µg/ml (6,52,119).

4.- DIETILAMINOETIL-DEXTRAN (DEAE-D):

Es un polícatión que neutraliza las cargas negativas de la superficie de la

célula para aumentar la infectividad. No tiene eficacia con *C. psittaci* de origen aviar. Se recomienda utilizarlo antes de inocular a una concentración de 20 µg/ml y post-inoculación 2 µg/ml (6,92,119).

#### 5.- POLIETILENGLICOL (PEG):

En una concentración de 35-50% PEG es utilizado para la fusión de linfocitos y plasmocitos para la producción de hibridomas. Mohammed y Hillary (1985) utilizaron un medio que contenía 35% de PEG en una solución buffer barbitonada, lo que ayudó al aislamiento de clamidia. Gibson y Egerer (1993) modificaron esta técnica utilizando PEG a menor concentración, obteniendo excelentes resultados. Este producto aumenta considerablemente la cantidad de inclusiones observables y esto depende de la concentración utilizada de PEG. A una concentración de 3.5% aumenta 3 veces la detección de inclusiones; con 7% de concentración, 4 veces; 10.5%, 8 veces; 14%, 15 veces y 17.5%, 16 veces. Pero en concentraciones mayores de 10.5% es tóxico, aumentando el número de sincitios en las células McCoy infectadas o no infectadas. La concentración idónea determinada por Gibson y Egerer (1993), es de 7%, obteniendo así buenos resultados en muestras frescas (aumentando el número de inclusiones de 2-6 veces) y en congeladas (aumentando de 3-5 veces) (43,73).

#### 6.- OTROS:

**EMETINA:** Se recomienda utilizarse 5 minutos antes de inocular el CC a una concentración de 1 µg/ml.

**COLCHICINA:** Las células expuestas a colchicina permanecen viables por 5 días, mientras que al utilizar ciclohexamida duran 10-12 días. Se recomienda añadir 10 µg/ml (87).

Pérez-Martínez (1986), logró mantener células L infectadas con *Chlamydia* cepa B577, pero después de 15 días muchas células murieron, observándose por

medio de inmunofluorescencia que las clamidias no podían replicarse. Se mantuvieron en incubación, repoblándose el frasco al añadir ciclohexamida, permaneciendo más del 90% de células infectadas (89).

Es importante la presencia de ciertos aminoácidos esenciales para cada cepa de *C. psittaci* debiendo estar a concentraciones adecuadas. La cepa clamidial de conjuntivitis por cuerpos de inclusión en cobayo crece normalmente en células McCoy con ciclohexamida y es necesaria una concentración de 8 nmol/ml de leucina y valina, mientras que de fenilalanina aproximadamente de 8 nmol/ml (4,5).

Al faltar metionina, tanto la cepa de conjuntivitis por cuerpos de inclusión como la de meningoneumonitis disminuyen el tamaño de los cuerpos de inclusión pero no el número de células infectadas. Sin embargo, la carencia de este aminoácido inhibe por completo el crecimiento de la cepa de queratoconjuntivitis felina y de la cepa de aborto enzootico ovino (AEO); a la primera sólo es necesario añadirle al medio fenilalanina y a la cepa de aborto enzootico ovino sólo tirosina (3).

El uso de los aminoácidos por parte de clamidias no sólo depende de su concentración en el medio sino también de la habilidad del microorganismo para obtenerlo (Quay y Oxender, 1980), existiendo competencia entre diferentes aminoácidos (aminoácidos competidores) para ser transportados, ya sea al interior de la vacuola que envuelve a la clamidia, o bien al interior de la bacteria en sí. Así, cuando el aminoácido requerido por el microorganismo se encuentra en menor cantidad que el aminoácido competidor, éste impide la captación del primero. Esta competencia se ha observado con leucina y valina en células de mamíferos y en bacterias. Por lo tanto, la concentración de aminoácido necesaria para el crecimiento óptimo de clamidia dependerá de la concentración del aminoácido competidor (4,97).

En células McCoy infectadas con *C. psittaci* (nasal y conjuntival felina) si el medio no tiene SFB es necesaria la presencia de histidina, triptofano, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, tirosina y valina. Pero con sólo 1 ml de SFB se reponen las

necesidades de los aminoácidos mencionados con excepción de histidina y triptofano (54).

Allan y Pearce (1983) utilizaron células tratadas con ciclohexamida para disminuir la competencia por aminoácido; por lo que no debe excluirse la posibilidad de que el exceso de ciertos aminoácidos puede deberse a los efectos de la ciclohexamida (4).

Hatch (1975) menciona la competencia entre clamidia y células L por isoleucina, ya que clamidia puede secuestrar el aminoácido para su biosíntesis sólo cuando la concentración de ésta en la célula huésped es mayor al nivel requerido por la misma para mantener su estado estacionario (52).

Buzoni-Gatel y Rodolakis (1983) observaron que la cepa abortiva en ovinos manifestó ser más invasiva que la cepa entérica ovina y de ratón al aislar *C.psittaci*, determinando que esta característica se debe a la virulencia de clamidia, al poseer la capacidad de atravesar barreras de moco difundándose en nódulos linfáticos, multiplicarse en el sistema reticuloendotelial y alcanzar y colonizar el órgano. Las necesidades nutricionales de la cepa abortiva puede deberse también a su capacidad de crecer en fibroblastos de ovino (20).

La cepa entérica ZC53 de afección a ovinos crece más rápido en CC, requiere menos tiempo para regresar de ARN a ADN durante el ciclo evolutivo y alcanza el tamaño más grande de inclusión que la cepa abortiva ZC47 (105). Esta diferencia de virulencia está asociada a diferentes patrones de proteína (Buzoni-Gatel *et al.*, 1989), al largo fragmento polimórfico de ADN (Rodolakis y Souriau, 1992) o en el gene de PPME (21,94,103,117).

### III. METODOS SEROLOGICOS.

Las pruebas serológicas se clasifican en dos grandes grupos, pruebas de unión primaria que utilizan antígenos (Ag) del paciente o bien anticuerpos (Ac) del paciente y un Ac marcado, el marcador empleado dependerá de la prueba utilizada. Este tipo de pruebas son altamente sensibles, por lo que sólo es necesario pequeñas cantidades de muestra.

Existen tres tipos de marcadores comunmente empleados:

1. -Fluorocromos para la técnica de inmunofluorescencia (directa e indirecta);
2. -Enzimas para ELISA (directa, indirecta, competitiva y tipo sandwich), inmunoelectrotransferencia o Western Blott y técnicas de inmunoperoxidasas.
3. -Radioisótopos para radioinmunoanálisis.

Aunque éste último tipo de prueba es poco utilizado en México por la necesidad de equipo especial en los laboratorios para un buen control de los desechos radioactivos.

Y las pruebas de unión secundaria que miden la interacción del Ag-Ac *in vitro*, al utilizar el Ag del paciente y el Ac del laboratorio o el Ag del laboratorio y el Ac del paciente. Esta pruebas son más fáciles de llevar a cabo. Siendo éstas pruebas, precipitación, aglutinación y fijación de complemento (123,126,135).

El tipo de prueba a emplear para realizar un diagnóstico dependerá de la cantidad de Ag o Ac que se tenga y del tipo de resultado que se requiera; con alta especificidad o sensibilidad. Considerando que los resultados obtenidos por medio de pruebas serológicas sólo son presuntivos, siendo la única prueba exacta el aislamiento.

No es recomendable el utilizar sólo un tipo de técnica para el diagnóstico de clamidia dada la variedad de reacciones que pueden manifestar las inmunoglobulinas, debido a la variedad antigénica que poseen las cepas de *C. psittaci*. Es por ello conveniente el determinar la presencia del Ag y el Ac, sobre todo si se trata de un individuo en contacto con el hombre (48,49).

El diagnóstico serológico por medio de cualquier método puede errar con muestras de animales con infección aguda, por no lograr la detección temprana de la respuesta inmune, es por ello necesaria la identificación del microorganismo por medio del aislamiento en CC o ELISA. Aunque también esta última técnica pueden dar resultados falsos; sobre todo si se trabaja con muestras de heces o en los casos de aves, raspados cloacales, porque la diseminación de *C. psittaci* por estas vías es intermitente (146).

La variación de los resultados entre las pruebas se debe a varios factores como el diferente manejo que se le da a los sustratos empleados, la cantidad y calidad de Ac o Ag utilizado y sobre todo a el procedimiento de la técnica. Es necesario conocer el tipo de diagnóstico adecuado para cada tipo de muestra, considerando la especie animal; es por ello la discrepancia entre los resultados de diferentes autores

### **3.1. PRUEBAS SEROLOGICAS DE UNION PRIMARIA.**

#### **3.1.1. INMUNOFLUORESCENCIA (IF).**

La inmunofluorescencia es una técnica histoquímica o citoquímica para detectar y localizar Ag en células o Acs del paciente. Los Acs específicos se conjugan con compuestos fluorescentes sin ocasionarle alteración alguna, dando como resultado un Ac marcado sensible a Ag o Ac. Existen dos variantes que son las más utilizadas: La directa y la indirecta, en la primera el conjugado se añade a las células, se fija a los Ag y forma un complejo inmunitario estable. El Ac que no se fija, se elimina al lavado. La preparación se observa al microscopio de fluorescencia contra fondo oscuro. Esta prueba es más sencilla a diferencia de ELISA, ya que requiere de menor tiempo de incubación. En la indirecta se produce una reacción Ag-Ac donde el Ag es del laboratorio y el Ac del paciente, se incuba y se agrega el conjugado para poder detectar la reacción (12,99).

Existen varios fluorocromos como son: rodamina, fluoresceína, ficobiliproteínas pero el ideal es el isotiocianato de fluoresceína, por unirse rápidamente a las proteínas en un pH alto, emitiendo un color verde característico (70,144).

La elaboración del conjugado se hace con antisuero específico para *C. psittaci*, siendo donadores diferentes especies animales, al inocular el Ag por vía intravenosa o intraperitoneal y colectando el suero después de la segunda inoculación, conservándose a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Por otra parte, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con isotiocianato de fluoresceína, que incluso se pueden adquirir en forma comercial (108).

En lo que se refiere al Ag se puede obtener por diferentes medios, ya sea por inoculación en embriones de pollo (EP) o CC, tras lo que pueden ser sometidos a procesos de purificación en diferentes grados. Al inocular EP, 4-5 días post-infección se colectan los sacos vitelinos ricos en CE, se suspenden en una dilución 1/10 en solución salina amortiguada de fosfatos (SSAF), pH 7.2, y se maceran para centrifugarse  $1,000\times g$  por 10 minutos tras la cual el Ag se localiza en la fase intermedia del tubo contenedor. Al utilizar el CC, las células inoculadas deben tripsinizarse durante 3 minutos con SSAF-tripsina-EDTA, y ajustar a una suspensión celular  $4\times 10^8$  células/ml (108).

La prueba de IF indirecta utilizada con clamidia reconoce los Ag de grupo y específicos de especie a partir de cualquier cepa (35). La prueba de IF indirecta utilizada con clamidia reconoce los Ag de grupo y específicos de especie a partir de cualquier cepa (35). Mientras que la prueba de microimmunofluorescencia se utilizó por primera vez para la serotipificación de *C. trachomatis* mostrando ser una prueba capaz de detectar los Ag de grupo y específicos de especie (Treharne *et al.*, 1972) (127).

Las pruebas de IF y microimmunofluorescencia son las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de clamidia en pichones por su eficacia en detectar Ag específicos de género y de especie. Aunque Salinas (1993), recomienda el uso de IF por obtener un mayor número de resultados positivos (110).

Existen reportes donde se utilizó IF para identificar la morfología de inclusiones de *C. psittaci*, a partir de muestras de heces de ovinos notándose la diferencia en los aislamientos de aborto enzootico ovino (AEO) confirmandose por medio de neutralización de suero (Johnson, 1984; Escalante-Ochoa, 1991 y Griffiths *et. al.*, 1992) y microlIF (Pérez-Martínez y Storz, 1985) (35,47,64,89).

Sin embargo Anderson (1987) mostró que esta prueba no es capaz de detectar variaciones antigénicas que pueden conducir a diferentes cepas de *C. psittaci* a partir de muestras de aborto ovino (Aitken *et. al.*, 1981); por lo que esto se debe dejar para análisis con mayor sensibilidad serológica como neutralización o ELISA utilizando AcMo o un análisis molecular (1,7).

Esta prueba puede ser utilizada además para serotipificar a *C.psittaci* de rumiantes obteniendo 2 diferentes serotipos (1,2) donde el primero incluye cepas abortivas y el segundo cepas no abortivas y no invasivas (Souriau y LeRouzie, 1993) (117).

Así mismo, Eb y Orfila (1982) utilizaron la técnica de microinmunofluorescencia para la tipificación de *C.psittaci* de origen ovino, a partir de muestras provenientes de aborto, poliartritis y de individuos aparentemente sanos, logrando separar las 7 cepas en 2 grupos antigénicos. En el primer grupo de aislamientos se encuentran las cepas causantes de aborto y cepas provenientes de muestras de heces de animales aparentemente sanos, entre estas cepas existe gran similitud y manifiestan reacción cruzada. En el segundo grupo las cepas son causantes de poliartritis (32).

Markey (1993) por medio de IF indirecta demostró que las cepas de *C. psittaci* abortiva y entérica tienen suficientes Ag diferentes, lo que permite establecer un parámetro para definir un resultado positivo al utilizar FC o ELISA

de tipo indirecta con sueros provenientes de hatos sin historia clínica de AEO (71).

Posteriormente Pérez-Martínez y Storz (1985) utilizando esta técnica, logrando obtener 9 inmunotipos de *C. psittaci* de diferentes cepas de mamíferos, que se relacionan con los 8 biotipos encontrados por Spears y Storz (1979) (89,118).

Los laboratorios Imagen ha diseñado un prueba para la demostración de *C. trachomatis* en mujeres, ya que el Ac también reacciona con *C. psittaci* en frotis frescos y en frotis tratados con parafina y enzimas, por estar dirigida contra el Ag común de grupo, LPS. El Ac puede añadirse directamente al tejido fresco en frotis o previamente fijarlo en una solución amortiguadora de formalina al 10% y parafina en un sólo paso. Posteriormente se desparafinan y se le añade la tinción Mayer's hematoxilina durante 5 minutos, para continuar con el uso de una enzima, tripsina o proteasa en diferente concentración. Finalmente se lava con solución salina amortiguadora de tris. De acuerdo a lo observado por Palmer (1987), mediante esta prueba se logró obtener excelentes resultados y no existiendo diferencia entre la fluorescencia detectada con el antisuero diluido y el no diluido, pero se obtiene mejor resultados de digestión con la utilización de proteasa. Esta es una prueba rápida y simple, sólo su costo es elevado aunque al diluir el antisuero 1:10, se obtienen también excelente resultado, lo que permite su utilización en medicina veterinaria (86).

### **3.1.2. ELISA.**

Engvall y Perlmann (1971), y Van Weemen y Schuurs (1971), en dos trabajos diferentes describieron la técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Esta es un inmunoensayo que determina la concentración de un Ag o un

Ac, utilizando una fase sólida y una en solución detectando así el complejo Ag-Ac mediante un marcador enzimático, de manera que en cada pozo se produzca una mezcla que proyecte un color; la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad del Ag o Ac que se busque. Esto se puede determinar a simple vista o con ayuda de un espectrofotómetro.

Existen diferentes modalidades de ELISA: directa, indirecta, tipo sandwich y competitiva, así como diferentes tipos de Ag (28), estos últimos pueden ser:

- 1.- **MEZCLA CRUDA**.- Ag con contaminantes con otras proteínas del huésped. Es necesario recurrir a ELISA tipo sandwich para capturar selectivamente el Ag.
- 2.- **MEZCLA RELATIVAMENTE CRUDA**.- Es de microorganismos completos más proteínas solubles con material limitado del huésped.
- 3.- **SEMIPURIFICADAS**.- Son preparaciones enriquecidas de Ag, pudiendo utilizarse ELISA directa o indirecta.
- 4.- **ALTAMENTE PURIFICADOS**.- Posiblemente se puedan usar como reactivos puros con propiedad de adsorción caracterizadas. Esta purificación se obtiene por medio del método de azul de Coomassie G250 (28,109).

La participación de anticuerpos monoclonales, facilitan la obtención de diagnósticos certeros, independientemente del método empleado. Köhler y Milstein (1975) describieron la hibridación de células somáticas generadoras de cantidades ilimitadas de Ac que son química, física e inmunitariamente homogéneas, ya que cada Ac se sintetiza de células derivadas de una sola clona. Para que se lleve a cabo una fusión celular de este tipo se utilizan sustancias como el polietilenglicol, es importante que las células se encuentren en división activa; ésto es, su núcleo estará en división mitótica al mismo tiempo que el núcleo de la célula mielomatosa y dará lugar a una población de células con un solo núcleo, llamadas hibridomas (135). La detección de Ac específicos puede realizarse por medio de técnicas, radioinmunométricas y enzimoimmunométricas, hemoaglutinación pasiva e inmunofluorescencia. Se selecciona una célula única y se replica para formar una

clona. Estos hibridomas se propagan en diferentes medios o se inyectan a cavidad peritoneal de ratones. Independientemente de la técnica elegida, los Ac Mo se obtienen contaminados con albúmina y transferrina, es por ello importante su purificación para su posterior utilización (70,117,125,135).

ELISA tiene la capacidad de cuantificar los Ac séricos sin que sea necesario realizar diluciones seriadas del suero problema, por lo que la tasa de Ac debe ser el único factor limitante de la reacción. Esta técnica parece ser mas apropiada que la FC para la detección temprana de Ac clamidiales en suero de cabra infectada experimentalmente. El personal sólo requiere de un mínimo entrenamiento para la realización de esta técnica, además de utilizar pequeñas cantidades de reactivos que son duraderos por largos períodos (109).

Al tomar la muestra para realizar el diagnóstico no importa la presencia de bacterias contaminantes o un previo tratamiento con antibióticos, además las muestras no necesitan cuidado especial de temperatura, por no ser necesaria la presencia de clamidias vivas (88,109,116).

Sin embargo los resultados obtenidos por medio de ELISA dependeran del tipo de muestra empleada, además de la sensibilidad de ELISA con respecto al aislamiento en CC es menor en 4 al 20% (111).

Finn *et al.*, (1983) consideraron que la cantidad óptima de proteína clamidial a colocar por pozo en las microplacas oscila entre 1.8 a 2 µg (38).

Se logra aumentar la sensibilidad de ELISA tipo sandwich utilizando AcMo marcados con fluoresceína, para la detección de *C. psittaci* a partir de muestras vaginales de ovinos y caprinos con problemas de abortos. Sólo se depositan las muestras en solución de NaOH 0.1% al 100%, para solubilizar la parte lipídica y proteica de la membrana celular de las células que mantienen a las clamidias (116).

Se ha reportado que las bacterias sufren mutaciones en la biosíntesis de sus componentes como *Salmonella minnesota* que posee una estructura funcional, ReLPS que es provocada al mutar el LPS. Este ReLPS tienen reacción cruzada con el AG de género de clamidias por lo que Lema y Everaere (1986), desarrollaron un tipo de ELISA indirecta basandose en la estructura similar entre el Ag de género de clamidias y el KDO de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Se obtuvieron resultados satisfactorios al compararse ELISA utilizando ReLPS, ELISA sin utilizar este tipo de Ag, IF con *C. psittaci* e IF con *C. trachomatis*. ELISA utilizando el ReLPS para la identificación de clamidias es un método sensible y sencillo y puede ser empleado principalmente para diagnóstico (68).

Pépin *et al.* (1985), desarrollaron una ELISA tipo indirecta que utilizó como Ag la bacteria muerta para detectar Ac clamidiales en cabras y se comparó con la técnica de FC. Se manejaron dos grupos de muestras, en el primer grupo ambas técnicas obtuvieron resultados similares mientras que en el segundo grupo, ELISA mostró mayor número de resultados positivos, lo que pudo deberse a su alta sensibilidad o a la pérdida de especificidad por utilizar como Ag a la bacteria completa, provocando una reacción cruzada con los Ac contra otros microorganismos. Aunque los autores mencionan que se debe a la alta sensibilidad de ELISA, basandose en otros estudios realizados en forma similar pero con el Ag purificado. Esto indica que ELISA posee mayor sensibilidad que la técnica de FC. También se menciona que ELISA es la técnica apropiada para detectar Ac contra *Chlamydia* en etapas tempranas de infecciones en cabras y ovinos (23,88).

Fukushi y Hayashi (1985), por medio de ELISA de tipo indirecta detectaron Ac contra CE de *C. psittaci* en diferentes animales como: conejos, ratones, perros y gatos, sin poderla utilizar para el diagnóstico de otros animales como bovinos y equinos dado que sus inmunoglobulinas (IgG) no aglutinan la proteína A del

conjugado, la cual se utilizó para la detección de la bacteria en esta prueba. Esta técnica tenía la ventaja de manejar un Ag (CE) tratado con una solución de Triton X-100 del cual se desconoce su mecanismo de acción. Es importante que el Ag específico de género y de especie se encuentran intactos, lograndose resultados tan satisfactorios como el utilizar la técnica de FC (41).

Sin embargo Pérez-Martínez y Schmeer (1986), mediante ELISA tipo directa detectaron *Chlamydia spp* a partir de abortos en bovinos inducidos artificialmente con diferentes cepas abortivas de clamidia, la inoculación fue realizada en distintas etapas de gestación. Esto se logró utilizando Ac específicos de bovinos conjugados con peroxidasa de rábano diluido en 1:2,000 en sueros pareados obtenidos en el momento del aborto y 3 semanas después. Los resultados fueron satisfactorios conjuntamente con la técnica de IF indirecta (91).

Escalante-Ochoa (1988) utilizó un Ag particulado que consistía en una suspensión de CE que conservaban sus propiedades antigénicas y un Ag soluble que contenía el LPS termoestable específico de género, aumentando considerablemente la sensibilidad de ELISA tipo indirecta al utilizar el Ag soluble en la detección de clamidias, esto se debe a que los Ac se fijan con mayor facilidad al LPS libre que a la *Chlamydia* viva (34,116).

Wills y Millard (1986), utilizaron un prueba comercial IDEIA para detectar a *C. psittaci* a partir de muestras de conjuntiva ocular de gato. Este tipo de ELISA utiliza AcMo específicos de género que puede ser utilizado también para *C. trachomatis*. Pero el aislamiento en CC resultó ser más sensible para la detección de clamidia a partir de muestras de conjuntiva en gatos natural y artificialmente infectados. Con CC se consideraban resultados positivos al presentarse menos de 50 a 80 células infectadas lo cual no fue posible detectar con IDEIA. Así mismo, demostraron que el CC tiene mayor sensibilidad que IDEIA, cuando las concentraciones del microorganismo son escasas cuando la muestra proviene de casos crónicos (139).

Mientras, Weigler y Baldock (1988), utilizaron IDEIA para la detección de *C. psittaci* a partir de muestras de conjuntiva y tracto urogenital de koalas y compararon sus resultados con el aislamiento en CC. Obteniendo una sensibilidad de 11% y una especificidad de 90%, considerando que los resultados se tomaban como negativos sólo cuando coincidían en ambas pruebas. Laboratorio IMAGEN utiliza AcMo con fluorescencia directa, por lo que está prueba se considera la más sensible para koalas (134).

Brown (1989) ha observado que ELISA tipo indirecta es útil para la identificación exitosa de *C. trachomatis* pero no ha probado ser tan sensible y específica para *C. psittaci* a partir de muestras fecales de aves; tal vez esto se deba a la presencia de enzimas endógenas que afectan la viabilidad de la bacteria (19).

Los productos lácteos de origen ovino han comenzado a ser más populares en diferentes países, por lo que se ha hecho importante el determinar la presencia de clamidias en la leche. Así, Thomas y Davison (1990), utilizaron ELISA para detectar *C. psittaci* a partir de muestras de membranas fetales y leche de ovinos con AEO mediante una prueba comercial, "IDEIA", detectando Ag clamidiales desde 35 unidades formadoras de inclusión/ml, lo que indica la sensibilidad de la prueba. Esta sensibilidad se confirmó al dar 17 resultados positivos de 19 muestras de membranas fetales de ovinos con AEO. Sin embargo a partir de muestras de leche sólo detectó una como positiva con ELISA a partir de 26 muestras totales; y ninguna de ellas fue positiva al aislamiento en CC. Esto indica elevada sensibilidad de IDEIA, ELISA para la detección de *C. psittaci*. Los resultados positivos obtenidos con ELISA con los cuales no se logró el aislamiento en CC de clamidia, son debidos a la baja especificidad de esta prueba, a diferencia del la elevada especificidad que posee el aislamiento en CC, o bien a la falta de viabilidad del microorganismo. Los resultados obtenidos por

Thomas y Davison (1990), muestran que clamidia no se excreta por leche aún en animales infectados con AEO (124).

Mediante una prueba comercial (KODAK) basada en ELISA de tipo directo con AcMo para *C. trachomatis*, Sanderson y Anderson (1992) lograron la detección del LPS de *C. psittaci* ovina, a partir de muestras de placenta y raspados vaginales.

Esta técnica se comparó con el aislamiento en CC, obteniéndose para ELISA una sensibilidad de 95.3% y una especificidad de 94%. Varias muestras llegaron al laboratorio con autólisis y lesiones microscópicas muy sugestivas de una infección clamidial, estas muestras fueron positivas con ELISA y negativas con el aislamiento en CC, por medio de pruebas inmunohistoquímicas se detectó que los resultados obtenidos con ELISA no eran falsos positivos (111).

Haven y Mills (1992) probaron una prueba de ELISA de tipo comercial para clamidia, que se anunciaba para personas con conjuntivitis clamidial además de sensible y de fácil uso. Se probó en aves, siguiendo las instrucciones del proveedor y de todas las muestras obtenidas ninguna fue positiva; sin embargo, al realizar el aislamiento en células McCoy si hubo resultados positivos. Se enviaron las muestras a diferentes laboratorios para confirmar el diagnóstico mediante pruebas de IF, aislamiento, lesiones microscópicas y se obtuvieron ambos tipos de resultados, positivos y negativos. Entre los diferentes factores que pudieron alterar los resultados obtenidos se encuentra el tipo de hisopos utilizados ya que hechos de madera, afectan la viabilidad de las clamidias, así como las temperaturas de incubación y los tiempos utilizados durante el procedimiento de aislamiento (53).

Salinas y Caro (1993) al manejar Ag semipurificados de *C. psittaci* en ELISA tipo directo y comparar los resultados con inmunofluorescencia indirecta; observaron que la densidad óptica para una misma dilución de un suero positivo sobre el

control positivo y el control negativo no eran diferentes aún en la dilución sérica más alta. Se observó también que la curva obtenida de los sueros negativos era semejante a lo esperado, descartándose la idea de que los niveles de densidad óptica fueran por uniones inespecíficas (108).

Para explicar esto se establecieron 2 hipótesis:

- 1.- Una antigenicidad común entre clamidias y partes celulares por lo que los Ac contra CE reconocen también otros Ag celulares.
- 2.- Donde se encontraban los sueros positivos también había anticuerpos específicos contra elementos celulares que no estaban presentes en el suero negativo, ya que algunos animales enfermos en la fase aguda con la infección clamidial pueden elaborar autoanticuerpos contra Ag intracelulares por la lisis celular masiva debido al ciclo de clamidia (108).

Vanrompay (1994) comparó cinco tipos de inmunoensayos disponibles comercialmente, IDEIA, CELISA, IMAGEN, CEL-VET if y CLEARVIEW, probándolos con *C.psittaci* de pavo a partir de muestras de conjuntiva ocular y cloaca; utilizándose diferentes tipos de Ag según la técnica empleada. (Ver cuadro 10). Para verificar los resultados se utilizó aislamiento en CC con células BGM (132).

**Cuadro 10. TIPOS DE Ag UTILIZADOS EN 5 INMUNOENSAYOS COMERCIALES PARA LA DETECCION DE *Chlamydia psittaci*.**

INMUNOENSAYO	ANTIGENO
IMAGEN	EN FROTIS
CEL-VET if	EN FROTIS
IDEIA	LPS-ACMO CLAMIDIAL
CELISA	LPS-ACMO CLAMIDIAL
CLEARVIEW	LPS-ACMO MARCADO

Las técnicas IDEIA y CELISA, son ELISA tipo sandwich e indirecta respectivamente, y son específicas para *C.trachomatis*. En estas pruebas los

resultados positivos se observan en color azul, y la intensidad de éste es proporcional a la cantidad de Ag presente en la muestra.

La prueba de IMAGEN es para *C. trachomatis* mientras que CEL-VET if es para *C. psittaci*. Ambas pruebas se basan en la técnica de inmunofluorescencia directa. Mientras que la técnica de CLEARVIEW, en inmunocromatografía y está diseñada para *C. trachomatis*, y utiliza AcMo contra el Ag específico de género. Su resultado se expresa por medio de una línea indicando la presencia del Ag de clamidia.

Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad de todas las pruebas utilizados para ambos tipos de muestras se establecen en el cuadro 11. Siendo IMAGEN la técnica más sensible y específica para la detección directa de clamidia, al obtener 100% de resultados correctos con muestras de conjuntiva de pavo, y 100% de sensibilidad y 96% de especificidad con muestras de cloaca. Al comparar estos resultados con el aislamiento en CC se obtuvo una elevada correlación; en contraste con la prueba CEL-VET if que sólo manifestó 11% de especificidad con las muestras de conjuntiva y 12% con las muestras de cloaca (132).

IMAGEN es una técnica rápida y por su disponibilidad se le puede utilizar para el diagnóstico de clamidiosis en pavos de engorda (132).

#### **Cuadro 11. PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD OBTENIDO EN 5 INMUNOENSAYOS COMERCIALES.**

INMUNOENSAYO	MUESTRA OCULAR		MUESTRA CLOACAL	
	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
IMAGEN	100%	100%	100%	92%
CEL-VET if	86%	11%	93.3%	12%
IDEIA sandwich	0%	92.8%	26.6%	100%
CELISA	0%	--	0%	--
CLEARVIEW	0%	--	53.3%	88%

Todas las técnicas utilizaron hisopos de aluminio con algodón.

En contraste, Wilsmore y Davidson (1991) utilizaron CLEARVIEW para el diagnóstico de *C. psittaci* en ovinos a partir de membranas fetales de animales afectados con aborto y se obtuvieron buenos resultados. Las ventajas que posee esta prueba son el poder detectar el Ag clamidial a partir de muestras dañadas, por lo que la prueba permite su utilización cuando la muestra tomó mucho tiempo en llegar al laboratorio, además de la rapidez en la que se obtienen resultados y no necesitar equipo sofisticado ni experiencia del personal (143).

Es importante considerar que al aumentar la sensibilidad de una prueba serológica disminuye su especificidad. Es por ello que ante las necesidades actuales del país, los estudios diagnósticos y epidemiológicos de *Chlamydia*, resulta conveniente obtener un mayor grado de especificidad en una prueba inmunoenzimática a pesar de que el nivel de sensibilidad disminuya (34).

### 3.1.3. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET).

La inmunoelectrotransferencia es una técnica que combina el alto poder de resolución de la electroforesis con geles de poliacrilamida y la alta sensibilidad de ELISA para obtener una herramienta de trabajo con alto poder cualitativo para el estudio de Ag-Ac y poder diferenciar entre una cepa y otra, al detectar diferentes proteínas inmunogénicas (126,129).

Esta es una prueba de tres etapas, la primera se basa en la electroforesis de una mezcla de proteínas en gel para que cada componente se tenga en una banda única. La segunda etapa es la transferencia de esta proteína, sin perder resolución. Poniendo el gel donde esta la proteína en contacto con una membrana de nitocelulosa en un medio con una solución amortiguadora, en un soporte para posteriormente pasar una corriente eléctrica para acelerar la transferencia. La última etapa la visualización de los Ag transferidos por medio de un marcador

como enzimas o isótopos. Siendo cada línea una Ag específico que ha sido reconocido por un Ac (126).

IET permite la evaluación de inmunidad por macromoléculas clamidiales puras como las proteínas de membrana utilizadas como inmunógenos. Se han realizado muchos esfuerzos para la identificación de proteínas de la membrana de microorganismos; principalmente la membrana de los CE, que son la parte medular de la patogénesis de la infección por clamidias y el punto de interacción con la célula huésped (112).

IET detecta los Ag de género, específicos de especie y algunos determinantes específicos de serovariedades no lograron detectar componentes no proteicos como LPS por medio de esta prueba pero si con pruebas como FC (83).

Batteiger y Roger (1987) utilizaron esta prueba describiendo la reacción de IgA en secreciones vaginales causadas por *C. psittaci*; estas inmunoglobulinas actúan contra PPME y LPS. Alcanzando a detectar IgA hasta el día 13 postinfección primaria mientras que IgG se monitoreó hasta el día 813 postinfección primaria; indicando que estos Acs se encuentran en el individuo hasta 2 años después de la infección inicial (14).

Los títulos de IgG e IgM pueden mostrar el grado de infección; como se ha demostrado con *C. trachomatis* donde la persistencia de Acs puede relacionarse con la severidad, el tiempo de infección y la recurrencia de la misma (33,88).

Griffiths *et. al.*, (1992), analizaron genéticamente a *C. psittaci* de rumiantes mediante IET y encontraron 2 serotipos; el primero contiene cepas invasivas, y el segundo las cepas no invasivas, donde además se observaron 7 genes diferentes para PPME, lo que sugiere la posibilidad de subtipos de este segundo grupo (47).

Souriau y Le Rouzie (1993) mencionan que esta prueba puede ser empleada para identificar el potencial antigénico, su cinética y especificidad antigénica de los Ac

dados como respuesta a una infección genital con *C. psittaci* cepa conjuntivitis por cuerpos de inclusión de cobayo (117).

Pérez-Martínez y Storz (1985) aislaron *C. psittaci* de rumiantes clasificándola en serotipo 1 y 2, mediante IF. Y al utilizar IET a partir de muestras pertenecientes al serotipo 2 se encontraron cepas no abortivas causantes de enfermedades como, artritis, neumonia y conjuntivitis (Souriau *et. al.*, 1993) (89,117).

Girjes y Ellis (1993), compararon diferentes métodos para detectar la presencia de *C. psittaci* en koalas, a partir de muestras oculares y de tracto genital, obteniendo excelentes resultados con inmunoelctrotransferencia al detectar LPS. Esta técnica posee una alta sensibilidad que varía de 52.1% a 73.1% dependiendo del tipo de procedimiento y del tipo de muestras a analizar y su especificidad es de 94 a 100%. Además tiene la ventaja de ser de procedimiento sencillo que se lleva a cabo aproximadamente en 16 horas y económico (45,46).

### 3.1.4. INMUNOPEROXIDASA:

Esta prueba es similar a la técnica de IF sólo que el marcador empleado son enzimas que se pueden obtener directamente de la peroxidasa de rábano por medio del método de Wilson y Nakane (1978), y se utiliza sin purificación, en una dilución 1:10 (glicerol), conservándose a -20°C, otras enzimas de primera elección son la fosfatasa alcalina y la galactosidasa  $\beta$  (12,25,141).

La prueba de inmunoperoxidasa puede ser de tipo directa e indirecta:

La prueba de tipo directa es cuando al tejido se le añade el Ac marcado con enzimas para posteriormente añadir el sustrato adecuado para la enzima y poder observar la unión Ag-Ac. Y la técnica indirecta detecta la reacción Ag-Ac mediante el conjugado que contiene el anti-Ac de acuerdo al método de Chasey (1980). El resultado se examina con microscopio de luz convencional observándose el

campo brillante por la detección de CE, siendo raro ver regiones de citoplasma teñidas., si es negativo el monoestrato no hay tinción alguna y las células son escasamente perceptibles.

Este método se compara con IF directa al utilizar células L-929 por su alta especificidad al mostrar la típica morfología de las inclusiones clamidiales (25).

Chasey *et al.*, (1981) demostraron la detección de *C. psittaci* por medio de la prueba de inmunoperoxidasa, teniendo la ventaja de no tener colorante en el fondo de la observación como en TAM (25).

La prueba de peroxidasa-antiperoxidasas (PAP) es un método de tres etapas siendo el primero el cubrir el tejido con Ac de conejo (individuo donador) contra el Ag tisular. El segundo paso es añadir el Ag y posteriormente el anti-Ac de conejo, siendo el último paso el añadir el complejo antiperoxidasa de conejo unido a peroxidasa, uniéndose estos en los lugares libres de anti-Ac, para detectar la reacción Ag-Ac (126).

Con ésta técnica, Moore y Petrak (1985), y Moore y Marjorie (1991), compararon diferentes métodos de diagnóstico de clamidiosis en aves domésticas partir de tejidos fijados con formalina o parafina, obteniendo que la PAP es poco sensible para clamidias ya que sólo una muestra de 144 analizadas resultó ser positiva, así mismo los resultados obtenidos con aglutinación en látex también manifestaron una sensibilidad nula y pero la especificidad de PAP fue de 93% al compararse con el aislamiento en CC.

Sin embargo esta técnica posee ventajas sobre las tinciones por ser de interpretación más sencilla pero es necesario que el personal tenga experiencia en el procesamiento de muestras por ser muy laborioso además de ser una técnica costosa (74,75,76).

## **3.2. PRUEBAS SEROLOGICAS DE UNION SECUNDARIA**

### **3.2.1. AGLUTINACION.**

La aglutinación une químicamente Ag solubles a partículas como eritrocitos, bacterias o alguna partícula inorgánica (latex); así los Ac específicos llegan a las partículas cubiertas y forman agregados visibles o aglutinados. Las mejores partículas transportadoras son los eritrocitos y a estas pruebas se les llama hemoaglutinación pasiva (126,135).

Las técnicas de aglutinación sólo son semicuantitativas, siendo su ventaja su alta sensibilidad y capacidad para valorar los puntos finales visualmente. De acuerdo a Coombs existen 3 requisitos para la prueba de aglutinación, mismos que son:

1. - Disponibilidad de una suspensión estable de células o partículas.
2. - Presencia de uno o más Ag de superficie.
3. - El conocimiento de poder detectar Ac incompletos los cuales no aglutinan (10).

Existen 3 tipos de técnicas:

- 1) **AGLUTINACION DIRECTA.**- Util para detectar Ac específicos. Se realiza por titulación de antisueros en dilución doble seriada en presencia de una cantidad constante de Ag. El resultado se expresa en la dilución más elevada a la cual se presenta aglutinación.
- 2) **AGLUTINACION INDIRECTA O PASIVA.**- Es la aglutinación de Ag en eritrocitos o soportes de látex o bentonita (solubles) que son acarreadores pasivos, se acoplan espontáneamente y forman reactivos estables para la detección de Ac específicos (123).

3) INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION.- Este tipo de hemoaglutinación mantiene constante la cantidad de microorganismo titulado que se agregan a cada tubo, mientras el suero problema se diluye en forma seriada. Se mezcla el Ag y el Ac para posteriormente agregar la suspensión de eritrocitos lavados. El título de la inhibición de hemoaglutinación del suero se obtiene multiplicando la más alta de las diluciones del suero que inhibe la hemoaglutinación, por el número de unidades hemoaglutinantes de microorganismo que participaron (126).

Grimes (1985) analizó sueros de ave para identificar la estabilidad de los títulos de Ac. Obtuvo resultados similares entre la prueba de aglutinación en látex y la prueba de fijación de complemento directa. Siendo la más sensible y específica para la detección de *Chlamydia* la prueba de aglutinación en látex (48).

Thornley *et al.*, (1985) desarrollaron una prueba de hemoaglutinación pasiva inversa (HPI) para detectar el Ag de clamidia acoplado con un AcMo contra Ag de eritrocitos de ovino tratados con enzima. Al analizar la prueba de HPI con muestras obtenidas de diferentes animales se mostró la capacidad de detectar a *C. psittaci* en una dilución  $1.20 \times 10^5$ . La prueba de HPI es menos sensible que el aislamiento en CC para detectar el desarrollo de clamidia, pero a pesar de esto las muestras clínicas obtenidas no dieron resultados contradictorios entre ambas pruebas. La capacidad de HPI para detectar el Ag de microorganismos muertos permiten su utilización para exámenes veterinarios ya que frecuentemente las muestras tardan en llegar al laboratorio, pudiendo ocasionar pérdida en la viabilidad de las clamidias (125).

Tomando en cuenta que las pruebas de aislamiento consumen un mínimo de 2-4 días a partir de muestras de rumiantes y en aves de 3 a 10 días este examen es recomendable por su rapidez, principalmente cuando la historia clínica sugiere clamidiosis. HPI puede utilizarse para corroborar los hallazgos clínicos y ayudar al médico veterinario para iniciar un tratamiento. Otra ventaja es no necesitar equipo caro y ser de fácil lectura (24, 131).

Las ventajas y desventajas de la técnica de aglutinación en látex se muestran en el cuadro 12 (49).

**Cuadro 12. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION.**

VENTAJAS	DESVENTAJAS
ES SENCILLA Y RÁPIDA, POR LO QUE PUEDE SER UTILIZADA POR DIFERENTES LABORATORIOS.	EL Ag NECESARIO NO ESTA DISPONIBLE COMERCIALMENTE.
LOGRA DETECTAR IgM, POR SU ALTA ESPECIFICIDAD.	POCA SENSIBILIDAD.
AYUDA EN LA DETERMINACIÓN DEL TRATAMIENTO, YA QUE AL REALIZARLA DESPUES DEL TRATAMIENTO DEBEN DE BAJAR LOS NIVELES DE Ac.	NO ES LA TÉCNICA ADECUADA PARA CIERTAS ESPECIES DE AVES COMO LOS INSEPARABLES.

**3.2.2. FIJACION DE COMPLEMENTO (FC).**

La activación de la vía clásica del complemento se debe a la combinación del Ag y Ac, por lo que se emplea para identificar la presencia de un Ac particular en un suero. Esta reacción no es visible por lo que es necesario la presencia de un indicador el cual consiste en eritrocitos recubiertos con Ac antieritrocitos (126,135).

La prueba de fijación de complemento depende de un sistema de reacción en dos etapas. En la primera etapa, reacciona el Ac y el Ag con una cantidad constante y conocida de complemento; en la segunda etapa se mide la actividad hemolítica del complemento expresándose un resultado positivo por la ausencia de lisis de los eritrocitos, y el negativo se manifiesta con hemólisis (123,126,135).

Esta técnica primero se utilizó por Stamp et. al., (1952) para el diagnóstico de AEO. Por lo que fue la primera elección en los laboratorios para el diagnóstico de

clamidia y conjuntamente con otras pruebas se ha utilizado para la investigación sobre la infección clamidial (Fuensalida-Draper y Rodolakis, 1976; Pérez-Martínez, 1985; Dawson *et al.*, 1986). Así mismo, es una prueba utilizada en Gran Bretaña para el diagnóstico de AEO a nivel de hatos (30,35,40,90,122).

La FC se ha utilizado para detectar Ac clamidiales específicos de grupo en suero, por lo que no se puede utilizar para diferenciar antigénicamente a *Chlamydia*; más aún es insensible en muestras de moco provenientes de problemas de queratoconjuntivitis, enteritis e infecciones genitales las cuales provocan una respuesta inmune localizada (35).

Pero la técnica de FC tiene un sin número de desventajas, incluyendo la falta de sensibilidad y especificidad (Rodolakis, 1988). En investigaciones realizadas por Prettejohn (1988) utilizando FC frecuentemente se encontró el problema de bajo grado de seroconversión en hatos cerrados sin evidencia de enfermedad o vacunados (96,102).

Brodie *et al.*, (1983) sólo encontraron 65% de animales con AEO al utilizar FC, observando que cuando la enfermedad no es causada por *C. psittaci* abortiva se pueden detectar niveles bajos de Ac con FC, lo cual corrobora estudios anteriores realizados por Mendłowski *et al.*, en 1960; Storz y Thornley, en 1966 y Stephenson *et al.*, en 1974 (18).

Markey (1993) trabajó con 44 sueros negativos para *C. psittaci* ovina con FC a una dilución 1/8 y se probaron nuevamente con IF indirecta y ELISA utilizando Ag 1074 (cepa abortiva) y N.I.E1 (cepa intestinal) obteniendo 33 sueros positivos con fluorescencia a dilución de 1/500 y 4 sueros positivos a dilución 1/5,000, indicando esto la falta de sensibilidad de FC. Al comparar la FC con IF indirecta y ELISA se observó que ninguna tiene dificultad de identificación de sueros fuertemente positivos o negativos. Los problemas se presentaron cuando el suero daba títulos cercanos a positivos principalmente con FC, manifestándose 50% de diferencia en los resultados entre ELISA y FC, al tener resultados diferentes en 35 sueros de 62 sueros probados (71).

Al analizar los hallazgos obtenidos de esta comparación, dicho investigador observó 3 tipos de posibles resultados.

- **NEGATIVA O FUERTE POSITIVA.**- En la comparación de respuestas entre FC y ELISA, ambas coinciden con excepción de dos resultados en los que con FC dan positivos y con ELISA dan negativos. Se tiene un coeficiente de correlación de 0.93 entre ambas pruebas.
- **EN EL LIMITE DE SER POSITIVA.**- Poco coinciden ambas pruebas, aproximadamente 63.4%, teniendo un coeficiente de correlación de 0.62.
- **CON SUERO PRE Y POST VACUNAL:** Con suero prevacunal se observó entre FC y ELISA un coeficiente de correlación es de 0.41. Con suero postvacunal disminuye hasta 74%, siendo su coeficiente de correlación de 0.31 (71).

Escalante-Ochoa (1991) en su estudio sobre la infección clamidial en México, encontró que los ovinos muestreados probablemente estuvieron expuestos a clamidia intestinal, ya que no hubo manifestaciones de aborto pero los resultados obtenidos mediante FC mostraron un título elevado de Ac contra clamidia entérica, poniendo en evidencia la presencia de la infección con clamidia de tipo subclínico, debido a la diseminación de la bacteria por heces de los animales infectados. Es probable que aproximadamente el 70% de los animales que diseminan el microorganismo no muestren títulos elevados de Ac (35,68).

Oiloy *et al.*, (1994) realizaron un estudio epidemiológico de las principales enfermedades abortivas en bovinos del Congo, mediante la utilización de FC a fin de evaluar enfermedades como clamidiosis y fiebre Q, también se utilizó FC más rosa de Bengala para evaluar brucelosis. Se determinó que la variaciones en la prevalencia de una y otra prueba van de acuerdo a la especie, edad y sexo. Pero para el caso de clamidiosis las dos últimas no resultaron significativas (85).

Grimes y Phalen (1993), por medio de la técnica de aglutinación en latex lograron detectar a *Chlamydia*, observando una alta sensibilidad para la detección de Ac de aves psitácidas. Utilizaron cromatografía de columna para la separación de las

inmunoglobulinas en el suero de las aves. Observando que la IgM reaccionó con la prueba de aglutinación en latex pero no fue así al comparar los resultados con la prueba de FC, mientras la IgG reaccionó en ambas pruebas. (Ver cuadro 13) La reacción de las inmunoglobulinas en las pruebas que contenían latex se debió a su avidéz y afinidad para las esferas de latex (50).

Girjes y Ellis (1993) mencionan que los títulos de IgG e IgM pueden mostrar el grado de infección ya, que la persistencia de Ac's puede relacionarse con la severidad, el tiempo de infección y la recurrencia de la misma. Es por ello importante saber que técnica detecta que inmunoglobulina para elegir la más adecuada, según la etapa de la enfermedad (Ver cuadro 13) (45,51).

**Cuadro 13. INMUNOGLOBULINA DETECTADA POR 2 PRUEBAS SEROLOGICAS.**

Ig	AGLUTINACION	FC
IgM	+	-
IgG	+	+

FC= Técnica de fijación de complemento.

Se recomienda a los clínicos tener cuidado al obtener resultados positivos a partir de aves aparentemente sanas, es por ello importante realizar una segunda prueba a los 6 meses si el ave se mantiene sana pero si manifiesta algún signo, se debe hacer el examen inmediatamente (50).

#### **IV. PRUEBA INTRADERMICA (HIPERSENSIBILIDAD TIPO 4).**

Esta prueba se basa en la detección de linfocitos T4 sensibilizados, obteniendo respuesta si el individuo previamente ha tenido contacto con el Ag. Dicha respuesta se manifiesta como inflamación en el área donde se realizó la prueba. Tiene mayor utilidad con infecciones crónicas por la persistencia de Ac. Se debe de considerar que los animales a probar no deben recibir antibióticos, corticosteroides o vacunas dentro de las 72 horas previas al examen, para evitar inmunosupresión; notificar si está gestante, ya que en este estado fisiológico existe una supresión de Ac, y verificar la edad por el retraso funcional de la producción de Ac que presentan los individuos a temprana edad (37).

Se ha utilizado una prueba de sensibilidad en la piel de ovinos con AEO, concluyendo que la diferencia en la reacción cutánea entre los animales infectados y los controles positivos es muy pequeña para tener valor diagnóstico. Sin embargo Rodolakis, Dufrenoy y Souriau (1977) al utilizar esta misma prueba de hipersensibilidad en piel en cabras afectadas por clamidia obtuvieron resultados satisfactorios. Los títulos de Ac bajan a niveles de preinfección durante un período latente hasta manifestarse la infección con aborto (101).

Wilsmore y Abduljalil (1984), detectaron la presencia de la cepa de aborto C. psittaci A22 en corderos de 83-134 días de edad y ovinos Dorset de 2 años de edad que se expusieron al Ag en forma natural y artificial, se realizó la prueba intradérmica utilizando 0.1 ml en ambos párpados inferiores de 28 individuos. Se midió el espesor de la piel previamente y postinoculación, realizándose lecturas a las 24, 48 y 72 horas; obteniéndose una mejor reacción de piel a las 72 horas. La prueba fue considerada como positiva al existir una inflamación de más de 2 mm en los párpados. Así 15 de los 28 ovinos presentaron reacción positiva, ninguno de los corderos tuvo títulos elevados de Ac durante el experimento, y sólo 4 habían presentado títulos elevados de Ac poco tiempo después del nacimiento. Esto se debe probablemente a las inmunoglobulinas adquiridas pasivamente a

través del calostro. Los corderos que manifestaron una reacción, apenas alcanzaron los 2 mm de grosor, probablemente debido a la inmadurez de su mecanismo de inmunidad celular .

Tres ovinos a los que se les realizó esta prueba tuvieron resultados negativos y posteriormente desarrollaron AEO. Esto puede deberse a la facilidad de clamidia por replicarse, por la escasa respuesta inmune de estos animales principalmente durante la gestación (142).

## V.. HIBRIDACION CON Sonda DE ADN.

Es el apareamiento de dos cadenas complementarias de ADN. Este apareamiento es entre los nucleótidos A-T, (posee 2 puentes de unión) y G-C, (posee tres puentes de unión). El ADN (de la muestra) se calienta a 90°C o se somete a soluciones alcalinas para que los puentes de hidrógeno que unen a las cadenas se destruyan, abriendo la cadena; esto sucede principalmente en la unión A-T por ser más frágil. Se le añade la sonda genética que es un fragmento de ADN marcado con isótopos radiactivos, biotina o avidina, el cual es complementario del ADN del microorganismo que deseamos identificar<sup>2</sup>.

Hewinson y Griffiths (1991), emplearon PCR y técnicas de hibridación con el producto de PCR para diferenciar *C. psittaci* cepas no invasivas (intestinales) de cepas invasivas o patógenas (abortivas y queratoconjuntivitis) a partir de muestras de ovinos y bovinos, utilizando un iniciador que reconoce el gene de la PPME. Se amplificó el segmento de ADN, se tificaron los resultados y se observaron con luz ultravioleta. Posteriormente se transfirieron estos segmentos a filtros de nylon para proceder a la hibridación y conocer la secuencia del ADN de una cepa aviar. Obteniendo como resultado que la cepa patógena hibridizó con la cepa aviar, por la homología que existe entre ambas, aunque estos resultados fueron refutados por Herring (1991), advirtiendo que las muestras trabajadas posiblemente se encontraban contaminadas logrando así estos resultados (54,55,57).

---

<sup>2</sup> Comunicación verbal MVZ. Sahagún.

## VI. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El ADN es una cadena compuesta de 4 tipos de nucleótidos: adenina, timina, guanina y citosina cuya secuencia determina la información genética.

Saiki (1985) publicó el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite sintetizar un número ilimitado de copias de cualquier gene. Así a partir de una sola molécula de ADN el PCR genera 100,000 millones de moléculas idénticas en unas cuantas horas (106).

PCR es la amplificación de un segmento de ADN (del microorganismo de la muestra) el cual está limitado en sus extremos por dos iniciadores (primers). Esta técnica demuestra la presencia o ausencia de una secuencia genética (145).

La reacción incluye: el ADN blanco (muestra), la enzima Taq polimerasa que es la que permite la síntesis de ADN, dinucleótidos y los iniciadores, que son secuencias de ADN de 15 a 20 nucleótidos que son complementarios a los extremos del ADN que se desea amplificar. Un protocolo general incluye 32 ciclos de tres pasos, primero se eleva la temperatura a 90 a 94°C para abrir las cadenas de ADN, posteriormente se disminuye la temperatura hasta 60°C para permitir la hibridación de los iniciadores con el ADN blanco y el último paso es elevar la temperatura a 72°C para permitir la síntesis del ADN por la presencia de la enzima Taq polimerasa.

Al final de cada ciclo el número de cadenas se duplica obteniéndose un crecimiento logarítmico del segmento amplificado<sup>3</sup> El producto de PCR es analizado por electroforesis en gel de agarosa, por hibridación por una sonda de ADN específica (56,95).

Se ha desarrollado PCR para detectar a clamidia, siendo un método que se puede realizar en un día de trabajo y permite distinguir entre cepas ovinas intestinales y abortivas de *C. psittaci* provenientes de ovinos y ganado bovino (106).

---

<sup>3</sup> Comunicación verbal MVZ. Sahagún

Hewinson *et al.*, en (1991) e Imai (1993) han observado que al trabajar con muestras contaminadas con sólo el 5% de heces disminuye la sensibilidad de PCR, pero esto se soluciona, centrifugando la muestra a 10,000 rpm durante 5 minutos para aumentar hasta 100 veces la sensibilidad (56,60).

Al utilizar esta técnica se logra obtener el resultado en un día de trabajo (en promedio de 4-5 horas.), y aún con clamidia no viable se obtienen resultados positivos por su reacción específica y de alta sensibilidad (56).

PCR es comparable con la rapidez de ELISA y la sensibilidad del aislamiento en CC, siendo así mismo 200 veces más sensible que la tinción de Giemsa e IF indirecta (60). Sin embargo por su alta sensibilidad se requiere de mucho cuidado al manejar las muestras para evitar la contaminación con otros microorganismos, y obtener resultados falsos positivos. Para evitar esto es necesario utilizar durante el procedimiento un control negativo sin ADN y prepara las soluciones para PCR en un cuarto por separado con material nuevo, usar todo lo necesario para evitar contaminación por contacto con piel del trabajador y radiar la preparación con rayos ultravioleta previamente al procedimiento. (145)

## LITERATURA CITADA.

1. - Aitken, I. D. y Robinson, G. W.: Enzootic abortion of ewes: experimental infection. Proc. sheep Vet. Soc., **5**: 53-60 (1981).
2. - Allan, I. y Pearce, J. H.: Modulation by centrifugation of cell susceptibility to chlamydial infection. J. G. Microbiol., **11**: 87-92 (1978).
3. - Allan, I. y 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. Microb., **129**: 2001-2007 (1983).
4. - Allan, I. y Pearce, H.: Differential amino acid utilization by *Chlamydia psittaci* (strain guinea pig inclusion conjunctivitis) and its regulatory effect on chlamydial growth. J. Gen. Microb., **129**: 1991-2000 (1983).
5. - Andersen, A. A. y Tappe, J.: Genetic, immunologic, and pathologic characterization of avian chlamydial strains. JAVMA, **195**: 1512-1516 (1989).
6. - Anderson, I.E.: Comparison of five ovine isolates of *Chlamydia psittaci*: an evaluation of tree cell culture treatments. Med. Lab. Sci., **43**: 241-248 (1986).
7. - Anderson, I. E.: Comparison of some ovine *Chlamydia psittaci* isolates by indirect immunofluorescence. Vet. Microb., **13**: 69-74 (1987).
8. - Anderson, I. E. y Tan, T. W.: Efficacy against ovine enzootic abortion of an experimental vaccine containing purified elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. Vet. Microbiol., **24**: 21-27 (1990).
9. - Arizmendi, F. y Grimes, J.E.: Isolation of *Chlamydia psittaci* from pleural effusion in a dog. J. Vet. Diagn. Inv., **4**: 460-463 (1992).
- 10.- Arizmendi, F. y Grimes, J.E.: Evaluation of latex agglutination for detecting chlamydial antibody activity in psittacine bird sera by comparison with direct complement fixation. J. Vet. Diagn. Inv., **5**: 277-279 (1993).
- 11.- Baghian, A. y Shaffer, I.: Antibody response to epitopes of chlamydial major outer membrane proteins on infectious elementary bodies and of the reduced polyacrylamide gel electrophoresis-separated from. Inf. and Immun., **58**: 1379-1383 (1990).

- 12.- Baron, E.J. y Finegold, S.: Diagnostic microbiology, 8th.ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis-Toronto, 1990.
- 13.- Barron, A.: Microbiology of *Chlamydia*. C.R.C. Press, Inc., Bocaaton, Florida, U.S.A. 1988.
- 14.- Batteiger, B. E. y Roger, G. R.: Analysis of the humoral immune response to chlamydial genital infection in guinea pigs. Inf. and Immun. **55** :1767-1773 (1987).
- 15.- Bedson, S. P., Western G. T. y Simpson, L.: Observations on etiology of psittacosis. Lancet, **1** :235-236 (1930)
- 16.- Bell, C. W.: Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* in New Zealand. N. Z. Vet. J. **34** :15-16 (1985).
- 17.- Bovarnick, M. R. Y Miller, J. C.: The influence of certain salts, aminoacids, sugars, and proteins on the stability of *ickettsiae*. J. of Bact. **171** : 509-522 (1950).
- 18.- Brodie, T. A. y Duncan, J. L.: Role of enzootic abortion and toxoplasmosis in an outbreak of abortion in a scottish sheep flock. Vet. Rec. **113** :437-440 (1983).
- 19.- Brown, P. y Newman, J. A.: Methods of chlamydial antigen detection. JAVMA, **195** :1567-1570 (1989).
- 20.- Buzoni.Gatel, D. y Layachis, K.: Comparison of protein patterns between invasive and non-invasive ovine strains of *Chlamydia psittaci*. Res. in Vet. Scie. **46** :40-42 (1989).
- 21.- Buzoni.Gatel, D. y Rodolakis, A.: Amouse model compare virulence of abortion and intestinal ovine strains of *Chlamydia psittaci*: influence of the route of inoculation. Ann. de Microb. **134** : 91-99 (1983).
- 22.- Canfield, P.J. y Love, D.N.: Chlamydial infection in a colony of captive koalas. Aust. Vet. J. **68** :167-170 (1991).
- 23.- Cevenini, R. y Moroni, A.: Serological response to chlamydial infection in sheep, studied by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. FEMS Microb. Immun. **47** : 459-464 (1989).

- 24.- Chalmers, W. S. K. y Kewley, D. R.: Detection of *Chlamydia psittaci* from various animal species by reverse passive haemagglutination. Vet. Microb. **15** :57-64 (1987).
- 25.- Chasey, D. y Davies, P.: Immunoperoxidase detection of *Chlamydia ovis* in experimentally-infected cell culture. Bri. Vet. J. **137** :634-638 (1981).
- 26.- Cottrel, G. E.: Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria. La Prensa Médica Mexicana, S. A. México, D. F., 1986.
- 27.- Corkish, J. D. y Bevan B. J.: Diagnosis of psittacosis. Vet. Rec. **1** :42-43 (1991).
- 28.- Crowther, J.R. y Smith, H.: ELISA manual. Institute for animal health, PirBright Laboratory, 1987.
- 29.- Dagnall, G. J. R. y Wilmore, A. J.: A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies infetal membranes of sheep affected by ovine enzootic. Vet. Microb. **21** :233-239 (1990).
- 30.- Dawson, M. y Zaghlovi, A.: Ovine enzootic abortion: experimental studies of immune response. Res. Vet. Scien. **40** :59-64 (1986).
- 31.- Delgado, F. J.: Manual de enfermedades bacterianas de los ovinos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D. F. 1987.
- 32.- Eb, F. y Orfila, J.: Serotyping of *Chlamydia psittaci* by the microimmunofluorescence test: isolates of ovine origin. Inf. and Immun. **37** :1289-1291 (1982).
- 33.- Engström, P. y Norhagen G.: An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the IgA subclass distribution of antigen-specific antibodies. J. of Immun. Meth. **115** : 45-53 (1988).
- 34.- Escalante, C.: Determinación de anticuerpos contra *Chlamydia psittaci* en ovinos de el centro ovino del programa de extensión agropecuaria (COPEA) mediante una prueba indirecta de ELISA, Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, D. F., 1988.

- 35.- Escalante-Ochoa, C.: Comparative serological investigation of a sheep flock from Mexico forevidence of *Chlamydia psittaci* infection. M.Sc. thesis. University of Surrey School of Biological Sciences, England, 1991.
- 36.- Fan, V. S. C. y Jenkin, H. M.: Biosynthesis of phospholipids and neutral lipids of monkey kidney cells (LLC-MK-2) infected with *Chlamydia trachomatis* strain lymphogranuloma venereum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **148** :351 (1975).
- 37.- Fenner, F. y Bachman, P. A.: Virología veterinaria. ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España, 1992.
- 38.- Finn, J. y Ohlin, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G and M antibodies to *Chlamydia trachomatis* in human sera. J. Clin. Microb. **17** :848-852 (1983).
- 39.- Freeman, B. A.: Microbiología de Burrows. De Interamericana, México, D.F., 1985.
- 40.- Fuensalida-Draper y Rodolakis, A.: Kinetics of the complement fixing and immunofluorescence antibody response in experimental chlamydiosis in ewes. Ann. Reach. Vet. **9** :505-515 (1978).
- 41.- Fukushi, H. y Hayashi, Y.: An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Chlamydia psittaci* in animal sera. Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. **50** :265-270 (1985).
- 42.- Fukushi, H. y Hirai, K.: Proporsal of *Chloamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. Intern. J. of Syst. Bact. **42** :306-308 (1992).
- 43.- Gibson, J. y Egerer, R.: Improved isolation of *Chlamydia trachomatis* from a low-prvalence population by using polyethylene glycol. J. of Clin. Microb. **31** :292-295 (1993).
- 44.- Giménez, D. F.: Staining rickettsiae in yolk-sac culture. Stain Tech. **39** :135-140 (1969).
- 45.- Girjes, A. A. y Ellis, W. A. H.: Immuno-dot blot as a rapid diagnostic method for detection of chlamydial infection in Koalas (*Phasolarctos cinereus*). Vet. Rec. **133** :136-141 (1993).

- 46.- Girjes, A. A. y Weigler, B. J.: Detection of *Chlamydia psittaci* in free-ranging koalas (*Phascolarctos cinereus*): DNA hybridization and immuno-slot blot analyses. Vet.Micrb. **21** :21-39 (1989).
- 47.- Griffiths, P. C. y Philips, H. L.: Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin. Vet. Microb. **30** :165-177 (1992).
- 48.- Grimes, J. E.: *Chlamydia psittaci* latex agglutination antigen for rapid detection of antibody activity in avian sera: comparison with direct complement fixation and isolation results. Avian Dis. **30** :60-66 (1985).
- 49.- Grimes, J. E.: Serodiagnosis of avian *Chlamydia* infections. JAVMA. **195** :1561-1564 (1989).
- 50.- Grimes, J. E. y Phalen, D. N.: Chlamydial latex agglutination antigen and protocol improvement and psittacine bird anti-chlamydial immunoglobulin reactivity. Avian Dis. **37** :817-824 (1993).
- 51.- Grimes, J. E.: Interpretation of chlamydial titers. Assoc. of Avian Vet. **7** :159-160 (1993).
- 52.- Hatch, T. P.: Competition between *Chlamydia psittaci* and L cells for host isoleucine pools: a limiting factor in chlamydial multiplication. Inf. Immun. **12** :211-220 (1975).
- 53.- Haven, T. R. y Mills, K. W.: A comparison of isolation and a commercial ELISA for the diagnosis of chlamydiosis in psittacine birds. J. Vet. Diagn. Invest. **4** : 458-460 (1992).
- 54.- Herring, J. A.: PCR test for *Chlamydia psittaci*. Vet. Rec. **128** :555 (1991).
- 55.- Hewinson, R. G.: PCR test for *Chlamydia psittaci*. Vet. Rec. **128** :599 (1991).
- 56.- Hewinson, R. G. y Rankin, S. E. S.: Detection of *Chlamydia psittaci* from avian field samples using the PCR. Vet. Rec. **128** :129-139 (1991).
- 57.- Hewinson, R. G. y Griffiths, P. C.: Towards a differential polymerase chain reaction test for *Chlamydia psittaci*. Vet. Rec. **128** :381-382 (1991).
- 58.- Hinton, D. G. y Shiploey, A.: Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. Aust. Vet. J. **70** :174-176 (1993).

- 59.- Hoover, J. T.: Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). Amer. J. Vet. Res., **39** :541-547 (1978).
- 60.- Imai, Y.: Evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Chlamydia psittaci* DNA. Jpn. J. Vet. Res., **41** :17-61 (1993).
- 61.- Jawetz, E.: Microbiología médica. Ed. El Manual Moderno, México, D. F., 1992.
- 62.- Jégou, J. P. y Liotet, S.: The benefit of conjunctival scraping cytology in the biological diagnosis of conjunctivitis in the dog and cat. Méd. et Chirurg. de l'Anim. de Comp., **28** :567-580 (1991).
- 63.- Johnson, F. W. y Clarkson, M. J.: Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell culture. Vet. Rec., **113** :413-414 (1983).
- 64.- Johnson, F. W.: Isolation of *Chlamydia psittaci* from nasal and conjunctival exudate of a domestic cat. Vet. Rec., **114** :342-344 (1984).
- 65.- Khanna, R. N. S. y Gupta, R. K.: Isolation, identification and characterization of chlamydial isolates from cases of sheep abortion. Ind. J. of Ani. Scienc., **57** :121-123 (1987).
- 66.- Kirkbride, C. A.: Diagnoses in 1,784 ovine abortions and stillbirths. J. Vet. Diagn. Invest., **5** :398-402 (1993).
- 67.- Ley, H. D. y Flammer, K.: Performance characteristics of diagnostic tests for avian chlamydiosis. J. of the Assoc. of Avian Vet., **7** :203-207 (1993).
- 68.- Lema, F. y Everaere, S.: ELISA for detection of human antibodies to *Chlamydiae*. J. of Immun. Meth., **94** :153-159 (1986).
- 69.- Manire, G. P. y Galasso, J.: Persistent infection of HeLa cells with meningopneumonitis virus. J. Immunol., **83** :529-533 (1959).
- 70.- Margini, A.: Inmunología e inmunoquímica. Ed. Médica Panamericana, México, D. F., 1990.
- 71.- Markey, B. K. y McNulty, M. S.: Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. Vet. Microb., **36** :233-252 (1993).

- 72.- McCloenaghan, M. y Herring, A. J.: Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. Inf. and Immun. **45** :384-389 (1984).
- 73.- Mohammed, N. R. e Hillary, I. B.: Improved method for isolation and growth of *Chlamydia trachomatis* in McCoy cells treated with cycloheximide using polyethylene glycol. J. Clin. Pathol. **38** :1052-1054 (1985).
- 74.- Moore, F. M. y Petrak, M.: Diagnosis of chlamydial infection in pet birds: comparison of cloacal-swab culture and peroxidase-antiperoxidase methods. Avian Dis. **32** :157-162 (1988).
- 75.- Moore, F. M. y Mayjorie, C.: Comparison of culture, peroxidase-antiperoxidase reaction, and serum latex agglutination methods for diagnosis of chlamydiosis in pet birds. JAVMA, **199** :71-73 (1991).
- 76.- Moore, F. M. y Petrak, M. L.: Chlamydia immunoreactivity in birds with psittacosis: localization of *chlamydiae* by the peroxidase-antiperoxidase method. Avian Dis. **29** :1036-1042 (1985).
- 77.- Morgan, K. L. y Wills, J. M.: Isolation of *Chlamydia psittaci* from the genital tract of lambs: a possible link with enzootic abortion of ewes. Vet. Rec. **123** :399-400 (1988).
- 78.- Moulder, J.W.: The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. Annu. Rev. Microbiol. **20** :107 (1966).
- 79.- Moulder, J.W.: Intracellular parasitism: life in a extreme environment. J. of Infect. Dis. **130** :300-306 (1974).
- 80.- Moulder, J.W. y Levy, N. J.: Attachment defect in mouse fibroblasts (L-Cells) persistently infected with *Chlamydia psittaci*. Infect. Immun. **34** :285-291 (1981).
- 81.- Nanda, N. K. y Rao, A. T.: Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle. Indian Vet. J. **69** :483-486 (1992).
- 82.- Nayak, B. C. y Rao, A. T.: Chlamydial pneumonia (its serological diagnosis and mortality) in corridale rams in Orissa. Indian Vet. J. **59** :12-14 (1982).
- 83.- Newhall, W. J. y Batteger, B.: Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. Inf. and Immun. **38** :1181-1188 (1982).

- 84.- Nicolás, J. A. y Lamachère, M.: Les avortements infectieux des petits ruminants: leur diagnostic Les résultats obtenus par un laboratoire de Terrain. Revue Méd. Vét., **135** :211-215 (1984).
- 85.- Olloy, A. y Massoumou, A.: Epidémiologie des maladies abortives majeures de bovidés domestiques au Congo: enquête sérologique sur la brucellose, la chlamydiose et la fièvre Q. Revue Méd. Vét., **145** :663-668 (1994).
- 86.- Palmer, D. G. y Forshaw, D.: Demonstration of *Chlamydia psittaci* antigen in smears and paraffin tissue sections using a fluorescein isothiocyanate labelled monoclonal antibody. Aust. Vet. J., **65** :98-99 (1988).
- 87.- Pearson, J. E. y Gustafson, G. A.: Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds. JAVMA, **195** :1564-1567 (1989).
- 88.- Pépin, M. y Bailly, A.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of chlamydial antibodies in caprine sera. Ann. Rech. Vét., **16** :393-398 (1985).
- 89.- Pérez-Martínez, J. A. y Storz, J.: Antigenic diversity and cultural behavior of *Chlamydia psittaci* of mammalian Origin. Inf. and Immun., **50** :905-910 (1985).
- 90.- Pérez-Martínez, J. A. y Storz, J.: Persistent infection of L cells with an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. Inf. and Immun., **50** :453-458 (1985).
- 91.- Pérez-Martínez, J. A. y Schmeer, N.: 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).
- 92.- Pérez-Martínez, J. A. y Storz, J.: Género *Chlamydia*: biología básica propiedades antigénicas y potencial patógeno. Ciencia Vet., **4** :37-49 (1987).
- 93.- Pérez-Martínez, J. A.: Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinaria. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Depto de Bacteriología y Micología UNAM, 1989.
- 94.- Philips, H. L. y Clarkson, M. J.: Culture of sheep chlamydia in a sheep fibroblast cell culture. Res. in Vet. Scien., **53** :267-268 (1992).

- 95.- Pollard, D. R. y Tyler, S. D.: A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the specific detection of *Chlamydia* spp. Mol. and Cel. Prob. 3 :383-389 (1989).
- 96.- Prettejohn, M. W. H.: Screening of ewes for enzootic abortion in the sheep and goat health. State Vet. J. 42 :115-118 (1988).
- 97.- Quay, S. C. y Oxender, D. I.: Regulation of membrane transport. In: Biological Regulation and Development. Edited by: Goldberger. Plenum Press, New York (1980).
- 98.- Reed, S. I. y Anderson, L. E.: Use of cycloheximide to study independent lipid metabolism of *Chlamydia trachomatis* cultured in mouse L-Cells growing serum-free medium. Infect. Immun. 31: 668 (1981).
- 99.- Richmond, S. J. y Caul, E. O.: Fluorescent antibody studies in chlamydial infections. J. Clin. Microb. 1 :345-352 (1975).
- 100.- Rivera, A.: Determinación de infecciones subclínicas intestinales por *Chlamydia psittaci* en ovinos adultos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D. F., 1995.
- 101.- Rodolakis, A. y Dufrenoy, J.: Diagnostic allergique de la chlamydie abortive de la chèvre. Ann. Des. Rech. Vété. 8 :231-219 (1977).
- 102.- Rodolakis, A.: Diagnostic de la Chlamydie abortive. Ann. Rech. Vet. 19 :213-220 (1988).
- 103.- Rodolakis, A. y Souriau, A.: Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence. Vet. Microb. 31 :263-271 (1992).
- 104.- Rodriguez, A.: Comparación de fibroblastos de raton L-929 y fibroblastos de pollo (cultivo primario) en tres medios de cultivo para el aislamiento de *Chlamydia psittaci* cepas de aborto y de afección entérica en ovinos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D. F., 1995.
- 105.- Saad, M.: *In vitro* and *in vivo* studies on *Chlamydia psittaci* (ovis) infection. Diss. Abst. Inter. 49 :1454 (1988).

- 106.- Saiki, R. K. y Scharf, S.: Enzymatic amplification of  $\beta$  globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science, **230** :1350-1354 (1985).
- 107.- Sanchis, R.: Diagnostic direct des avortements infectieux de petits ruminants. Revue Méd. Vet., **133** :351-356 (1982).
- 108.- Salinas, J. y Caro, M. R.: Puesta a punto de una técnica de tipo ELISA para el diagnóstico serológico de la clamidiosis en el palomo. Med. Vet., **10** :183-187 (1993).
- 109.- Salinas, J. y Caro, M.: *Chlamydia psittaci*: estudio comparativo de tres antígenos para inmunofluorescencia indirecta. Med. Vet., **6** :207-210 (1991).
- 110.- Salinas, J. y Caro, M.: Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to *Chlamydia psittaci* in pigeon sera. Vet. Med. **40** :239-244 (1993).
- 111.- Sanderson, T. P. y Andersen, A. A.: Evaluation of a commercial solid-phase enzyme immunoassay for the detection of ovine *Chlamydia psittaci*. J. Vet. Diagn. Invest., **4** : 192- 193 (1992).
- 112.- Schachter, J. y Caldwell, H. D.: *Chlamydiae* . Ann. Rev. Microb., **34** :285-309 (1980).
- 113.- Schachter, J.: *Chlamydiae*. In: Manual of clinical microbiology. Edited by: Balows, A. , Hausler, W. J. y Shadoway, H. J. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1991).
- 114.- Schmeer, N. y Pérez-Martínez, J. A.: Dominance of *Chlamydia psittaci*-specific Ig G2 isotypes in naturally and experimentally infected cattle. Vet. Immun. and Immunopatho., **15**: 311-322 (1987).
- 115.- Seaman, J. T.: *Chlamydia* isolated from abortion sheep. Aust. Vet. J., **62** :436 (1985).
- 116.- Souriau, A. y Rodolakis, A.: Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Vet. Microb., **11** :251-259 (1986).

- 117.- Souriau, A. y LeRouzic, E.: Differentiation of abortion-inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test. Vet. Rec. **132** :217-219 (1993).
- 118.- Spears, P. y Storz, J.: *Chlamydia psittaci*, growth characteristics and enumeration of serotypes in cultured cells. J. Inf. Dis. **140** : 959-967 (1979).
- 119.- Spears, P. y Storz, J.: Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. Inf. and Immun. **24** :224-232 (1979).
- 120.- Spencer, W. N. y Johnson, F. W. A.: Simple transportation medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. Vet. Rec. **113** :535-536 (1983).
- 121.- Stamp, J. T. y Mc Ewen, A. D.: Enzootic abortion in ewes. Vet. Rec. **62** :251-254 (1950).
- 122.- Stamp, J. T. y Watt, J. A.: Enzootic abortion in ewes. Complement fixation test. J. of Comp. Pathol. **62** :93-101 (1952).
- 123.- Stites, D.: Inmunología básica y clínica. Ed. El manual moderno, México, D. F., 1984.
- 124.- Thomas, R. y Davison, H.: Use of the IDEIA ELISA to detect *Chlamydia psittaci* (*ovis*) in material from aborted fetal membranes and milk from ewes affected by ovine enzootic abortion. Br. Vet. J. **146** :346-367 (1990).
- 125.- Thornley, M. y Zamze, S. E.: Properties of monoclonal antibodies to the genus-specific antigen of *Chlamydia* and their use for antigen detection by reverse passive haemagglutination. J. of Gen. Microb. **131** :7-15 (1985).
- 126.- Tizard, I.: Inmunología veterinaria. de. Interamericana - Mc Graw-Hill. México, D. F., 1989.
- 127.- Treharne, J. D. y Dovey, S. J.: Immunological classification of TRIC agents and of some recently isolated LGV agents by the microimmunofluorescence test. Br. J. Vener. Dis. **48** : 18-25 (1972).
- 128.- Treuhaft, M. W. y Moulder, J. W.: Biosynthesis of arginine in L-cells infected with *Chlamydiae*. J. of Bact. **96** :2004-2011 (1968).

- 129.- Tsang, V. C. W. y Peralta, J. U.: Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Meth. in Enzymol., **92** : 377-391 (1983).
- 130.- Vanrompay, D. y Ducatelle, R.: Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Giménez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. J. Vet. Med., **39** :105-112 (1992).
- 131.- Vanrompay, D. y Ducatelle, R.: Primary pathogenicity of an European isolate of *Chlamydia psittaci* from turkeys poult. Vet. Microb., **38** :103-113 (1993).
- 132.- Vanrompay, D. y Van Neron, A.: Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjuntival specimens from turkeys. J. Clin. Microb., **32** :1470-1474 (1994).
- 133.- Vanrompay, D. y Ducatelle, R.: *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. Vet. Microb., **45** :93-119 (1995).
- 134.- Weigler, B. y Baldock, F.C.: Evaluation of an enzyme immunoassay test for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in free-ranging koala (*Phascolarctos cinereus*) in Southeastern Queensland, Australia. J. Wildli. Dis. Ass., **24** :259-263 (1988).
- 135.- Weir, D.M. y Stewart, J.: Inmunología. ed. El Manual Moderno, México, D. F., 1995.
- 136.- Weiss, E. y Wilson N. N.: Role of exogenous adenosine triphosphate in catabolic and synthetic activities of *Chlamydia psittaci*. J. Bact., **97** :719 (1970).
- 137.- Williams, J. C. y Vodkin, M. H.: Metabolism and genetics of chlamydias and rickettsias. Onderstep. J. Vet. Res., **54** :211-221 (1987).
- 138.- Wills, J. y Gruffydd, T. J.: Isolation of *Chlamydia psittaci* from cases of conjuntivitis in a colony of cats. Vet. Rec., **114** :344-346 (1984).
- 139.- Wills, J. M. y Millard, W. G.: Evaluation of a monoclonal antibody based ELISA for detection of feline *Chlamydia psittaci* . Vet. Rec., **119** :418-420 (1986).

- 140.- Wills, J. M. y Watson, G.: Characterisation of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse. Vet. Microb. 24 :11-19 (1990).
- 141.- Wilson, M. B. y Nakane, P. K.: In: Immunofluorescence and related staining techniques. Biomedical Press, North Holland. (1978).
- 142.- Wilmore, A. J. y Abduljalil, S. A.: Observation on a skin sensitivity test for ovine enzootic abortion. Br. Vet. J. 140 :468-477 (1984).
- 143.- Wilmore, A. J. y Davidson, I.: 'Clearview' rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection. Vet. Rec. 128 :503-504 (1991).
- 144.- Wong, K. H. y Skelton, S. K.: Utility of complement fixation and microimmunofluorescence assays for detecting serological responses in patients with clinically diagnosed psittacosis. J. of Clin. Microb. 32 :2417-2421 (1994).
- 145.- Wright, P. y Wynford-Thomas, D.: The polymerase chain reaction: miracle or mirage? a critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. J. of Pathol. 162 :99-117 (1990).
- 146.- Zuba, J. R. y Janseen, D. L.: Management of chlamydiosis in quarantined exotic columbiformes. J. of Zoo and Wildlif. Med. 23 :86-91 (1992).