

232
Rey



COMPARACION DE FIBROBLASTOS DE RATON L-929 Y
CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE POLLO EN
TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL DESARROLLO DE
Chlamydia psittaci CEPAS DE ABORTO Y DE AFECCION
ENTERICA EN OVINOS.

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

FALLA DE ORIGEN

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR

ERNESTO ARMANDO RODRIGUEZ REYES

ASESORA: M.V.Z. M.Sc. CRISTINA ESCALANTE OCHOA





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.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

EMILIO RODRÍGUEZ GONZALEZ Y
MARÍA ANGÉLICA REYES DE RODRÍGUEZ
CON TODO MI AMOR.

A MI ESPOSA, MI MAS GRANDE DIAMANTE:

ROCIO CHAVEZ TREJO
GRACÍAS POR APOYARME TANTO, TE AMO.

A MIS HIJOS:

ARMANDO, ÁNGEL Y ANGÉLICA
POR SER MIS DIAMANTES QUE ME
IMPULSAN PARA ALCANZAR EL ÉXITO.

A MIS HERMANOS:

ANA MARÍA Y MARCO.
TERE Y FELIPE.
EMILIO Y NORMA.
LETY
RICARDO.
ERIKA.
CON MUCHO CARÍÑO.

A MIS SEGUNDOS PADRES:

PEDRO CHAVEZ CRUZ
ANGELA TREJO BENITEZ
POR SU GRAN APOYO Y ACEPTACIÓN
¡GRACIAS!

A MIS CUÑADOS.

JUANIS Y ARTURO.
PEDRO.
ESTHER.
EDUARDO.
FAUSTINO.

A MIS AMIGOS:

DAVID, JOSÉ LUIS, ARACELI, MOISÉS,
FERMIN, JESÚS, ALEJANDRO Y CARMINA
POR SER DE LAS PERSONAS QUE HAN
COMPARTIDO MOMENTOS IMPORTANTES
DE MI VIDA.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS SEÑOR POR PERMITIRME ESTAR EN ESTE CAMINO, CON TU AYUDA SEGUIRÉ ADELANTE EN BUSCA DE MIS SUEÑOS, PORQUE ME HAS ENSEÑADO QUE ¡LOS SUEÑOS SE HACEN REALIDAD!.

A MI ASESORA:

CRISTINA ESCALANTE OCHOA
POR HABER PENSADO EN MI PARA TRABAJAR
A SU LADO, POR TENER MUCHA PACIENCIA Y RECIBIRME
CON UNA SONRISA, A PESAR DE LOS MALOS RATOS.
POR SER UNA GRAN AMIGA ¡GRACIAS CRIS!.

A MI GRAN AMIGO Y MAESTRO:

ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA
POR PERFECCIONAR MIS TRAZOS CON EL ASA,
POR FORMARME COMO BACTERIÓLOGO Y
PORQUE ME CONSIDERO SU DISCÍPULO.
POR TENER CONFIANZA EN MI.
EN VERDAD GRACIAS POR ENSEÑARME
A PENSAR EN GRANDE.

A TODA MI FAMILIA DEL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA QUE
SIEMPRE ME HA APOYADO Y HA CREÍDO
EN MI.

A JUANITO DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL
AVES DE LA F.M.V.Z. POR SU VALIOSA COLABORACIÓN
EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

AGRADEZCO A LA DOCTORA GRACIELA TAPIA PÉREZ
POR SU PARTICIPACIÓN EN ESTE TRABAJO MEDIANTE EL
ASESORAMIENTO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO
POR EL APOYO FINANCIERO OTORGADO A TRAVÉS DE SU
PROGRAMA PAPID IN-301592 DE LA U.N.A.M., CON EL CUAL
SE REALIZO ESTA INVESTIGACIÓN.

GRACIAS A ESTA UNIVERSIDAD QUE ME HA FORMADO COMO
UNIVERSITARIO.

GRACIAS A ESTA FACULTAD QUE ME HA FORMADO COMO MEDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA.

GRACIAS A MI DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA,
MI SEGUNDA CASA, DONDE ME ESTOY FORMANDO COMO
INVESTIGADOR.

Así mismo agradezco mediante un reconocimiento por labor a todos
aquellos hombres y mujeres que alguna vez formaron parte de este
Departamento de Microbiología e Inmunología
y con su trabajo y profesionalismo han puesto en alto
el nombre de este Departamento.

La historia se sigue escribiendo, porque hay quienes
se interesan en descubrir más secretos del mundo de las bacterias.

Por siempre en la lucha contra las bacterias.
E. Armando Rodríguez Reyes

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	38
LITERATURA CITADA.....	48
TABLAS.....	52
GRÁFICAS.....	65

RESUMEN

RODRIGUEZ REYES ERNESTO ARMANDO. Comparación de fibroblastos de ratón L-929 y cultivo primario de fibroblastos de pollo en tres medios de cultivo para el desarrollo de *C. psittaci* cepas de aborto y de afección entérica en ovinos (bajo la asesoría de Cristina Escalante Ochoa).

Se comparó la utilidad de dos tipos celulares, los fibroblastos de ratón (FR) L-929 y el cultivo primario de fibroblastos de pollo (FP) en tres medios de cultivo (ISCOVE'S, F12-K y F12) con la finalidad de determinar cual es la combinación que mejor favorece el desarrollo de *C. psittaci*. Se utilizaron dos cepas de *C. psittaci* de afección en ovinos, la cepa de aborto A22 (1.6×10^7 UFI*/ml) y la cepa entérica T23 (0.8×10^7 UFI*/ml), con las cuales se infectaron ambos tipos celulares, crecidos en los diferentes medios de cultivo y preparándose cinco repeticiones de cada combinación. Los monoestratos infectados fueron centrifugados a 2,200 xg durante 1 hora a 30°C y posteriormente incubados a 37°C en una atmósfera húmeda con 6% de CO₂. Los monoestratos fueron fijados con metanol absoluto y a continuación se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar el número de inclusiones citoplasmáticas en 300 células visualizadas. El medio F12 en comparación con los otros dos medios favoreció el desarrollo de la cepa A22 en ambos monoestratos celulares (FR y FP). En el caso de la cepa T23, el medio F12-K favoreció su desarrollo en los (FR) y el medio F12 favoreció su desarrollo en los (FP). La cepa A22 se desarrolló adecuadamente en ambos tipos celulares, no encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) en cuanto a su uso. Sin embargo la cepa T23 mostró un desarrollo, estadísticamente significativo ($P > 0.05$) en los fibroblastos de ratón L-929 en comparación con el desarrollo mostrado en el cultivo primario de fibroblastos de pollo. El número de inclusiones en los (FR), fue mayor para la cepa T23. Se concluye que los (FR) representan una mejor opción en comparación al uso de los (FP) para el desarrollo de *C. psittaci* cepas de aborto y de afección entérica en ovinos.

1- INTRODUCCION

Baker, J. A., en 1942 describió por primera vez en Inglaterra la infección clamidial en animales (7). Posteriormente, Stamp *et al*, en 1950 identificaron a *Chlamydia psittaci* como la causa del aborto enzoótico ovino en Escocia (49), y más tarde el problema fue reconocido en países como Estados Unidos, Norte y Sur de África y Grecia (14,46,51).

El orden *Chlamydiales* está conformado únicamente por la familia *Chlamydiaceae*, la cual contiene al género *Chlamydia* con tres especies importantes: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci* (20). Recientemente ha sido propuesta una cuarta especie dentro de este género, *C. pecorum* (5,17).

1.1 Características Generales.

Las clamidias son microorganismos relacionados con las bacterias Gram negativas en lo que se refiere a su pared, son consideradas microaerofílicas, no poseen cápsula, no son móviles, no producen esporas y carecen de algunos mecanismos para la producción de energía metabólica, lo cual las obliga a un parasitismo intracelular, en donde la célula proporciona los intermediarios ricos en energía (Cuadro 1). Se multiplican en el citoplasma de la célula huésped mediante un ciclo de desarrollo en el que se diferencian dos partículas morfológica y funcionalmente distintas, el cuerpo elemental (CE), cuya función es infectar células susceptibles y el cuerpo reticular (CR), cuya función es la multiplicación bacteriana intracelular por fisión binaria (9,47,58). El cuerpo elemental (CE) es una estructura condensada, de 200 a 300 nm de diámetro, que tiene la capacidad de permanecer viable fuera de la célula hasta 3 meses. El cuerpo reticular (CR) es una estructura de 500 a 1000

nm de diámetro, que tiene la capacidad de multiplicarse únicamente dentro de la célula, ya que fuera de ésta se destruye (9) Cuadro 2.

Debido a su parasitismo intracelular obligado, las clamidias fueron consideradas originalmente virus. Sin embargo, difieren de éstos en muchos aspectos (Cuadro 3).

1.2 Ciclo de desarrollo

Se reconocen cinco fases del ciclo de desarrollo del género *Chlamydia*:

- 1) Contacto inicial e internalización del CE en la célula susceptible.
- 2) Transformación del CE, metabólicamente inerte, en un CR, metabólicamente activo aproximadamente 2 horas después de la infección de la célula.
- 3) Crecimiento y replicación del CR usando componentes de la célula (ATP, aminoácidos, vitaminas). Esto ocurre de 10 a 20 horas después de la infección.
- 4) Reorganización de los CE a partir de los CR. No se conocen los factores que inducen este nuevo cambio.
- 5) Cuando la célula ya no resiste la infección, se presenta la lisis de la misma con la consecuente liberación de CE (infecciosos) y CR (no infecciosos). Los primeros infectarán nuevas células susceptibles y los segundos serán destruidos (37,38)

1.3 Interacción inicial célula-clamidia.

Probablemente el mayor obstáculo encontrado por el CE infectante es la repulsión electrostática causada por cargas electronegativas presentes en la superficie de la célula. La membrana externa de las clamidias se cubre con cargas negativas a un pH fisiológico, esta propiedad es significativa en vista del papel reportado de las polielectrolitos en la infectividad *in vitro*. Con base en experimentos realizados *in vitro* con dextran DEAE, se piensa que

CUADRO 1. CARACTERISTICAS DEL GENERO Chlamydia

- Tienen un hábitat intracelular obligado.
- En su ciclo de desarrollo se diferencian 2 partículas distintas, la forma infecciosa cuerpo elemental (CE) y la forma reproductiva cuerpo reticular (CR).
- Se relacionan con las bacterias Gram negativas pero no presentan peptidoglicano en su pared.
- Presentan un antígeno de género específico (Lipopolisacárido).
- Utilizan el ATP de la célula huésped para la síntesis de proteína clamidial.
- Tienen un genoma pequeño (660 KDa).

Modificado por Moulder, J. W. :ASM News 50, 353, 1984. Con autorización en Barron, A. L.: Microbiology of *Chlamydia* CRC. press, Inc. florida 1988.

CUADRO 2. DIFERENCIAS ENTRE CUERPOS ELEMENTALES Y CUERPOS RETICULARES.

Propiedad	Cuerpo Elemental	Cuerpo Reticular
Infectividad	SI	NO
Replicación	NO	SI
Inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma	SI	NO
Tóxicidad para Ratón	SI	NO
Tóxicidad para macrófagos	SI	NO
Transporte de ATP	NO	SI
Síntesis de Proteínas	NO	SI

Modificado por Moulder, J.W. ASM News, 50,353, 1984 Con autorización en Barron, A. L.: Microbiology of *Chlamydia* CRC, press Inc. Florida 1988.

CUADRO 3. DIFERENCIAS ENTRE LAS CLAMIDIAS Y LOS VIRUS.

Característica	Clamidas	Virus
Poseen ambos tipos de ácidos nucleicos. ADN y ARN	SI	NO
Se multiplican por fisión binaria	SI	NO
Presentan una pared celular resistente a la acción de la lisozima.	SI	NO
Poseen ribosomas	SI	NO
Poseen algunas enzimas activas metabólicamente	SI	NO
Su crecimiento se inhibe por la acción de algunos antimicrobianos (tetraciclina y eritromicina)	SI	NO

Tomado de Barron, L. A.: Microbiology of *Chlamydia*, CRC. press, Inc. Florida 1988.

algún tipo de cationes pueden actuar neutralizando la superficie aniónica de la bacteria, permitiendo así, el contacto inicial entre la célula y el cuerpo elemental (fase infectante), con la subsecuente internalización de éste último (4,30).

1.4 Destino intracelular de la clamidia internalizada.

Tres posibles destinos se han postulado para clamidia una vez que ésta ha sido internalizada, de acuerdo a estudios realizados *in vitro* en los cultivos celulares y muy probablemente pueda suceder en los tejidos de animales vivos.

1) Infección productiva o descubierta.- Es el resultado de los procesos propios del ciclo de desarrollo del microorganismo, en donde un CE da origen a un CR el cual es capaz de multiplicarse para luego volver a formar un cuerpo elemental, tal como se ha descrito previamente en el ciclo de desarrollo.

2) Infección no productiva o cubierta.- En este caso una forma pobremente definida del CE persiste en el citoplasma celular durante varios ciclos de división celular, con ausencia de inclusiones visibles. *In vitro* la infección cubierta puede presentarse en respuesta a factores ambientales que tienen que ser estudiados.

Ambas infecciones necesitan que la degradación fagolisosomal se inhiba para que puedan presentarse.

3) Degradación dentro del compartimiento fagolisosomal.- Generalmente ocurre cuando el CE es fagocitado por macrófagos especializados. Sin embargo, en ciertos casos el microorganismo induce la inhibición de la unión fagolisosomal, permitiendo su escape de la lisis. Todos los cuerpos elementales de las clamidias pueden ser internalizados por los macrófagos pero solo ciertas cepas son capaces de infectar productivamente estas células.

Así mismo, no cabe duda que el CE es eficientemente endocitado por macrofagos no especializados y una vez internalizado éste previene la fisión fagolisosomal (41). La habilidad para inducir la internalización y prevenir dicha fisión es mediada directamente por la acción de antígenos superficiales. Algunos investigadores han postulado que un grupo de proteínas principales de la membrana externa del CE son las responsables de estas acciones (13).

La variabilidad de los resultados obtenidos *in vitro* está influenciada por el tipo de célula, el biotipo de clamidia y las condiciones de infección (15,37,43).

1.5 Estructura y composición.

La pared de las clamidias es muy similar a la de las bacterias Gram negativas, sin embargo no posee ácido N-acetil murámico; tiene un contenido relativamente alto en lípidos y posee proteínas fijadoras de penicilina. La lisozima no tiene efecto sobre las paredes celulares de clamidias. Presentan un genoma circular de PM 660 kDa, que es relativamente pequeño comparado con el de los demás procariontes (29,39).

1.5.1 Antígenos clamidiales.

El género *Chlamydia* posee un antígeno común de grupo característico, constituido por un lipopolisacárido termoestable que se encuentra asociado con la membrana externa de la pared celular. Posee así mismo antígenos específicos de especie y antígenos específicos de serovariedad; éstos son proteínas de la membrana externa. Los antígenos específicos son compartidos por un número limitado de clamidias, pero un microorganismo dado puede contener varios antígenos específicos (42).

1.5.2 Determinantes de virulencia.

Estos no han sido identificados por completo, sin embargo de acuerdo a investigaciones realizadas, se ha postulado la posible participación de algunas de las siguientes moléculas clamidiales, debido su participación durante las diferentes etapas del proceso de infección celular.

Proteína Principal de la Membrana Externa (MOMP).- Esta es la proteína más abundante del cuerpo elemental, ya que corresponde al 60% del total de las proteínas. Su papel no se ha esclarecido, pero en estudios realizados *in vitro* se ha comprobado que la neutralización mediada por IgG anti-MOMP no afecta de ningún modo la interacción inicial ni la penetración de las clamidias a las células, pero si disminuye la actividad patógena del organismo después de la internalización. La heterogenicidad antigénica de esta proteína ha sido estudiada utilizando anticuerpos monoclonales, y se ha determinado en especies y subespecies de clamidias la presencia de de epitopes, los cuales pueden estar de alguna forma relacionados durante la etapa inicial del proceso de infección. (12,13,41)

Proteínas Ricas en Cisteína.- Sólo se encuentran en la membrana externa del cuerpo elemental. La proteína principal de este grupo tiene un peso de 60 KD, es altamente inmunogénica y se considera un epitope especie específico. Se involucran en la estabilidad de la pared mediante una serie de enlaces disulfuro y se piensa que de algún modo tienen que ver con la virulencia del microorganismo (4)

Adhesinas.- Se ha identificado un tipo de polipéptidos presente en los cuerpos elementales que se unen a la superficie de las células eucarióticas. El bloqueo de la unión e infectividad

por anticuerpos antiadhesina, respaldan la teoría del papel que juegan en la virulencia del microorganismo (23).

Lipopolisacárido.-No se ha podido demostrar el papel de éste en la entrada de clamidias a la célula. Este lipopolisacárido clamidial ha sido identificado como la molécula responsable de la hemoaglutinación de los CE. Sin embargo, la naturaleza conservada del epítipo específico del género, sugiere una función esencial para la supervivencia intracelular y al mismo tiempo es posible que tenga un papel importante en los mecanismos patogénicos a nivel molecular del género *Chlamydia* (41).

Plásmidos.- Todas las cepas patógenas de clamidia poseen un pequeño plásmido. Los genes de los plásmidos se transcriben temporalmente a la mitad y al final de su ciclo de desarrollo, lo cual sugiere que tienen un papel importante en éste (4).

1.6 Desarrollo y metabolismo.

El desarrollo de clamidias dentro de la célula infectada depende básicamente de los nutrientes recibidos por la misma célula, sin embargo las clamidias parecen tener un metabolismo endógeno similar al de algunas bacterias. Poseen enzimas de las rutas del ciclo de Krebs, ciclo de las pentosas y glucólisis, pero parecen carecer de las enzimas requeridas para la red de ATP (compuesto de alta energía), por lo que requieren intermediarios ricos en energía provenientes de la célula huésped para desempeñar sus actividades biosintéticas (9).

Las clamidias son capaces de sintetizar polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (18).

1.6.1 Metabolismo de Carbohidratos.

Moulder en 1965 detectó 3 enzimas de la vía de las pentosas fosfato, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la fosfoglucona isomerasa, pero fallaron para detectar exoquinasa (1-6 difosfofructoquinasa y la piruvatoquinasa) (36).

Un aspecto importante a considerar es que las clamidias no pueden utilizar la glucosa sola, únicamente pueden utilizar la glucosa 6P para sintetizar algunos carbohidratos y lípidos.

La NADH citocromo reductasa se ha detectado en *Chlamydia psittaci*, sin embargo no se han detectado ni flavoproteínas ni citocromos.

Vacuolas de glucógeno son mediadas por una glucógeno sintetasa de clamidias, la cual utiliza ADP-glucosa como sustrato directamente de la célula huésped (56).

1.6.2 Metabolismo de Proteínas.

Las clamidias tienen la capacidad de utilizar las reservas de aminoácidos del huésped para la síntesis de sus proteínas y también tienen la capacidad de sintetizar algunos aminoácidos cuando la célula no dispone de los aminoácidos requeridos. Moulder detectó la enzima diaminopimelato descarboxilasa la cual se utiliza para la biosíntesis de lisina y con base en diferentes trabajos realizados con *C. psittaci*, determinó que también tiene la capacidad de sintetizar histidina (35).

Estudios realizados han determinado que el crecimiento de clamidias en cultivos celulares puede ser regulado por la concentración de aminoácidos en el medio. Tal es el caso de la carencia de cisteína que retarda la reorganización del cuerpo reticular (CR) hacia cuerpo elemental (CE) en el serotipo "E" de *C. trachomatis*. Así mismo, cepas de *C. psittaci* permanecieron latentes en las células al incubarse en medios deficientes de

isoleucina, y con mínimas cantidades de isoleucina se reactivaron. Lo mismo sucedió cuando se adicionó ciclohexamida, ya que ésta estimula la incorporación de isoleucina derivada de la proteína del huésped a las proteínas clamidiales (2,9).

Después de realizar diversos experimentos en el laboratorio se observó que *C. psittaci* es capaz de crecer en medios libres de arginina, mientras que cepas de *C. trachomatis* no pudieron crecer. Estudios complementarios determinaron que *C. psittaci* incorpora glutamato y ornitina dentro de la fracción de arginina de la proteína de la célula epitelial infectada por lo que finalmente se deduce que son capaces de la biosíntesis de arginina (54).

En un estudio comparativo de los requerimientos de aminoácidos para cepas de aborto y de afección enterica en ovinos fue posible determinar cuales son los aminoácidos esenciales para el crecimiento de cada cepa, de tal forma que para las cepas de aborto, dichos aminoácidos son: arginina, histidina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina y valina. Para las cepas de afección enterica dichos aminoácidos son: arginina, histidina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina y treonina (28).

1.6.3 Síntesis de Lípidos.

Chlamydia psittaci es capaz de sintetizar lípidos complejos. Compuestos como el piruvato, glutamato, aspartato e isoleucina pueden ser utilizados para la biosíntesis de lípidos (18).

1.7 Enfermedades.

C. trachomatis es considerada el agente más común de enfermedades sexualmente transmitidas en el hombre (5,22).

C. pneumoniae recientemente ha sido reconocida como una causa importante de neumonías y otras infecciones agudas del tracto respiratorio en humanos (20).

C. psittaci es un patógeno primario de especies no humanas y ha sido aislada de aproximadamente 130 especies diferentes de aves, artrópodos, moluscos, ranas y de otros animales como: rumiantes, equinos, gatos, animales de laboratorio, tejones y koalas entre otros (31). Se asocia con varias enfermedades que incluyen: psitacosis y ornitosis, encefalomiелitis bovina, enteritis, poliartritis, queratoconjuntivitis, neumonía, aborto en ovinos y enfermedades genitales. Además, el hombre puede adquirir la enfermedad si tiene un contacto continuo con animales enfermos o portadores asintomáticos por lo que se considera una zoonosis (3,4,7,8,14,29,33,40,44,48). La infección en humanos causada por *Chlamydia psittaci* fue primeramente reconocida en 1879 por un médico suizo, quien describió un cuadro no común de neumonía en pacientes que tuvieron un contacto estrecho y continuo con aves tropicales. La infección cobró interés mundial en 1929 y 1930 cuando una epidemia de neumonía ocasionó más de 750 casos en diferentes países, incluyendo los Estados Unidos. En 1956, se reportaron en Estados Unidos un total de 856 casos, sin embargo el número de casos reportados en 1984 fue de 172, lo que indica que en este país el problema ha declinado notablemente (29).

El tipo de enfermedad y la severidad de los signos clínicos en las diferentes especies animales dependen de la cepa de este microorganismo. En mamíferos, se asocia con neumonías, enteritis, encefalomiелitis, aborto, infecciones urogenitales, poliartritis,

poliserositis, mastitis, hepatitis y conjuntivitis (52). En aves produce pericarditis, arosaculitis, neumonía, adenitis nasal lateral, peritonitis, hepatitis y esplenomegalia (22). Tanto en aves como en mamíferos, la severidad de la enfermedad puede variar desde infecciones clínicamente inaparentes hasta infecciones sistémicas severas y generalizadas que cursan con fiebre, anorexia, letargia y ocasionalmente shock y muerte.

Por otro lado, estudios realizados con ovinos infectados experimentalmente sugieren que *C. psittaci* puede permanecer en estado latente en el tejido linfoide y resurge cuando éstos se encuentran inmunosuprimidos (25).

Actualmente se han identificado 8 biotipos y 9 inmutipos de *C. psittaci* que afectan a las diferentes especies animales ocasionando diferentes manifestaciones clínicas. Las cepas que afectan a ovinos pertenecen a los biotipos 1 y 2 (cuadro 4).

1.7.1 Aborto enzoótico ovino.

El aborto enzoótico es una enfermedad que afecta de manera importante la producción ovina en distintos países. El modo natural de infección es por ingestión o inhalación de *C. psittaci* (27). Se cree que las ovejas de rebaños con abortos se infectan poco después de haber nacido. Así mismo, se ha sugerido que la infección se establece primeramente en tonsilas, y a partir de éstas *C. psittaci* es diseminada por sangre a otros órganos. *C. psittaci* puede persistir en la hembra de una forma latente dando origen a una clamidiosis intermitente de bajo grado y eventualmente infectar placenta (26).

La infección de la placenta usualmente se establece entre los 60 y 90 días de gestación, y los primeros cambios patológicos se detectan después de 90 días de gestación (11). El mecanismo por el cual *C. psittaci* migra a partir del lado materno de la placenta hacia el feto sigue siendo incierto. Después de aproximadamente 60 días de gestación, la

CUADRO 4. BIOTIPOS DE *C. psittaci* DE MAMIFEROS INCLUYENDO UNA SEROTIFICACION HECHA POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

<i>Cepa de Chlamydia</i>	<i>Biotipo</i>	<i>Serotipo</i>	<i>Huésped</i>	<i>Condición Clínica</i>
EBA - 59 - 795	1	1	Bovino	Aborto
EBA - L1 - 578	1	1	Bovino	Aborto
Lw - 508	1	1	Bovino	Enteritis
SV - 139	1	1	Bovino	Vesiculitis seminal
B - 577	1	1	Ovino	Aborto
Fitz - 65	1	1	Ovino	Aborto
Sinovial equina	ND	1	Equino	Sinovitis
Neumonía equina	ND	1	Equino	Neumonía
Neumonía bovina L1	ND	1	Bovino	Neumonía
Aborto en cabras	ND	1	Cabra	Aborto
Lw - 613	2	2	Bovino	Poliartritis
Lw - 623	2	2	Bovino	Encefalomiелitis, aritis esporádica
Lw - 679	2	2	Ovino	Poliartritis
Fe - Stra	2	2	Ovino	Conjuntivitis y poliartritis
66 - P - 130	3	3	Bovino	Normal (heces)
Jp - I - 751	ND	9	Ovino	Normal (heces)
L - 71	4	4	Suino	Poliartritis
PR - 86	ND	4	Suino	Infección generalizada
17105	4	6	Suino	Aborto
1708	ND	6	Suino	Neumonía
Neumonía bovina L-14	ND	6	Bovino	Neumonía
545	5	5	Suino	Normal (heces)
2 - 10	ND	7	Bovino ?	Neumonía ?
Neumonitis felina	7	7	Gatos	Vacuna viva
GP - IC	8	8	Ratones	Conjuntivitis.

Tomado de Pérez, M. J. A. y Storz, J.: Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. Infect. Immun. 5:905-910 1985.

invasión del estroma de la carúncula por las vellosidades coriónicas coincide con hemorragias a partir de los vasos maternos y el resultado es la formación de hematomas. Las lesiones iniciales en la placenta involucran al limbo de los placentomas en la región hiliar. Las inclusiones citoplasmáticas se pueden observar en las células del trofoblasto (11).

Conforme la infección progresa hay una considerable pérdida de las células del epitelio coriónico. En este momento hay un infiltrado de células inflamatorias, depósitos de fibrina y una arteritis purulenta a nivel del mesénquima placentario, el cual se encuentra engrosado. Inclusiones citoplasmáticas están presentes en el epitelio endometrial, y el corion se encuentra severamente afectado (11).

Durante las últimas fases de la infección ocurre una severa necrosis del epitelio endometrial y por consiguiente el aborto (11).

Ovinos infectados experimentalmente presentan fiebre de 40 a 41 °C por 1 a 2 días y en ocasiones se prolonga de 3 a 5 días (49).

En rebaños de ovinos infectados enzoóticamente, los abortos ocurren año tras año con una proporción del 1 al 5 %, mientras que en aquellos rebaños en los cuales *C. psittaci* ha sido recientemente introducida, el porcentaje de abortos aumenta hasta un 30 % (52). Muchos abortos ocurren durante el último mes de gestación, sin embargo otros ocurren antes de los 100 días de gestación. En ovinos machos *C. psittaci* puede también infectar los órganos genitales y contamina el semen. Sin embargo, no se han encontrado evidencias de la participación de estos animales en la diseminación de la enfermedad, por lo que es importante estudiar este aspecto más a fondo (1).

1.7.2 Enteritis en ovinos.

Se ha reportado que el tracto gastrointestinal parece ser el hábitat natural de *C. psittaci* tanto en aves como en mamíferos, por lo que el microorganismo puede ser aislado a partir de heces de animales clínicamente sanos (21,28,33,48). La mucosa intestinal es el sitio común de las cepas de *C. psittaci* que producen cuadros entéricos, con manifestaciones clínicas de diarrea principalmente en animales jóvenes.

C. psittaci fue primeramente aislada a partir de heces de bovinos con diarrea, y la infección clamidial en esta especie se ha presentado en diversas partes del mundo (43,59)

Cabras y borregos clínicamente normales pueden albergar a *C. psittaci* en el tracto digestivo y excretarla al medio ambiente a través de las heces. Es importante considerar que el microorganismo puede ser aislado a partir del abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon (9).

Las superficies serosas del abomaso e intestino delgado pueden presentar un aspecto granular. En las serosas duodenal y cecal hay hemorragias por sufusiones, la mucosa interna del intestino delgado suele observarse congestionada y con hemorragias petequiales. En la mucosa interna yeyunal es aparente el edema. La válvula ileocecal en ocasiones se muestra congestionada y con hemorragias petequiales, la mucosa del ciego se encuentra hiperémica. Los nódulos linfáticos mesentéricos se observan agrandados y edematosos (9).

Tanto las cepas de aborto como las cepas de afección entérica en ovinos se encuentran incluidas dentro del inmunotipo 1 debido a la relación antigénica que presentan (44).

1.8 Diagnóstico.

El diagnóstico de la infección clamidial puede realizarse utilizando diversas técnicas de laboratorio, entre las que destacan las siguientes:

- a) Examinación directa de muestras clínicas, utilizando diversas técnicas de tinción, para lograr la visualización de la fase extracelular "CE" (Giménez, Ziehl-Neelsen Modificado, Castañeda y Wright) o la fase intracelular "CR" (Giemsa, Giménez Modificado y Machiavello).
- b) Detección de anticuerpos específicos contra *C. psittaci* mediante el uso de diversas pruebas serológicas (Fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta, radioinmunoensayo y ELISA entre otras).
- c) Aislamiento del microorganismo mediante el uso de diferentes medios biológicos (cultivos celulares, inoculación de embriones de pollo de 7 días de edad e inoculación de animales de laboratorio) (9, 29).

La visualización microscópica del agente mediante el uso de diversos métodos de tinción es un método diagnóstico que debe considerarse con cautela, ya que el éxito de éste depende de la calidad de los colorantes, del tiempo de decoloración y de la habilidad del observador.

Las pruebas serológicas tienen la ventaja de no requerir la presencia de microorganismos vivos en las muestras que se procesan; estas técnicas son considerablemente menos sensibles que el cultivo celular (19).

De las diferentes técnicas serológicas la inmunofluorescencia ha demostrado ser eficaz en la diferenciación de cepas de aborto y cepas de infección entérica en ovinos, considerando la morfología de las inclusiones citoplasmáticas (28,48). Las cepas de aborto

forman inclusiones citoplasmáticas compactas, mientras que las inclusiones formadas por las cepas de afección entérica son difusas (21). Hay reportes en los cuales se han podido distinguir cepas de aborto de otras cepas de *C. psittaci* mediante el uso de pruebas de seroneutralización, la morfología de las inclusiones y por la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Con esta última se localizan anticuerpos en el suero, o se muestran e identifican antígenos en tejidos, o en cultivos celulares. Esta técnica utiliza el isotiocianato de fluoresceína (FITC); el cual se conjuga con rapidez con las inmunoglobulinas sin afectar su reactividad y cuando se irradia con luz ultravioleta o luz azul a 145 y 290 nm respectivamente, emite una luz visible de color verde cercana a los 525 nm. La técnica de inmunofluorescencia indirecta tiene varias ventajas sobre la técnica de inmunofluorescencia directa ya que cada molécula de anticuerpos que se une al antígeno también se unirá a varias moléculas de antiglobulinas marcadas, por lo que la fluorescencia será considerablemente más brillante que en la prueba directa. De modo similar, al utilizar sueros con antiglobulinas específicas para cada isotipo de inmunoglobulinas, también puede determinarse el isotipo de anticuerpo específico presente en el suero. Todas las pruebas de este tipo deben acompañarse del uso de controles adecuados (57).

En un estudio realizado por Vanrompay *et al.* en 1992, se determinó que la técnica de inmunofluorescencia es más específica para la detección de clamidias que la tinción de Giménez modificada. De igual forma se determinó que la línea celular BGM (buffalo green monkey) fue el huésped artificial más sensible para el aislamiento de cepas de *C. psittaci* de origen aviar, seguida por el embrión de pollo, la línea celular Vero y la línea celular McCoy (55).

Entre las técnicas diagnósticas para la infección clamidial, el aislamiento e identificación del agente etiológico constituye el diagnóstico definitivo para todos los casos de enfermedad relacionados con *C. psittaci*. Tradicionalmente, el aislamiento de *C. psittaci* se intenta mediante inoculación de embriones de pollo, animales de laboratorio y líneas celulares selectas con el material sospechoso y para la detección del microorganismo con ayuda de la técnica de inmunofluorescencia u otros métodos de tinción (9). El embrión de pollo se utiliza debido a que se muestra susceptible a una gran variedad de cepas de *C. psittaci*, por lo que es comúnmente utilizado para la elaboración de antígenos clamidiales y para el crecimiento de algunas cepas de difícil aislamiento. Por otro lado, el cultivo celular es considerado el método más sensible y específico para el aislamiento e identificación de clamidias, y la susceptibilidad de éste se ha demostrado que varía en relación a la cepa del microorganismo, de tal forma que la afinidad por las distintas líneas celulares es diferente, entre cepas que afectan a ovinos y cepas que afectan a aves (55).

Las líneas celulares comúnmente utilizadas para el aislamiento de clamidias incluyen: MacCoy, HeLa229, BHK-21, BGM y L-929; ésta última ha sido empleada con buenos resultados en el aislamiento de cepas de *C. psittaci* involucradas en procesos de aborto e infecciones subclínicas intestinales (6,29).

Es importante decidir cual es el medio más apropiado así como las diferentes variables (pH, nutrientes, sales, atmósfera, temperatura) en un medio de cultivo para obtener un adecuado crecimiento *in vitro* de las células. Un medio de cultivo artificial debe proveer los nutrientes esenciales para la célula, los cuales incluyen todos aquellos elementos necesarios para la división celular y substratos para el metabolismo energético. Vitaminas y elementos traza cumplen con una función catalítica en el medio. Así mismo, el medio debe

estar libre de sustancias tóxicas e inhibidoras y todos los nutrientes deben estar cuantitativamente ajustados dando un balance adecuado a todos los componentes del medio. Estos nutrientes entran en la célula y son utilizados en diversas reacciones metabólicas celulares. En adición a esto, muchos medios contienen componentes que no son nutrientes pero que son importantes tales como el rojo de fenol, el cual pone de manifiesto el cambio de pH en el medio, el bicarbonato de sodio y el HEPES (hidroxietil-1-piperazina etano ácido sulfónico), los que en conjunto, permiten un ajuste adecuado y estabilización del pH del medio para favorecer el crecimiento de las células*.

De los diferentes factores de crecimiento para las células, las poliaminas son consideradas importantes precursores de la multiplicación y crecimiento de células *in vitro* (53).

Otro método para detectar *C. psittaci* es el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la infección en ovinos y bovinos. Sin embargo, la utilidad diagnóstica de este tipo de pruebas, debe ser investigada más a fondo (24).

II - JUSTIFICACION.

Dado que el embrión de pollo sustenta aparentemente el cultivo de toda cepa de *C. psittaci*, que la susceptibilidad de las diferentes líneas celulares varía de acuerdo al origen de la cepa de este microorganismo, y que su desarrollo en cultivos celulares puede ser regulado por la concentración de aminoácidos en el medio; resulta importante comparar la utilidad de los fibroblastos de pollo (cultivo primario) con los fibroblastos de ratón (línea celular L-929) en tres medios de cultivo con la finalidad de seleccionar la combinación más adecuada que favorezca el desarrollo de *C. psittaci* y facilite posteriormente su aislamiento a partir de muestras clínicas.

III - HIPOTESIS.

El cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo permitirá una mayor o más rápida propagación de *C. psittaci* que los fibroblastos de ratón L-929.

IV - OBJETIVOS.

1.- Comparar la utilidad del cultivo primario de fibroblastos de pollo y fibroblastos de ratón L-929 para el aislamiento de *Chlamydia psittaci* cepas de aborto y de afección entérica en ovinos.

2.- Comparar la utilidad de los medios para el cultivo celular ISCOVE'S, F12K y F12 para el desarrollo de fibroblastos de origen murino y aviar, infectados con *C. psittaci*.

V- MATERIAL Y METODOS.

Todo el material de cristalería utilizado en el presente trabajo fue lavado con jabón limpiador de cristalería, enjuagado con agua de la llave 5 veces, hervido con agua bidestilada y posteriormente esterilizado en autoclave con el fin de eliminar cualquier sustancia inhibidora para las células.

El material plástico utilizado para el cultivo celular (botellas de poliestireno^b de 25 y 75 cm² y viales con cubreobjetos^c de 13 mm), fué nuevo.

5.1 Tipos Celulares.

Los tipos de células utilizados en este trabajo fueron:

- a) Línea celular L-929 de fibroblastos de origen murino adquirida de In Vitro S.A.
- b) Cultivo primario de fibroblastos de origen aviar proporcionados por el Departamento de Producción Animal Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, obtenido de embiones de pollo de 9 días como se describe más adelante.

5.2 Medios de Cultivo.

El crecimiento de las clamidias *in vitro* dentro de la célula depende de la concentración de nutrientes que aporta el medio de cultivo a las células.

^b NUNC, KAMSTRUP DENMARK.

^c BIBBY STERILIN LTD STONE STAFFS, UNITED KINGLAND.

Para obtener éxito en el crecimiento de las células (monoestratos celulares), es importante utilizar agua deionizada o tridestilada para la elaboración de los medios de cultivo, los cuales deberán estandarizarse a un pH de 7.4.

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron:

- a) Dulbecco Modificación Iscove's (ISCOVE'S)^d.
- b) Mezcla Nutritiva F12 Ham Modificación de Kaighn's (F12-K)^d.
- c) Mezcla Nutritiva F12 Modificación de Coon's (F12)^d.

Los componentes de cada uno de los medios anteriormente mencionados se muestran en las Tablas 1 a 4.

El medio Iscove's contiene selenio, aminoácidos, vitaminas, buffer HEPES y nitrato de potasio. Este medio fue originalmente reportado como útil para el crecimiento de linfocitos B y T de origen murino, así como tejido hematopoyético, y macrófagos de origen murino. Suplementado con suero fetal bovino, permite el crecimiento de fibroblastos de origen murino^e.

La mezcla Nutritiva F12 Ham Modificación de Kaighn's es una modificación de Ham 12 y Coon's F12, la cual ha incrementado las concentraciones de aminoácidos y piruvato. Se recomienda su uso para el crecimiento de células diferenciadas de pollo y ratón y para el cultivo primario de células hepáticas humanas. La mezcla nutritiva F12 fue originalmente formulada por Ham, R. G. como un medio libre de suero que permitía el crecimiento de células transformadas en cultivos. Esta es una compleja mezcla, la cual incluye muchos

^d SIGMA CHEMICAL COMPANY ST. LOUIS MO U.S.A.

^e THE LATEST TECHNICAL AND PRODUCT NEWS
FROM SIGMA CELL CULTURE
VOLUMEN 9 NUMERO 2 1993.

elementos traza. Además, se puede utilizar con un suplemento de suero y puede soportar el crecimiento de una gran variedad de cultivos celulares, tanto normales como transformados. La modificación de Coon's consiste en que este medio contiene el doble de aminoácidos y piruvato, e incluye ácido ascórbico. Así mismo, las concentraciones de sales se han modificado, Tablas 2 y 4.

Los medios fueron reconstituidos con agua tridestilada, se les agregó bicarbonato de sodio según lo recomendado por el fabricante en cada caso; se ajustó el pH a 7.4 utilizando NaOH 1N o HCl 1N. Posteriormente, los medios fueron esterilizados por filtración, mediante el uso de membranas estériles con poros de 0.22 μ , para después ser complementados con 12.5% de suero fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, estreptomicina 100mg/ml, kanamicina 100mg/ml y vancomicina 200 mg/ml. Ya complementados, los medios fueron mantenidos en refrigeración hasta su uso.

5.3 Cepas de *Chlamydia psittaci*.

Las cepas de *C. psittaci* utilizadas en este trabajo fueron: La cepa de aborto A22 y la cepa de afección entérica T23, ambas de afección en ovinos*. Ambas fueron diluidas 1/50 en el medio sucrosa fosfato glutamato (SPG) con una concentración final para la cepa A22 de 1.6×10^7 unidades formadoras de inclusión por ml (UFI/ml) y para la cepa T23 0.8×10^7 UFI/ml. Ambas cepas ya diluidas se mantuvieron en refrigeración por 15 horas antes de la infección de los monoestratos celulares

* Donadas por el Dr. P.C., Griffiths
Central Veterinary Laboratory
Weibridge, Inglaterra.

5.4 Anticuerpos utilizados.

En el presente trabajo se utilizó un suero policlonal obtenido de ovinos infectados con *C. psittaci* para la detección de inclusiones citoplasmáticas*.

Se utilizó un conjugado Anti-IgG de ovino marcado con FITC. SIGMA, para la realización de las pruebas de inmunofluorescencia.

5.5 Preparación de los monoestratos.

En total se manejaron 18 combinaciones diferentes por cada cepa de *C. psittaci* resultantes de las siguientes tres variables que fueron consideradas: línea celular, medio de cultivo y tiempo de incubación. Es importante considerar que se prepararon 5 viales por cada combinación. (Tabla 5)

Se prepararon 90 viales (30 viales para cada medio). Cada vial se preparó con 1 ml de la suspensión celular a una concentración de 1.3×10^5 células/ml para los fibroblastos de ratón y 2.5×10^5 células/ml para los fibroblastos de pollo. Posteriormente se incubaron a 37°C sin CO₂.

5.5.1 Línea 929 de fibroblastos de origen murino.

El crecimiento de las células se llevó a cabo sobre botellas de plástico de 25 cm² a 37°C utilizando los tres medios de cultivo por separado. Para cada botella se utilizaron 1×10^6 células/5 ml de medio. Después de 48 horas una vez que el monoestrato celular tenía de un 95 a un 100% de confluencia, las células se tripsinizaron de la siguiente forma:

* Donado por el Dr. A. Andersen
Department of Agriculture of de United States.

- 1.- Se eliminó el medio de las botellas.
- 2.- Se enjuagó el monoestrato con 3 ml de una solución de tripsina-verseno al 0.3%, se eliminó el exceso de ésta y se dejó incubando en agitación de 3 a 5 min a 37°C.
- 3.- Separadas por completo las células, se resuspendieron en 5 ml de medio complementado, se homogenizaron perfectamente y se midió el volumen de la suspensión celular.
- 4.- Para la cuenta celular, se tomaron 0.02 ml de azul tripan y se depositaron en un tubo Eppendorf, después se agregaron 0.02 ml de la suspensión celular (relación 1:1), se homogenizaron perfectamente y dicha mezcla se depositó en el hemocitómetro de la cámara de Neubauer. Realizada la cuenta, la forma en que se determinó el número de células totales se muestra en el siguiente ejemplo:

Volumen de la suspensión celular = 5.8 ml.

Número de células totales en los cinco recuadros de- la cámara de Neubauer (cien)	÷	Número de recuadros (cinco)	x	Factor de dilución (dos)	x
--	---	--------------------------------	---	-----------------------------	---

Capacidad volumétrica

de la cámara(10⁴) = x 10⁴ células/ml x Volumen de la Número de células
suspensión ce- = totales de la suspensión-
lular.

De tal forma que:

$$100 \div 5 = 20 \times 2 = 40 \times 10^4 \text{ células/ml}$$

$$= 4 \times 10^5 \text{ células/ml}$$

$4 \times 10^5 \text{ cels.} \times 5.8 \text{ ml} = 23.2 \times 10^5 \text{ cels./5.8 ml}$ (Número de células totales de la suspensión).

Una vez determinado el número total de células en la suspensión, el cálculo para obtener el número de viales a preparar se realizó considerando la concentración celular de la suspensión y la concentración recomendada para un tipo de células en particular. Por ejemplo, si la suspensión celular es de 23.2×10^5 células en 5.8 ml. y la concentración requerida para la preparación de viales con fibroblastos de ratón es de 1.3×10^5 cels/ml, se divide la concentración de la suspensión celular entre la concentración requerida de la línea de fibroblastos, obteniendo así el número de viales que se pueden preparar.

Ejemplo:

$$23.2 \times 10^5 \text{ cels./5.8 ml} \div 1.3 \times 10^5 \text{ cels/ml} = 17 \text{ viales con } 1.3 \times 10^5 \text{ cels/ml}$$

En este caso, es importante aforar el volumen de la suspensión celular (5.8 ml) hasta 17 ml, de tal forma que se deposite en cada vial 1 ml con 1.3×10^5 células

5.5.2 Cultivo primario de fibroblastos de pollo de origen aviar.

Se utilizaron embriones de pollo de 7 a 9 días, los cuales fueron macerados una vez que se eliminaron patas, vísceras y ojos. La separación completa de las células se logró mediante el uso de tripsina-verseno al 0.3%. Las células ya separadas se resuspendieron en 20 ml del medio a utilizar. A partir de dicha suspensión se realizó una dilución 1/40, y esta

suspensión celular se utilizó para realizar la cuenta en la cámara de Neubauer. Los cálculos para la preparación de los viales se realizaron como ya se explicó anteriormente.

5.6 Procedimiento de infección.

Se observó con el microscopio invertido cada vial, y una vez que los monoestratos celulares formados en los cubreobjetos alcanzaron una confluencia del 60 al 70% (después de 15 a 18 horas de incubación), y se les cambió el medio ahora adicionado con polietilenglicol al 7% (1 ml de medio por vial). Posteriormente se realizó la infección de los monoestratos con las cepas de *C. psittaci* ya diluidas y mantenidas en refrigeración (100 µl por vial)

Los monoestratos infectados fueron centrifugados a 2,200 xg durante una hora a una temperatura de 30 °C. Posterior a la centrifugación se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 6% de CO₂.

5.7 Fijación de los monoestratos.

Los monoestratos celulares fueron fijados a tres diferentes tiempos, considerando como punto de referencia el tiempo promedio en el que cada cepa de *C. psittaci* forma inclusiones citoplasmáticas maduras (cepa A22 70.5 hrs y cepa T23 30.5 hrs) (16). Por consiguiente, las células infectadas con la cepa A22 fueron fijadas a las 48, 72 y 96 hrs, mientras que las células infectadas con la cepa T23 fueron fijadas a las 24, 48 y 72 hrs.

Transcurrido el tiempo de incubación, bajo condiciones de esterilidad se eliminó el medio de los monoestratos y se agregó a cada vial 1 ml de metanol absoluto, se dejó actuar por 5 min. y después fué eliminado; se extrajo todo el excedente de metanol y se dejó secar

el cubreobjetos perfectamente, para luego realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

5.8 Técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Por medio de esta técnica se detectan anticuerpos específicos y los antígenos correspondientes para dichos anticuerpos mediante el uso de antiglobulinas marcadas con fluoresceína. Para poner de manifiesto la reacción fluorescente, se incubó el suero (anticuerpos específicos contra el antígeno que se desea identificar) con el monoestrato celular infectado, formado sobre los cubreobjetos. Transcurrido el tiempo de incubación se lava el suero de los monoestratos, dejando sólo los anticuerpos específicos unidos al antígeno. Esos anticuerpos se detectan después de incubar las preparaciones con un conjugado (antiglobulinas marcadas con FITC). Después de que el conjugado se elimina mediante un lavado y se examina la preparación, la fluorescencia indica que el anticuerpo que existía en el suero se unió al antígeno, demostrando la presencia del mismo.

Procedimiento:

- 1.- Los cubreobjetos con los monoestratos infectados, previamente fijados con metanol, fueron colocados en un soporte plano.
- 2.- A cada cubreobjetos se le agregó 0.1 ml de suero (suero policlonal de ovinos) diluido 1/100.
- 3.- Las preparaciones se dejaron incubando 15 minutos a 37 °C, en una atmósfera húmeda.

4.- Las preparaciones fueron lavadas 2 veces (2 minutos por/lavado) con solución amortiguadora de fosfatos (PBS con un pH 7.4).

5.- Se agregó a cada preparación 0.1 ml de un conjugado marcado con FITC (anti IgG de ovino), diluido 1/1000. Antes de ser utilizado, el conjugado fué contrastado con azul de Evans (0.5 microlitros/ml) y centrifugado a 6,500 r.p.m. durante 5 minutos.

6.- Las preparaciones se incubaron a 37 °C durante 15 minutos en una cámara húmeda

7.- Las preparaciones fueron lavadas como se mencionó anteriormente.

8.- Las preparaciones fueron montadas en portaobjetos nuevos, utilizando 6 microlitros de resina por cada preparación.

9.- Se utilizó un control negativo (monoestratos sin infectar) para corroborar la ausencia de reacciones inespecíficas y saber que la prueba está funcionando.

10.- Se realizó la lectura en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo de 40X.

Con esta técnica las células se observaron de color rojo, mientras que las inclusiones se observaron de color verde fluorescente.

En cada preparación, se observaron 300 células, en las cuales se detectó y contabilizó el número de inclusiones presentes.

Se obtuvo el promedio del número de inclusiones en las 5 preparaciones y con estos valores se aplicó el análisis estadístico.

5.9 Análisis estadístico.

En el presente trabajo los datos se analizaron utilizando el Modelo de Efectos Fijos:

y'

Donde (y') es el número de cuerpos de inclusión transformado de forma tal que:

$$y' = \sqrt{y + 1}$$

La variable número de cuerpos de inclusión se transformará con el objeto de cumplir con los supuestos de normalidad.

Este modelo se analizó por el método de cuadrados mínimos (Steel y Torrie) (50) en el paquete SAS. (Statistical Analysis System) para PC en su modalidad PROC GLM (General Linear Model). Después se realizó un análisis de separación de medias (turkey) para los efectos que resultaron significativos.

VI - RESULTADOS.

En forma general, después de observar repetidamente los monoestratos celulares en el microscopio invertido, fué posible determinar que de los tres medios de cultivo utilizados, el medio F12-K fue el que permitió un crecimiento más rápido de ambos tipos de cultivo celular, el medio ISCOVE'S promovió un crecimiento intermedio, mientras que en el medio F12 las células crecieron más lentamente.

6.1 Tipos celulares infectados con la cepa de aborto A22.

6.1.1 Fibroblastos de ratón L - 929. En los tres medios de cultivo probados el comportamiento de la cepa de aborto fue similar (Gráfica 1). A las 48 horas se observó un número determinado de inclusiones, que fue superado por el número de inclusiones visualizadas a las 72 horas. En los tres casos a las 96 horas, el número de inclusiones citoplasmáticas observadas disminuyó. Las mejores combinaciones se muestran a continuación:

- 1.- ISCOVE'S - 5.2 inclusiones (72 horas).
- 2.- F12-K - 3.8 inclusiones (72 horas).
- 3.- F12 - 7.2 inclusiones (72 horas).

Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. En el medio ISCOVE'S se observó un promedio de 1.2 inclusiones citoplasmáticas a las 48 horas, 5.2 inclusiones a las 72 horas y 0.4 inclusiones a las 96 horas. En el medio F12-K se observó un promedio de 1.4 inclusiones citoplasmáticas a las 48 horas, 3.8 inclusiones a las 72 horas y 2.8 inclusiones a

las 96 horas. En el medio F12 se observaron 1, 7.2 y 1.4 inclusiones citoplasmáticas en promedio a las 48, 72 y 96 horas respectivamente.

La cepa de aborto A22 formó un mayor número de inclusiones citoplasmáticas en las células crecidas en el medio F12 (Gráfica 1, Tabla 7).

6.1.2 Fibroblastos de pollo cultivo primario. El comportamiento de la cepa de aborto en las células de pollo fue similar al observado en las células de ratón (Gráfica 2). Es decir, el número de inclusiones citoplasmáticas que se observó en los tres medios fue mayor a las 72 horas en comparación al número de inclusiones observado a las 48 horas. A las 96 horas el número de inclusiones disminuyó. Las mejores combinaciones se muestran a continuación:

1.- ISCOVE'S - 2.4 inclusiones (72 horas).

2.- F12-K - 4 inclusiones (72 horas).

3.- F12 - 6.4 inclusiones (72 horas).

Los resultados de cada combinación se muestran en las Tablas 6 y 7. En el medio ISCOVE'S se observó un promedio de 1.6 inclusiones citoplasmáticas a las 48 horas, 2.4 inclusiones a las 72 horas y 1.4 inclusiones a las 96 horas. En el medio F12-K se observó un promedio de 1.2 inclusiones citoplasmáticas a las 48 horas, 4 inclusiones a las 72 horas y 2.8 inclusiones a las 96 horas. En el medio F12 se observaron 3, 6.4 y 3.6 inclusiones citoplasmáticas en promedio a las 48, 72 y 96 horas respectivamente.

A las 72 horas el mayor número de inclusiones citoplasmáticas formadas, fue observado en las células crecidas en el medio F12 (Gráfica 2, Tabla 7).

6.2 Tipos celulares infectados con la cepa entérica T23.

6.2.1 Fibroblastos de ratón L - 929. El mayor número de inclusiones citoplasmáticas se observó a las 24 horas. (Gráfica 3)

- 1.- ISCOVE'S - 10.6 inclusiones (24 horas).
- 2.- F12 - K - 11.4 inclusiones (24 horas).
- 3.- F12 - 7.4 inclusiones (48 horas).

Los hallazgos obtenidos se muestran en las Tablas 7 y 8. En el medio ISCOVE'S se observó un promedio de 10.6 inclusiones citoplasmáticas a las 24 horas, 5.4 inclusiones a las 48 horas y 1.2 inclusiones a las 72 horas. En el medio F12-K a las 24 horas se observó un promedio de 11.4 inclusiones citoplasmáticas, 4.8 inclusiones a las 48 horas y 5.2 inclusiones a las 72 horas. En el medio F12 se observaron 3, 7.4 y 6.4 inclusiones citoplasmáticas en promedio a las 24, 48, y 72 horas respectivamente (Tabla 7).

El mayor número de inclusiones citoplasmáticas fue observado a las 24 horas de incubación en las células crecidas en el medio F12-K (Gráfica 3).

6.2.2 Fibroblastos de pollo cultivo primario. En cada uno de los tres medios el número mayor de inclusiones citoplasmáticas se observó a diferentes tiempos:

- 1.- ISCOVE'S - 2.4 inclusiones (72 horas).
- 2.- F12-K - 3.2 inclusiones (24 horas).
- 3.- F12 - 6.6 inclusiones (48 horas).

Las observaciones realizadas se muestran en las Tablas 7 y 8. En el medio ISCOVE'S se observaron 2 inclusiones citoplasmáticas a las 24 horas, 1.2 inclusiones a las 48 horas y 2.4 inclusiones a las 72 horas. En el medio F12-K a las 24 horas se observaron 3.2 inclusiones citoplasmáticas, 2.6 inclusiones a las 48 horas y 2 inclusiones a las 72 horas.

En el medio F12 se observaron 5,2, 6,6 y 5,2 inclusiones a las 24, 48 y 72 horas respectivamente.

El mayor número de inclusiones fue observado a las 48 horas de incubación en las células crecidas en el medio F12 (Gráfica 4).

De los dos tipos celulares utilizados, los fibroblastos de pollo se afectaron más por la fuerza centrífuga aplicada durante el proceso de infección

En los monoestratos celulares infectados con las cepas A22 y T23 de *C. psittaci* a las 96 y 72 horas de incubación respectivamente, se observó un puntilleo fluorescente fuera de las células, lo cual corresponde a los CE extracelulares, que no se detectaron a otros tiempos de incubación.

6.3 Análisis estadístico

6.3.1 Desarrollo de *C. psittaci* Cepa A22.

El procesamiento de los datos por el método de cuadrados mínimos, considerando la triple interacción (Tipo Celular - Medio de Cultivo - Tiempo de incubación), determinó que no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa A22 de *C. psittaci* en cuanto al uso de ambos tipos de cultivo celular. Los fibroblastos de ratón desarrollados en el medio F12 a las 72 horas presentaron un promedio de 2.8* inclusiones citoplasmáticas, mientras que los fibroblastos de pollo desarrollados en el medio F12 a las 72 horas presentaron 2.7* inclusiones citoplasmáticas (Tabla 9).

El tiempo de incubación en el que se formó el mayor número de inclusiones citoplasmáticas fue de 72 horas.

Considerando únicamente la doble interacción (Tipo Celular - Medio de Cultivo), la cepa A22 mostró un mejor desarrollo en los fibroblastos de pollo (cultivo primario) en comparación con el desarrollo mostrado en los fibroblastos de ratón L-929 (Tabla 10).

6.3.2 Desarrollo de *C. psittaci* Cepa T23.

El procesamiento de los datos por el método de cuadrados mínimos determinó que si existe diferencia significativa ($P > 0.05$) en cuanto al uso de ambos tipos de cultivo celular, ya que en los fibroblastos de ratón se formó un mayor número de inclusiones citoplasmáticas en comparación al número de inclusiones formadas en las células de pollo. Los fibroblastos de ratón en los medios F12-K e ISCOVE'S presentaron 3.7* y 3.4* inclusiones respectivamente a las 24 horas, mientras que los fibroblastos de pollo en los medios F12-K e ISCOVE'S presentaron 2.01* y 1.7* inclusiones citoplasmáticas a las 24 horas (Tabla 11).

El tiempo en el que se formó el mayor número de inclusiones citoplasmáticas fue de 24 horas.

Considerando únicamente la doble interacción (Tipo celular - Medio de Cultivo), la cepa T23 mostró un mejor desarrollo en los fibroblastos de ratón L-929 en comparación con el desarrollo mostrado en los fibroblastos de pollo (cultivo primario) (Tabla 12).

* Medias minimocuadráticas de la variable número de cuerpos de inclusión (NCI) transformadas $y' = \frac{y}{\sqrt{1+T}}$

VII - DISCUSION.

La cepa de aborto A22 se desarrolló adecuadamente en ambos tipos celulares y el número de inclusiones citoplasmáticas formado fue muy similar en ambos casos, no encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) en cuanto a su uso. De lo anterior se deduce que tanto los fibroblastos de origen murino como los de origen aviar, favorecen de igual forma el desarrollo de las cepas de aborto de *C. psittaci*.

La cepa T23 mostró un mejor desarrollo estadísticamente significativo ($P > 0.05$) en los fibroblastos de ratón L-929 en comparación con el desarrollo mostrado en los fibroblastos de pollo (cultivo primario). Investigaciones realizadas han postulado la presencia de receptores específicos para clamidias a nivel de la membrana de las células epiteliales (23), por lo que podría pensarse que en el caso de los fibroblastos de pollo quizás el número de receptores presentes en la membrana para la cepa T23 específicamente es menor que aquellos presentes en los fibroblastos de origen murino, por lo que la adhesión y el consecuente desarrollo de la bacteria difiere en ambos hospederos.

Para la cepa A22, el tiempo en el que se encontró un mayor número de inclusiones citoplasmáticas fue a las 72 hrs, lo cual se relaciona directamente con el tiempo en el que la cepa A22 forma inclusiones citoplasmáticas maduras (70.5 hrs.) (14). Esto debe considerarse cuando se intente el aislamiento de *C. psittaci* a partir de muestras clínicas con un diagnóstico presuntivo de aborto enzootico ovino.

Para la cepa T23 el tiempo en el que se detectó el mayor número de inclusiones fue a las 24 horas de fijación, lo cual se relaciona directamente con el tiempo en el que la cepa T23 forma inclusiones citoplasmáticas maduras (30.5 hrs.) (14), por lo que debe tomarse en

consideración siempre que se intente el aislamiento de cepas entericas de *C. psittaci* a partir de muestras de clínicas de heces e intestino de ovinos.

Sin embargo, a las 96 horas se observó una disminución en el número de inclusiones citoplasmáticas de la cepa A22 y a las 72 horas de la cepa T23. Aunado a ésto, se observó la presencia de cuerpos elementales extracelulares (estructuras esféricas fluorescentes de color verde). Es notorio el hecho de que la confluencia celular a estos tiempos es muy alta, lo cual da lugar a la formación de acúmulos celulares y ésto impide una visualización adecuada de las inclusiones formadas en el interior de cada célula independiente. Así mismo, existe la posibilidad de que las células en un momento dado ya no resistan la infección y se presente la lisis con la liberación tanto de CE, CR y formas intermedias, lo cual daría como resultado una disminución de inclusiones citoplasmáticas visibles y un aumento en el número de formas extracelulares.

Experimentos *in vitro* han determinado que el crecimiento de *C. psittaci* dentro de las células está determinado por la concentración de aminoácidos en el medio (1,7). Este hecho es importante al considerar que el medio F12-K fue de los 3 medios utilizados el que promovió un crecimiento más rápido de ambos tipos de fibroblastos (de ratón y de pollo), infectados y no infectados. Esta mezcla se modificó en relación a la mezcla nutritiva F12 Han's, por lo que se incrementaron las concentraciones de aminoácidos, muchos de los cuales son importantes para el desarrollo de ambas cepas de *C. psittaci* (28), contiene piruvato el cual es un importante precursor de energía de alto poder para la célula, la cual es utilizada por las clamidias, así como también contiene putresina, precursor de poliaminas mismas que tienen una íntima relación con la multiplicación y crecimientos celulares, ya que son factores de crecimiento para células cultivadas *in vitro* y se considera que intervienen en

la estabilización de células intactas, organelos subcelulares y membranas (53). Así mismo, se modificaron las cantidades de sales minerales.

Conforme el tiempo de incubación transcurrió en los cultivos celulares que utilizaron este medio, fue más aparente la formación de acúmulos celulares con inclusiones no contabilizables para ambas cepas, por lo que es muy probable que esta mezcla sea fácilmente asimilable y utilizada por la célula huésped, al haber sido diseñado para el crecimiento de células diferenciadas de rata y pollo*, lo cual podría resolverse al reducir la concentración de células durante la preparación de los viales. Este medio, por otra parte puede ser de gran utilidad para iniciar el cultivo a partir de células congeladas que en muchas ocasiones tardan en crecer.

El medio ISCOVE'S es un medio rico en nutrientes, con una adecuada combinación de aminoácidos, vitaminas, glucosa y sales minerales. Los monoestratos infectados tuvieron un crecimiento adecuado y la visualización de las inclusiones citoplasmáticas resultó sencilla. Al analizar su composición se puede determinar que este medio es el más enriquecido de los tres; sin embargo, no fue el que más favoreció el desarrollo de ambas cepas de *C. psittaci*, pero sí promovió un crecimiento moderado de ambos tipos celulares. A diferencia de los otros dos medios éste medio contiene, nitrato de potasio y selenito de sodio y carece de putresina, ac. linoleico, timidina, y diversas sales minerales y tiene menor concentración de biotina, lo cual pudo en un momento dado ocasionar un menor desarrollo de *C. psittaci*.

Este medio es una buena elección para iniciar cultivos de monocapa, recuperación de células congeladas, propagación de células y es de utilidad para el aislamiento del microorganismo en cultivos celulares.

* SIGMA CHEMICAL COMPANY ST. LOUIS MO U.S.A.

El medio F12 es una mezcla nutritiva con incrementadas concentraciones de aminoácidos, muchos de los cuales son importantes para el desarrollo de cepas de aborto y de afección entérica en ovinos (28), contiene piruvato y una mezcla de vitaminas y sales minerales. Este medio promovió un crecimiento más lento de ambos tipos celulares en comparación con los otros 2 medios; lo cual favorece la visualización de células individuales y por consiguiente la identificación de las inclusiones citoplasmáticas características se realiza con mayor facilidad. Así, este medio es una buena alternativa para la preparación de los monoestratos celulares utilizados para el aislamiento de *C. psittaci* a partir de muestras clínicas y para la propagación de cepas de laboratorio.

En el caso de la cepa A22, el medio F12 fue el medio que más favoreció su desarrollo en ambos monoestratos celulares. Es posible que la asimilación de esta mezcla nutritiva por parte de la célula sea lenta y por lo tanto el crecimiento de la célula es también lento. Sin embargo, aparentemente su utilización por parte de las clamidias dentro de la célula es adecuada y por lo tanto su desarrollo se ve favorecido.

Para la cepa T23, el medio F12-K fue el que más favoreció su desarrollo en los fibroblastos de ratón y el medio F12 fue el medio que más favoreció su desarrollo en los fibroblastos de pollo. Es posible que los nutrientes de la mezcla nutritiva F12-K sean asimilados por las células de origen murino más rápida y eficientemente que las de origen aviar por lo que el crecimiento de las mismas es también más rápido. Así mismo, la utilización por parte de las células de los diversos nutrientes que lo componen, de algún modo pueden favorecer el desarrollo de las clamidias dentro de la célula.

Con base en los resultados obtenidos en este experimento y tomando en cuenta que uno de los factores que regulan el crecimiento celular es la composición del medio de cultivo

(2,9), es posible determinar que la concentración de células para la preparación de los monoestratos está dada en función de éste.

Considerando únicamente la interacción monoestrato celular medio de cultivo, los resultados del análisis estadístico indican que los fibroblastos de ratón L-929 en el medio F12-K son la mejor opción para el aislamiento de *C. psittaci*. Sin embargo, es importante considerar que el medio F12-K promueve un desarrollo muy rápido de las células originando la formación de acúmulos celulares, lo cual dificulta la visualización de las inclusiones citoplasmáticas. El disminuir la concentración de células al preparar los monoestratos celulares éste medio ofrece mejores resultados* .

En el caso de los fibroblastos de pollo (cultivo primario), los resultados de la doble interacción indican que el medio de cultivo que promovió un mejor desarrollo de *C. psittaci* fué el medio F12.

De los dos tipos celulares, los fibroblastos de ratón L-929 han sido utilizados por diferentes investigadores para el cultivo de las clamidias, por lo que el manejo de esta línea y las características de su crecimiento son bien conocidas (29). El cultivo primario de fibroblastos de pollo, por otro lado, no ha sido utilizado para este fin por lo que los rangos máximos y mínimos de células para iniciar el cultivo celular no se conocen con precisión, por lo que aspectos generales en el manejo de este tipo celular para el aislamiento de *C. psittaci* tienen que ser más estudiados.

La línea L-929 en relación a los fibroblastos de pollo tiene la ventaja de ser una línea establecida, por lo que el mantenimiento del cultivo y su manejo es fácil. Además las células

* Ana María Rojas Martínez. Dato no publicado.

se pueden conservar congeladas a -196°C por periodos prolongados de tiempo, siendo sencilla su recuperación.

El cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo, por otra parte, tiene la ventaja de ser bastante económico en relación a una línea celular establecida, su preparación es sencilla, y la propagación del cultivo se facilita debido a la excelente capacidad de división mitótica de este tipo de células embrionarias. Sin embargo, la propagación es limitada ya que no soportan en promedio más de 3 a 5 pases y terminan muriendo; no sobreviven a la congelación. Aunado a esto, es necesario el uso de embriones de pollo SPF, así como de personal con experiencia para la preparación de cultivos primarios y es importante mantener estrictas medidas de esterilidad al trabajar, ya que el riesgo de contaminación es alto.

Se ha postulado que la variabilidad de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados con *C. psittaci*, se debe a las distintas condiciones de trabajo en el laboratorio (3). Es importante señalar que las condiciones de trabajo bajo las cuales se realizó el experimento se encontraban perfectamente establecidas para el uso de los fibroblastos de ratón L-929, y no así, para los fibroblastos de pollo, lo cual pudo influir en su comportamiento. Es necesario seguir trabajando con los fibroblastos de pollo, para lograr conocer con precisión su ritmo de crecimiento, los rangos máximos y mínimos para poder iniciar un cultivo celular de monocapa, así como la fuerza de centrifugación y el tiempo mínimo requerido durante el proceso de infección, de tal forma que no cause daños en las células y altere los resultados. De esta forma podremos determinar verdaderamente si el cultivo de fibroblastos de ratón ofrece ventajas sobre el cultivo primario de fibroblastos de pollo para el aislamiento de *C. psittaci*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo los fibroblastos de ratón representan una mejor opción para el aislamiento de cepas de aborto y de afección entérica en ovinos en comparación al uso del cultivo primario de fibroblastos de pollo.

Por otro lado, a pesar de que ambas cepas de *C. psittaci* se sometieron a un mismo procesamiento, fué muy notoria la diferencia en cuanto al número de inclusiones citoplasmáticas formadas en los fibroblastos de ratón, observándose un mayor número de inclusiones en los monoestratos infectados con la cepa T23. Estudios realizados han determinado, que la sensibilidad de las diferentes líneas celulares en relación al aislamiento de cepas de *C. psittaci* que afectan a aves varia ampliamente(51). Existe la posibilidad, entonces, de que este hecho, se fundamente en la presencia de un mayor número de receptores específicos para la cepa entérica T23 en los fibroblastos de origen murino en comparación con el número de receptores específicos para la cepa de aborto A22. En contraparte, no existe una diferencia notoria en el número de inclusiones citoplasmáticas formadas por ambas cepas de *C. psittaci* en los fibroblastos de origen aviar, por lo que es posible que la presencia de receptores específicos en la membrana celular para cada cepa no muestre diferencias en cuanto a su número y distribución. Por el momento, estos resultados indican que los fibroblastos de origen murino ofrecen una mayor utilidad para el diagnóstico de laboratorio cuando se procesen muestras clínicas para el aislamiento de cepas de *C. psittaci* de afección entérica en ovinos. Es necesario un seguimiento para poder determinar si se puede o no aprovechar la diferencia observada entre A22 y T23 en fibroblastos de origen murino.

A la fecha no existen reportes comparativos en cuanto al uso de diversas líneas celulares para el aislamiento de cepas que afectan a ovinos. A partir del presente trabajo,

toma una gran relevancia el seguir investigando el comportamiento de las cepas de *C. psittaci* en los diferentes tipos celulares con la finalidad de facilitar el aislamiento del microorganismo a partir de ovinos y posiblemente otras especies animales en México.

LITERATURA CITADA

- 1.- Aitken, I.D.: *Enzootic (Chlamydial) abortion in Diseases of the sheep*. Edited by Martin, W.B. 119-123 Blackwell Scientific Publications.
- 2.- Allan, I. and Pearce, J.H.: Aminoacids requirements of strain of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* growing in McCoy cells: Relationship with clinical syndrome and host origin. J. Gen. Microbiol., 129: 2001-2007 (1983).
- 3.- Andersen, A.A. and Tappe, J.P.: Genetic immunological and pathological characterization of avian chlamydial strains. J. Am. Vet. Med. Assoc., 38: 215-222 (1990).
- 4.- Andersen, A.A. in: Iglewski, B. H. and Clark, V. L. : *Molecular basis of bacterial pathogenesis*, vol. X Academic Press, Inc. San Diego, California (1990).
- 5.- Andersen, A. in Gyles, C. L. and Thoen C. O.: *Pathogenesis of bacterial infections in Animals*. 2nd ed. Iowa State University. Press/Ames (1993).
- 6.- Anderson, I. E.: Comparison of the five ovine isolates of *Chlamydia psittaci*; on evaluation of three cell culture treatments. Med. Lab. Sci. 43: 241-248 (1986).
- 7.- Baker, J.A.: A virus obtained from pneumonia of cats and its possible relation to the cause of atypical pneumonia in man. Science, 96: 475-476 (1942).
- 8.- Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J.: *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, (1991).
- 9.- Barron, A. L.: *Microbiology of Chlamydia*. CRC press, Inc. Florida (1988).
- 10.- Buzoni-Gatel, D., Layschi, K., Dubray, G., Rodolakis, A.: Comparison of protein patterns between invasive and noninvasive ovine strain of *Chlamydia psittaci*. Res. Vet. Sci., 46: 40-42 (1989).
- 11.- Buxton, D., Barlow, R. M., Finalyston, J., Anderson, I. E. and Mackellar, A. : Observations on pathogenesis of the *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. J. Comp. Pathol. 102: 221-237 (1990).

- 12.-Caldwell, H. D., Kromhout, J. and Schachter, J.: Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *C. trachomatis*. Infect. Immun. **31**: 1161-1176 (1981).
- 13.- Caldwell, H. D. and Perry, L. J.: Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. Infect. Immun. **38**:745-754 (1982).
- 14.- Dawson, M., Zaghlohu, A., Wilmore, A. J.: Ovine enzootic abortion; experimental studies of immunoresponses. Res. Vet. Sci., **40**: 59-64 (1986).
- 15.- Eissenberg, L. G., Wyrick, P. B., and David, C. H. *et al.* : *Chlamydia psittaci* elementary body envelopes: Ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. Infect. Immun. **40**: 740 (1983).
- 16.- Escalante, O. C.: Comparative Serological Investigation of sheep flock from México for evidence of *C. psittaci* infection. University of Surrey School of Biological Science. Msc Thesis (1991).
- 17.- Fukushi, H. and Hirai, K : Proposal of the *Chlamydia pecorum* sp. nov. for Chlamydia strain derived from ruminants. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**: 306-308 (1992).
- 18.- Gaugler, R. W., Neptune, E. M., Adams, G. M., Sallee, T. L., Weiss, E. and Wilson, N. N.: Lipid synthesis by isolated *Chlamydia psittaci*. J. Bacteriol. **100**:823 (1969).
- 19.- Girjes, A. A., Weigler, B.J., Hugall, A. F., Carrick, F. N. and Lavin, M. F.: Detection of *Chlamydia psittaci* in free ranging Koalas (*Phascolarctus cinereus*). Vet. Microbiol., **21**: 21-30 (1989).
- 20.- Grayston, J. T.: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR pneumonia. Annu. Rev. Med. **43**: 317-323 (1992).
- 21.- Griffiths, P. C., Philips, H. L., Dawson, M. and Clarkson M. J.: Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin. Vet. Microbiol., **30**: 165-177 (1992).

- 22.- Grimes, J. E. and Wyrick, P. B.: Chlamydiosis (ornithosis). In Diseases of poultry 9th Ed. Ed. B. W. Calnek, H. J., Barnes, C. W., Beard, W. M., Reid, and Joder, W. H., Ames Jr. Iowa State University Press (1991).
- 23.- Hackstadt, T.: Identification and properties of chlamydial polypeptides that bind eucaryotic cells surface components. J. Bacteriol. 165: 13-20 (1986).
- 24.- Hewinson, R.G., Griffiths, P. C., Rankin, S. E. S., Dawson, M. and Woodward, M. J.: Towards a differential polymerase chain reaction test for *Chlamydia psittaci*. Vet. Rec., 128: 381-382 (1991).
- 25.- Huang, H. S., Tan, T.W., Buxton, D., Anderson, I. E. and Herring, A. J.: Antibody responses of the ovine lymph node to experimental infection with and ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. Vet. Microbiol., 21: 345-351 (1990).
- 26.- Huang, H. L., Buxton, D. and Anderson, I. E.: The ovine immuneresponse to *Chlamydia psittaci*; histopathology of the lymph node. J. Comp. Pathol. 102:89 - 97 (1990).
- 27.-Jones, G. E. and Anderson, I.E.: *Chlamydia psittaci*: Is tonsillar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion. Res. Vet. Sci. 44: 260-261 (1988).
- 28.- Johnson, F.W.A.: Enteric infections in sheep associated with enzootic abortion. Ir. Vet. N. (1984).
- 29.- Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B. and Wilfert, C.M.: Zinsser Microbiology. Appleton & Lange (1992).
- 30.-Kuo, C., Wang, S. P. and Grayston, J. T.: Effects of polycationes, polyaniones, and neuroaminidase on the infectivity of trachoma inclusion conjuntivitis and lymphogranuloma venereum organism in HeLa cells; sialic residues as possible receptor for trachoma inclusion conjuntivitis. Infect. Immun. 8: 74-79 (1973).
- 31.- Leonard, C., Caldwell, G. L. and Gunn, G. J.: An estimate of prevalence of enzootic abortion of ewes in Scotland. Vet. Rec., 133: 180-183 (1993).

- 32.- Matsuno, H., Fukushi, H., Yamaguchi, T. and Hirai, K.: Antigenic analysis of feline and bovine *Chlamydia psittaci* with monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**: 173-179 (1991).
- 33.- Merkey, B. K., McNulty, M. S. D. and Mackie, D. P.: Comparison of ovine abortion and non abortion isolates of *Chlamydia psittaci* using inclusion morphology, polyacrilamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis and reactivity with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.*, **35**: 141-159 (1993).
- 34.- Mondesire, R. R., Maclean, I. W., Shewen, P. E. and Winston, S.E.: Identification of genus specific epitopes on the outer membrane complexes of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* immunotypes 1 and 2. *Infect. Immun.*, **57**: 2914-2918 (1989).
- 35.- Moulder, J. W., Novosel, D. L. and Tribby, I. C.: Diaminopimelic acid decarboxylase of the genus of meningopneumonitis. *J. Bacteriol.*, **85**: 401 (1963).
- 36.- Moulder, J.W., Grisso, D.L. and Brubaker, R.R.: Enzymes of glucose catabolism in members of the psittacosis group. *J. Bacteriol.*, **89**: 810 (1965).
- 37.- Moulder, J. W.: Inhibition of onset of over multiplication of *C. psittaci* in persistently infected mouse fibroblast (L-cell). *Infect. Immun.*, **39**: 898-907 (1983).
- 38.- Moulder, J.W.: Looking at Chlamydiae without looking at their hosts. *Am. Soc. Microbiol. New.*, **50**: 356-362 (1984).
- 39.- Moulder, J. W., Hatch, T. P., Kuo, C. C., Schachter, J. and Storz, J. Order II Chlamydiales 729 - 739. In Kreig and J. G., Holt (ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *The William & Wilkins CO.*, Baltimore, (1984).
- 40.- Nanda, N.K., Rao, A. T., Nayak, E. C., Rao, A. G. and Mishra, P.R.: Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle. *Int. Vet. J.*, **69**: 483-486 (1992).
- 41.- Nano, F.E. and Caldwell, H. D.: Expression of the chlamydial genus specific lipopolysaccharide epitope in Escherichia coli. *Science*, **228**: 742-744 (1984).

- 42.- Nurminen, M., Leinonen, M., Saikku, P. and Makela, P. H.: The genus specific antigen of *Chlamydia*: resemblance to the lipopolysaccharide of enteric bacteria. Science **220**: 1279-1281 (1983).
- 43.- Pearce, J. H.: Early events in chlamydial infections. Ann. Inst. Microbiol. **137**:325-332 (1986).
- 44.- Pérez, M. J. A. and Storz, J.: Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. Infec. Immun., **50** : 905-910 (1985).
- 45.-Pérez, M. J. A. and Storz, J.: Chlamydial infections of cattle I, II. Mod. Vet. Pract. **66**,517 (1985).
- 46.- Pienar, J.G. and Schutte, A. P.: The occurrence and pathology of chlamydiosis in domestic and laboratory animals. J. Vet. Res., **42** : 77-90 (1975).
- 47.- Schachter, J.: The intracellular life of *Chlamydia*. Curr. Top. Microb. Immunol.; **138**: 109-139 (1988).
- 48.- Soriau, A., Rouzic, E. L., Bernard, F. and Rodolakis, A.: Differentiation of abortion inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test. Vet. Rec., **132**: 217-219 (1993).
- 49.- Stamp, J. T., McEwen, A.D., Watt, A. A. and Nisbet, D. I.: Enzootic abortion in ewes. Transmission of the disease. Vet. Rec., **62**: 251-254 (1950).
- 50.- Steel, D. G. R. , Torrie, H. J.: Bioestadística Principios y Procedimientos. 2ª edición, 1ª en español. McGraw - Hill (1988).
- 51.- Storz, J. and Krauss, H.: *Chlamydia* , Hand book of bacterial infections in animals. Edited by: Blovel, H. and Schliesser, 447-531. Fisher Verlag Jena. Germany (1985).
- 52.- Storz, J.: Overview of animal diseases induced by chlamydial infections. In *Microbiology of Chlamydia* Ed. Barron, A.L. Baco Raton, Florida: CRC press (1988).
- 53.- Tabor, C. W., Tabor, H.: Polyamines. Annu. Rev. Biochem. **53**:749 (1984).
- 54.- Treuhaff, M. W. and Moulder, J. W.: Biosynthesis of the arginine in L cells infected with chlamidia. J. Bacteriol. **96**: 2004 (1968).

- 55.- Vanrompay, D., Ducatelle, R., and Haesenbrouk, F.: Diagnosis in avian Chlamydiosis: Specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cells cultures. J. Vet. Med., 39: 105-112 (1992).
- 56.- Weiss, E., Meyers, W. F. Dressler, H.R. and Chun Hoon, H.: Glucose metabolism by agents of the psittacosis - trachoma group. Virology 22:551 (1964).
- 57.- Worthington, R. W.: Serology as an aid to diagnosis: uses and abuses. N. Z. Vet. J. 30: 93-97. (1982).
- 58.- Wyrick, P.B. and Richmond, S.J.: Biology of Chlamydiae., J. Am. Vet. Med. Assoc., 195 : 507-513 (1989).
- 59.- York, C. J. and Baker, J. A.: A new member of the psittacosis - lymphogranuloma group of viruses that causes infections in the calves. J. Exp. Med. 93: 587 (1951).

TABLAS

**TABLA 1. CONTENIDO DE DIVERSOS COMPONENTES
DE LOS MEDIOS UTILIZADOS.**

COMPONENTE	ISCOVE'S (mg/l)	F12-K (mg/l)	F12 (mg/l)
Hipoxantina	-----	4.083	4.04
Glucosa	4.505	1260.2	1802.
Rojo de Fenol	16	3.318	1.25
Ácido linoleico	-----	-----	0.090
Putresina HCl	-----	0.322	0.161
Ácido pirúvico Na	110.	220.	220.
DL-6, 8 Ácido Thiotico	-----	0.266	0.206
Timidina	-----	0.726	0.700
HEPES	5958.	-----	-----

**TABLA 2. CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE
LOS MEDIOS UTILIZADOS.**

COMPONENTE	ISCOVE'S (mg/l)	F12-K (mg/l)	F12 (mg/l)
L-Alanina	25	42.140	18
L-Arginina HCl	84	17.818	422
L-Asparagina	28.4	30.02	30
L-Ac. Aspartico	30	26.62	26
L-Cisteina	91.24	70.24	70.26
L-Ac. Glutámico	75	29.42	30
L-Glutamina	584	292.2	292
Glicina	30	15.014	16
L-Histidina	42	41.92	42
L-Isoleucina.	105	7.872	7.8
L-Leucina	105	73.04	26.2
L-Lisina	146	26.24	73
L-Metionina	30	8.952	9
L-Fenilalanina	66	69.06	10
L-Prolina	40	9.912	70
L-Serina	42	210.2	21
L-Treonina	95	23.820	23.8
L-Triptofano	16	4.084	4
L-Tirosina	103.79	10.872	15.86
L-Valina	94	23.42	13.4

TABLA 3. CONTENIDO DE VITAMINAS DE LOS MEDIOS UTILIZADOS

COMPONENTE	ISCOVE'S (mg/l)	F12-K (mg/l)	F12 (mg/l)
Biotina	0.013	0.073	0.007
Colina	4	13.96	13.96
Ácido Fólico	4	1.324	1.32
Inositol	7	18.02	18.02
Niacinamida	4	0.036	0.04
Ácido pantoténico	4	0.477	0.238
Piridoxal	4	0.061	0.06
Riboflavina	0.4	0.037	0.04
Tiamina	4	0.337	0.337
Vitamina B-12	0.013	1.355	1.356
Ácido Ascórbico	-----	-----	15

TABLA 4. CONTENIDO DE SALES MINERALES DE LOS MEDIOS UTILIZADOS.

COMPONENTE	ISCOVE'S (mg/l)	F12-K (mg/l)	F12 (mg/l)
Cloruro de Calcio	219	135.24	165
Sulfato de Magnesio	97.67	192.64	25.28
Cloruro de Potasio	330	283.29	305
Nitrato de Potasio	0.076	-----	-----
Cloruro de Sodio.	4405	7597.2	7517
Fosfato de Sodio Monobásico	109	-----	-----
Selenito de Sodio	0.017	-----	-----
Piruvato de Sodio	110	220	220
Sulfato Cuprico	-----	0.002	0.002
Sulfato Ferroso	-----	0.834	0.834
Cloruro de Magnesio	-----	105.716	99.63
Fosfato de Potasio Monobásico	-----	58.523	61.24
Fosfato de Sodio Dibásico	-----	115.02	132.4
Sulfato de Zinc	-----	0.14375	0.863

TABLA 5. Combinaciones realizadas considerando cultivo celular-medio de cultivo-tiempo de incubación para el desarrollo de cuerpos de inclusión de *Chlamydia psittaci* cepas de aborto A22 y entérica T23.

MEDIO DE CULTIVO	PERIODO DE INCUBACIÓN (hrs)			
	FIBROBLASTOS DE RATÓN (L929)		FIBROBLASTOS DE POLLO (CULTIVO PRIMARIO)	
	A22	T23	A22	T23
ISCOVE'S	48	24	48	24
	72	48	72	48
	96	72	96	72
F12K	48	24	48	24
	72	48	72	48
	96	72	96	72
F12	48	24	48	24
	72	48	72	48
	96	72	96	72

No. Réplicas/Combinación = 5

TABLA 6. RESULTADOS DE LA OBSERVACION MICROSCOPICA DE AMBOS TIPOS CELULARES, INFECTADOS CON LA CEPA A22 DESPUES DE REALIZAR LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Fibroblastos de Ratón							Fibroblastos de Pollo								
Me dio	T. de Fij.	Repetición (No. de inclusiones en 300 células visualizadas).					X	Me dio	T. de Fij.	Repetición (No. de inclusiones en 300 células visualizadas).					X
		1	2	3	4	5				1	2	3	4	5	
	48 Hrs	2	0	0	2	2	1.2		48 Hrs	2	2	3	1	0	1.6
ISC	72 Hrs	4	5	8	7	2	5.2	ISC	72 Hrs	3	2	4	1	2	2.4
	96 Hrs	1	1	0	0	0	.4		96 Hrs	2	0	0	3	2	1.4
	48 Hrs	2	1	2	1	1	1.4		48 Hrs	1	2	1	2	0	1.2
F12 -K	72 Hrs	3	6	1	4	5	3.8	F12 -K	72 Hrs	4	3	5	3	5	4
	96 Hrs	4	5	2	1	2	2.8		96 Hrs	4	2	3	3	2	2.8
	48 Hrs	2	2	0	1	0	1		48 Hrs	5	3	1	3	3	3
F12	72 Hrs	11	6	5	11	3	7.2	F12	72 Hrs	6	7	7	7	5	6.4
	96 Hrs	3	1	2	1	0	1.4		96 Hrs	4	3	3	4	4	3.6

ISC = ISCOVE'S
x = Promedio de inclusiones.

TABLA 7. Promedios de inclusiones intracitoplasmáticas de *Chlamydia psittaci* cepas de aborto A22 y entérica T23 a diferentes tiempos de incubación.

MEDIO DE CULTIVO	CEPA A22						CEPA T23					
	FR			FP			FR			FP		
	48hs	72hs	96hs	48hs	72hs	96hs	24hs	48hs	72hs	24hs	48hs	72hs
ISCOVE'S	1.2	5.2	0.4	1.6	2.4	1.4	10.6	5.4	1.2	2	1.2	2.4
F12K	1.4	3.8	2.8	1.2	4	1.8	11.4	4.8	5.2	3.2	2.6	2
F12	1	7.2	1.4	3	6.4	3.6	3	7.4	6.4	5.2	6.6	5.2

FR = Fibroblastos de ratón
 FR = Fibroblastos de pollo

No. Réplicas/Combinación = 5
 No. Células contabilizadas = 300

**ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA**

TABLA 8. RESULTADOS DE LA OBSERVACION MICROSCOPICA DE AMBOS TIPOS CELULARES, INFECTADOS CON LA CEPA T23 DESPUES DE REALIZAR LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Fibroblastos de Ratón							Fibroblastos de Pollo								
Me dio	T. de Fij.	Repeticiones					X	Me dio	T. de Fij.	Repeticiones					X
		(No. de inclusiones en 300 células visualizadas).								(No. de inclusiones en 300 células visualizadas).					
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5		
	24 Hrs	11	10	9	12	11	10.6		24 Hrs	3	2	2	1	2	2
ISC	48 Hrs	11	6	6	7	4	5.4	ISC	48 Hrs	1	2	1	1	1	1.2
	72 Hrs	1	2	1	1	1	1.2		72 Hrs	3	3	1	2	3	2.4
	24 Hrs	14	5	18	14	6	11.4		24 Hrs	1	3	4	3	5	3.2
F12 -K	48 Hrs	5	6	5	5	3	4.8	F12 -K	48 Hrs	3	1	5	2	2	2.6
	72 Hrs	6	10	6	4	0	5.2		72 Hrs	3	2	1	2	2	2
	24 Hrs	3	5	2	3	2	3		24 Hrs	6	7	4	2	7	5.2
F12	48 Hrs	8	6	10	7	6	7.4	F2	48 Hrs	7	7	7	6	6	6.6
	72 Hrs	7	8	5	5	6	6.4		72 Hrs	8	6	3	3	6	5.2

ISC = ISCOVE'S

X = Promedio de inclusiones.

TABLA 9. MEJORES COMBINACIONES OBTENIDAS PARA EL DESARROLLO DE *C. Psittaci* CEPA A22 POR EL METODO DE CUADRADOS MINIMOS DE ACUERDO A LA TRIPLE INTERACCION (Tipo celular - Medio de Cultivo - Tiempo de incubación).

Tipo de fibroblastos.	Medio de cultivo	CEPA A22		
		Tiempo de Incubación (hrs)	Medias mínimo cuadráticas transformadas.	Error estandar
Ratón	F12	72	2.8046	0.1638
Pollo	F12	72	2.7161	0.1638
Pollo	F12-K	72	2.2270	0.1638
Ratón	F12-K	72	2.1491	0.1638
Pollo	F12	96	2.1416	0.1638
Pollo	F12	48	1.9727	0.1638
Pollo	F12-K	96	1.9400	0.1638
Pollo	ISC	72	1.8228	0.1638
Pollo	ISC	48	1.5756	0.1638
Ratón	F12-K	48	1.5413	0.1638
Ratón	F12	96	1.5120	0.1638
Pollo	ISC	96	1.4928	0.1638
Pollo	F12-K	48	1.4585	0.1638
Ratón	F12	48	1.3756	0.1638

Las medias minimocuadráticas de la variable cuerpos de inclusión se encuentran transformadas ($y' = \sqrt{1 + y}$)

Tabla 10. MEJORES COMBINACIONES OBTENIDAS PARA EL DESARROLLO DE *C. Paritaci* CEPA A22 POR EL METODO DE CUADRADOS MINIMOS, CONSIDERANDO LA DOBLE INTERACCION. (Tipo celular-Medio de cultivo).

CEPA A22			
Tipo Celular	Medio de Cultivo	M. M.C. I. T. (*)	Error Est.
Pollo	F12	2.2768	0.0945
Ratón	F12	1.8974	0.0945
Pollo	F12-K	1.8751	0.0945
Ratón	F12-K	1.8677	0.0945
Ratón	ISC	1.6847	0.0945
Pollo	ISC	1.6304	0.0954

(*) Las medias minimocuadráticas de la variable cuerpos de inclusión se encuentran transformadas ($yt = \sqrt{x + y}$)

TABLA 11. MEJORES COMBINACIONES OBTENIDAS PARA EL DESARROLLO DE *C. psittaci* CEPA T23 POR EL METODO DE CUADRADOS MINIMOS DE ACUERDO A LA TRIPLE INTERACCION (Tipo celular - Medio de Cultivo - Tiempo de Incubación).

CEPA T23				
Tipo de fibroblastos	Medio de cultivo	Tiempos de incubación (hrs)	Medias minimocuadráticas transformadas	Error estandar
Ratón	F12-K	24	3.7501	0.1653
Ratón	ISC	24	3.4025	0.1653
Ratón	F12	48	2.8873	0.1653
Pollo	F12	48	2.7553	0.1653
Ratón	F12	72	2.7111	0.1653
Ratón	ISC	48	2.5184	0.1653
Pollo	F12	48	2.4541	0.1653
Pollo	F12	72	2.4583	0.1653
Ratón	F12-K	48	2.3988	0.1653
Ratón	F12-K	72	2.3688	0.1653
Pollo	F12-K	24	2.0199	0.1623
Ratón	F12	24	1.9827	0.1653
Pollo	F12-K	48	1.8655	0.1653
Pollo	ISC	72	1.8292	0.1653
Pollo	ISC	24	1.7220	0.1653

Las medias minimocuadráticas de la variable cuerpos de inclusión se encuentran transformada ($y' = \sqrt{y}$)

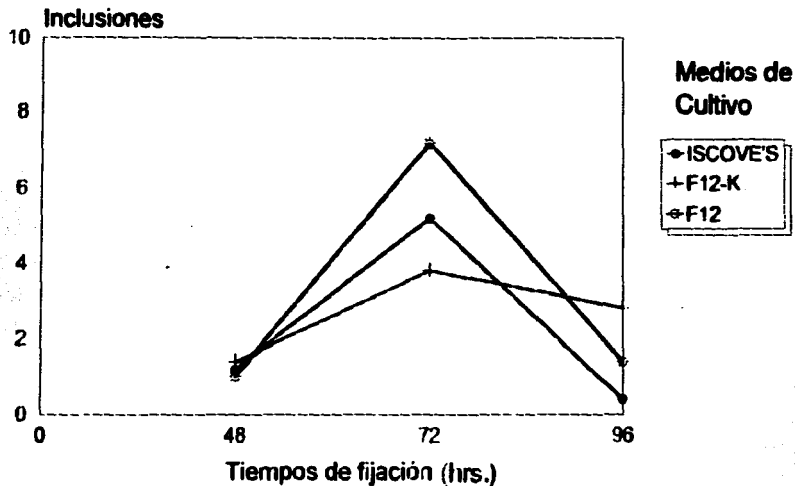
Tabla 12. MEJORES COMBINACIONES OBTENIDAS PARA EL DESARROLLO DE *C. psittaci* CEPA T23 POR EL METODO DE CUADRADOS MINIMOS CONSIDERANDO LA DOBLE INTERACCION (Tipo celular-Medio de cultivo).

CEPA T23			
Tipo Celular	Medio de Cultivo	M.M.C.I.T (*)	Error Est.
Ratón	F12-K	2.8392	0.0945
Pollo	F12-K	1.8691	0.0945
Pollo	F12	2.5559	0.0945
Ratón	F12	2.5270	0.0945
Ratón	ISC	2.4662	0.0945
Pollo	ISC	1.6763	0.0945

(*) Las medias minimocuadráticas de la variable cuerpos de inclusión se encuentran transformadas ($y_t = \sqrt{y + 1}$)

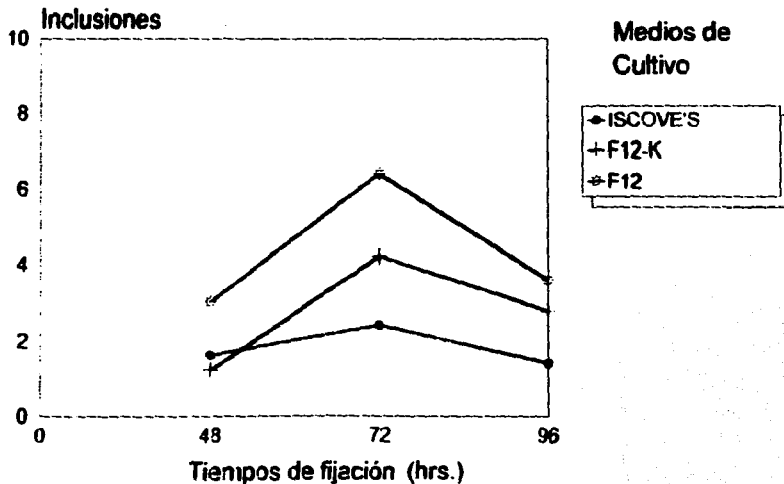
GRAFICAS

GRAFICA 1
PROMEDIOS* DE INCLUSIONES CITOPLASMATICAS OBTENIDOS DE LAS
OBSERVACIONES REALIZADAS CON LA TECNICA DE (IF) PARA LA CEPA A 22 DE
C. psittaci EN FIBROBLASTOS DE RATON.



(*) Promedios de inclusiones en 300 células visualizadas.

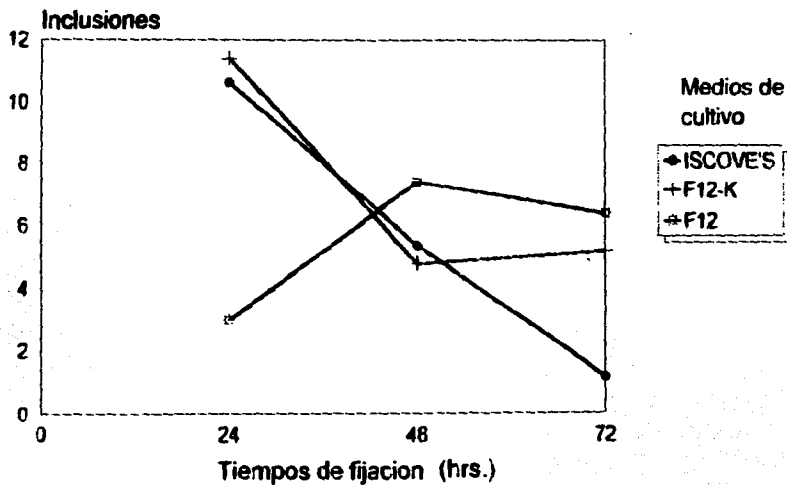
GRAFICA 2
PROMEDIOS* DE INCLUSIONES CITOPLASMATICAS OBTENIDOS DE LAS
OBSERVACIONES REALIZADAS CON LA TECNICA DE (IFD) PARA LA CEPA A22 DE
C. psittaci EN FIBROBLASTOS DE POLLO.



(*) Promedios de inclusiones en 300 células visualizadas.

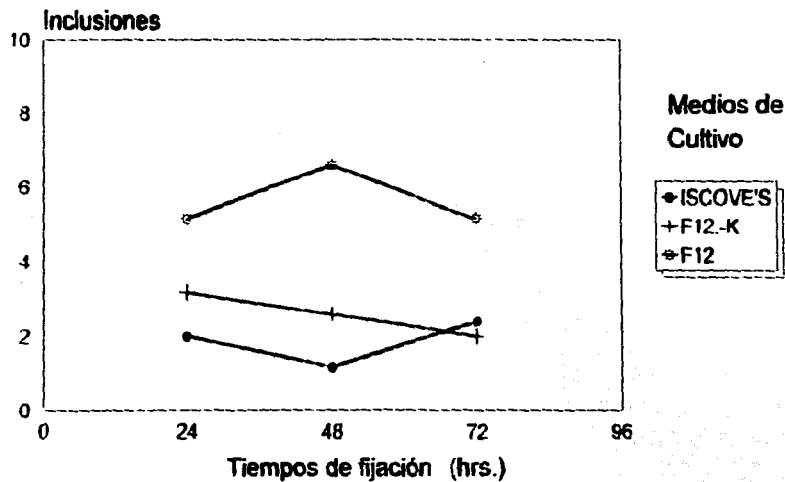
GRAFICA 3

PROMEDIOS* DE INCLUSIONES CITOPASMATICAS OBTENIDOS DE LAS OBSERVACIONES REALIZADAS CON LA TECNICA DE (IF) PARA LA CEPA T23 DE C. psittaci EN FIBROBLASTOS DE RATON.



(*): Promedio de inclusiones en 300 células visualizadas.

GRAFICA 4
PROMEDIOS* DE INCLUSIONES CITOPLASMATICAS OBTENIDOS DE LAS
OBSERVACIONES REALIZADAS CON LA TECNICA DE (IFD) PARA LA CEPA T 23 DE
C. psittaci EN FIBROBLASTOS DE POLLO.



(*) Promedios de inclusiones en 300 células visualizadas.