

CHLAMYDIA Y CHLAMYDOPHILA

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS
EN EL
LABORATORIO**

OSCAR ROBERTO LINZITTO

**Con la Colaboración de
NESTOR OSCAR STANCHI**

Autores

**MARÍA DEL LUJÁN TUNES
EMILIA BAUTISTA
JUDITH BERSTEIN
JUAN ANGEL BASUALDO
MARCELO RODRÍGUEZ FERMEPÍN
MARÍA FERNANDAGOMEZ**

CHLAMYDIA Y CHLAMYDOPHILA

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS
EN EL
LABORATORIO**

OSCAR ROBERTO LINZITTO

Con la Colaboración de
NESTOR OSCAR STANCHI

Autores

**MARÍA DEL LUJÁN TUNES
EMILIA BAUTISTA
JUDITH BERSTEIN
JUAN ANGEL BASUALDO
MARCELO RODRÍGUEZ FERMEPÍN
MARÍA FERNANDAGOMEZ**

Linzitto, Oscar Roberto

Chlamydia y Chlamydothyla : métodos diagnósticos en el laboratorio / Oscar Roberto Linzitto ; Néstor Oscar Stanchi ; contribuciones de Maria del Luján Tunes ... [et al.]. - 1a edición especial. - La Plata : Néstor Oscar Stanchi, 2016.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-42-1728-8

1. Microbiología Veterinaria. 2. Infectología. I. Tunes, Maria del Luján, colab. II. Título.

CDD 636.089

IMPRESO EN ARGENTINA

PRINTED IN ARGENTINA

Hecho el depósito que marca la ley 11.723

Todos los derechos reservados. Este libro o cualquiera de sus partes no podrá ser reproducido, copiado, ni archivado en sistemas recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por ningún medio, ya sean mecánicos o electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el permiso previo de los Editores.

Derechos Reservados ©2016

Esta edición digital se terminó en el mes de agosto de 2016.

Los editores no se hacen solidarios con los conceptos vertidos en este libro. Los nombres comerciales y marcas registradas así como sus dosis indicativas mencionadas en esta obra, no significan de ninguna manera recomendación por parte de los autores ni de los editores, sino que son sólo ejemplos para una mejor descripción de la información. Asimismo las prescripciones de drogas y dosificaciones de los fármacos han sido aconsejadas por la bibliografía científica pero no necesariamente cuentan con la autorización oficial para su uso terapéutico con que se indican en las distintas partes de la obra.

Oscar Roberto Linzitto

Cátedra de Microbiología Especial
Carrera de Microbiología Clínica e Industrial
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

María Del Luján Tunes

Cátedras de Microbiología General y Microbiología Especial
Facultad de Ciencias Veterinarias y Microbiológicas
Universidad Nacional de La Plata

Emilia Bautista

Cátedra de Microbiología General
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Judith Berstein

Cátedra de Microbiología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata

Juan Angel Basualdo

Cátedra de Microbiología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata

Marcelo Rodríguez Fermepín

Cátedra de Análisis Clínicos I
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional de Buenos Aires

María Fernanda Gómez

Cátedra de Microbiología General
Facultad de Ciencias Veterinarias y Microbiológicas
Universidad Nacional de La Plata

Con la colaboración de:

Nestor Oscar Stanchi

Cátedra de Microbiología General
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
Universidad Católica de Cuyo



GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN

Chlamydia y ***Chlamydophila*** son bacterias que poseen un ciclo de vida como parásitos intracelulares obligados en células eucariotas, lo que las convierte en parásitos energéticos. Desarrollan un ciclo de vida donde intercalan una forma infectante (corpúsculo elemental infeccioso) y cuerpo reticular (forma reproductiva metabólica). Es notoria la homología de sus genes ribosómicos y, aunque existen varias especies clamidiales con diferentes especies de animales susceptibles, se evidencia su evolución por adaptación a distintos nichos ecológicos.

Los miembros del orden ***Chlamydiales*** tienen una identidad de secuencia del 80% para el gen que codifica el ARNr 16S ribosomal (ácido ribonucleico ribosómico) y / o superior a 80% de identidad para el gen que codifica el ARNr 23S, según lo establecido por Everett., en 1999. Se encuentran dentro de las células de los vertebrados e invertebrados como las amebas, mientras que estructuras semejantes han sido descritas en otras especies de invertebrados como artrópodos, celenterados y moluscos.

A partir de 1999 se reclasifica el orden ***Chlamydiales*** incorporando nuevas familias entre ellas ***Chlamydiaceae*** que incluye los géneros ***Chlamydia*** y ***Chlamydophila***. El género ***Chlamydia*** incorpora tres especies y ***Chlamydophila*** seis especies:

Phylum BXVI - ***Chlamydiae***

Clase I – ***Chlamydiae***

Orden I – ***Chlamydiales***

Familia I – ***Chlamydiaceae***

Género I – ***Chlamydia***

Especies: ***Chlamydia trachomatis***

Chlamydia muridarum

Chlamydia suis

Género II – ***Chlamydophila***

Especies: ***Chlamydophila psittaci***

Chlamydophila abortus

Chlamydophila caviae

Chlamydophila felis

Chlamydophila pecorum

Chlamydophila pneumoniae

Familia II – ***Parachlamydiaceae***

Género I – ***Parachlamydia***

Especie: ***Parachlamydia acanthamoebae***

Género II – ***Neochlamydia***

Especie: ***Neochlamydia hartmannellae***

Especies ***Protochlamydia amoebophila***

Protochlamydia naegleriophila

Familia III – ***Simkaniaceae***

Género I – ***Simkania***

Especie ***Simkania negevensis***

Especies: ***Fritschea bemisiae***

Fritschea eriococci

Familia IV – ***Criblamydeae***

Especie ***Criblamydia sequanensis***

Familia V – ***Rhabdochlamydeae***

Especies ***Rhabdochlamydia porcellionis***

Rhabdochlamydia crassificans

Familia VI – ***Waddliaceae***

Género I – ***Waddlia***

Especies ***Waddlia chondrophila***

Waddlia malaysiensis

Familia VII – ***Piscichlamydeae***

Género I – ***Piscichlamydia***

Especie: ***Piscichlamydia salmonis***

Esta nueva clasificación ha permitido la ubicación de nuevos géneros y especies de importancia clínica en humanos y animales. Actualmente el conocimiento de cada una de ellas se ha profundizado mediante la aplicación de técnicas moleculares asociadas a metodologías clásicas. Este trabajo en conjunto ha permitido una mejor detección y diagnóstico, al incrementar los conocimientos sobre la epidemiología y la clínica de los procesos infecciosos, ayudando a prevenir y controlar su diseminación.

1) Orden ***Chlamydiales***

Las técnicas de PCR implementadas específicamente para el orden ***Chlamydiales*** han puesto en evidencia un notable incremento en la cantidad de especies que lo integran, de forma tal que algunos autores consideran que la clasificación en tres familias es incapaz para contener las nuevas secuencias genéticas que originan más de cien géneros y especies, todos ellos obtenidos a partir de diferentes orígenes.

a) Familia I - ***Chlamydiaceae***

Posee dos géneros: ***Chlamydia*** y ***Chlamydophila***. Todas las especies que la integran son Gram negativas y poseen el LPS específico de familia, anteriormente conocido como epitope específico de género. Su envoltura de complejo proteico disulfuro mantiene el equilibrio osmótico extracelular y este entrelazado se reduce químicamente cuando se produce la infección de las células hospedadoras, lo cual permite la transformación clamidial de cuerpo elemental (EBS) a cuerpo reticular (RBS). La microscopía de luz visible permite la observación de inclusiones brillantes que presentan un parpadeo de intensidad y duración variables, lo que sugiere un movimiento browniano clamidial.

Por otra parte, ambos géneros se diferencian por: contener distintas proteínas y secuencias genéticas, por la producción de glucógeno detectable, desarrollo de un solo cuerpo de inclusión y posesión de un operón ribosomal (***Chlamydia***), y por presencia de varios cuerpos de inclusión, ausencia de glucógeno, presencia de un plásmido extracromosómico que hace variar su morfología, y por la resistencia a la sulfadiazina (***Chlamydophila***).

b) Familia II - ***Parachlamydiaceae***

Esta familia presenta muchas similitudes con la familia ***Chlamydiaceae***, de la cual se separara oportunamente. Como diferencias presenta una morfología distinta (forma de media luna) y un tiempo de incubación más prolongado, pudiendo liberarse a partir del hospedador (p.ej: amebas) por lisis de las mismas o encapsuladas en vesículas.

La familia ***Parachlamydiaceae*** se encuentra integrada por dos géneros: ***Parachlamydia*** y ***Neochlamydia***.

Género I - ***Parachlamydia***

Este género involucra una sola especie, ***Parachlamydia acanthamoebae***, que fuera aislada de trofozoítos de ***Acanthamoeba***; presenta la particularidad de ser Gram variable y desarrollar en células Vero a temperatura moderada (mayor a 25 °C).

Género II – ***Neochlamydia***

La especie integrante del género es ***Neochlamydia hartmanellae***, endosimbionte de amebas vermiformes de vida libre (***Hartmanella***), aislada a partir de muestras obtenidas de conductos de agua, es capaz de desarrollar en cultivos axénicos, impedir la formación de quistes en las amebas hospedadoras y provocar su posterior lisis; multiplican en otras cepas de ***Hartmanella*** y pueden desarrollarse especies de ***Discoideum dictyostelium***, en donde no altera la producción de cuerpos de fructificación y en donde no constituyen vacuolas. Forma cuerpos elementales y reticulados, tienen morfología cocoide de 0,4 a 0,6 µm de diámetro y por serología con PCR se ha involucrado a ***Neochlamydia hartmanellae*** con casos de queratoconjuntivitis felina, asociada o no a la clásica ***Chlamydophila felis***. Este microorganismo también ha sido relacionado con ***Epitheliocystis*** y la enfermedad inflamatoria de los peces.

Actualmente existen otras especies denominadas ***Protochlamydia*** que están nominadas a constituir un nuevo género dentro de las ***Parachlamydiaceae***, y se agrupan bajo la denominación ‘***Candidatus Protochlamydia***’:

a) ***Protochlamydia amoebophila***: Es un microorganismo que se diferencia del anterior por su capacidad de replicación en ***Acanthamoeba*** y en ***Dictyostelium discoideum***, además de originar poca cantidad de bacterias contenidas en inclusiones de pequeño tamaño. Son cocos Gram negativos que originan cuerpos elementales y cuerpos reticulados, no son cultivables en medios sin células y son parásitos obligados intracelulares de ***Acanthamoeba*** spp, en cuyo citoplasma se visualizan como pequeñas mórulas.

b) ***Protochlamydia naegleriophila***, denominada así por ser endosimbionte de la ameba ***Naegleria***, en la cual es capaz de inhibir la formación de quistes, es incapaz de desarrollar en medios sin células (axénicos o carentes de organismos vivos) y presenta un ciclo de evolución similar a la anterior. Se la asocia con patologías respiratorias humanas.

b) Familia III - ***Simkaniaceae***

Este nombre deriva del nombre de una investigadora, Simona Kahane, y por diferentes pruebas serológicas y genéticas se ha establecido que sus integrantes tienen amplia difusión entre las personas, pese a que su hospedador natural es desconocido. La especie tipo continúa siendo ***Simkania negevensis*** (descubierta como contaminante en cultivos celulares) y los nuevos integrantes del género deben poseer una similitud del 95% con la especie tipo. Es capaz de desarrollar en quistes de ***Acanthamoeba*** sus organismos relacionados han sido detectados en muestras provenientes de estaciones depuradoras y/o tratamiento de aguas residuales, es decir que ***Simkania*** puede aislarse cómodamente a partir de muestras ambientales.

En comparación con otros agentes clamidiales, ***Simkania negevensis*** desarrolla lentamente en cultivos celulares (entre 12 y 14 días), con crecimiento inaparente hasta la semana de la infección y aparición explosiva de cuerpos reticulados (RBS) en la segunda etapa del crecimiento. Además presenta algunas secuencias inusuales de nucleótidos en su ARN ribosómico

(intrón) que sugiere relación evolutiva con cloroplastos de ciertas algas y mitocondrias amebianas. Por último, su resistencia a penicilina y bacitracina es total.

Esta bacteria ha sido aislada principalmente de cuadros respiratorios (neumonía comunitaria en adultos, bronquiolitis infantil, lavados nasofaríngeos, etc.) y serológicamente se ha detectado reducida actividad cruzada entre los anticuerpos para estas cepas y otros integrantes del orden **Chlamydiales**. Es necesario recordar que el método más utilizado en estos diagnósticos es el serológico, en lugar del aislamiento y/o pruebas de ADN y es importante mencionar que los anticuerpos han sido detectados en diversos y lejanos puntos del planeta, lo que indica una amplísima distribución del agente en todo el mundo. Por la detección de las secuencias de nucleótidos en fuentes de agua dulce se supone que los hospedadores naturales de **Simkania** pueden ser las amebas, aunque por PCR se ha detectado una secuencia de nucleótidos de **Simkania** en muestras de aneurisma aórtico, lo que remarca la necesidad de incluir métodos de detección directa en el diagnóstico.

d) Familia **Waddliaceae**

Esta familia tiene entre un 80 y 90% de similitud en sus genes ribosomales a los de **Chlamydiaceae**, por lo cual está incluido en el orden **Chlamydiales**. Hay un sólo género, **Waddlia**, quien en su desarrollo en medios tisulares a partir de cornetes bovinos (BT) origina inclusiones que contienen elementos cocoides cuyo tamaño oscila entre 0,2 y 0,5 µm. La capacidad infectiva es neutralizada por tetraciclina pero resiste a penicilina y gentamicina; se multiplica por fisión binaria (forma normalmente asociada a mitocondrias) y su desarrollo puede presentarse como forma densa (infecciosa) o reticular (fisión binaria). La serología con antisueros tipificantes clamidiales y rickettsiales es negativa.

La especie tipo de la familia es **Waddlia chondrophila**, que fuera aislada de tejido hepático de un feto bovino abortado y también de cáncer pulmonar. Este microorganismo se multiplica por replicación en el interior de vacuolas intracitoplasmáticas, presentando un ciclo evolutivo similar al de las **Chlamydias** y **Ehrlichia** no inhibido por la penicilina.

Existe una segunda especie, **Waddlia malayensis**, que fue aislada de materia fecal de murciélagos de fruta malayos, mientras que otro de características semejantes fue aislado del corazón fetal de un bovino abortado.

Es probable que los integrantes del género **Waddlia** se relacionen con abortos humanos ya que filotipos de dichos agentes han sido identificados mediante técnicas de PCR en muestras humanas.

La detección de **Waddlia** por cultivo exige la utilización de medios tisulares como los de células de cornetes bovinos, células de búfalo y mono verde, células McCoy y fibroblastos humanos, etc., a 35-37 °C en medio mínimo esencial de Eagle (entre otros). Algunos investigadores sostienen que este microorganismo puede ser propagado en cultivos séricos libres de células (medio LP Nephros) y como antibióticos pueden aplicarse penicilina, gentamicina (sulfato), estreptomina, vancomicina y anfotericina B. Tras 28 a 36 h de incubación, pueden observarse gran-

des vacuolas repletas de partículas en las células infectadas. Dichas inclusiones pueden teñirse con las clásicas técnicas de Giménez o Giemsa, o bien con los otros métodos aplicados a **Chlamydias** en general.

Debido a que **Waddlia chondrophila** puede multiplicarse en hospedadores no convencionales como las amebas de vida libre, por medio de microscopía electrónica han podido observarse trofozoítos amebianos infectados con **Waddlia**, en etapas similares a las del ciclo clamidial cuerpos elementales y cuerpos reticulados incluidos, por lo cual se sospecha que las amebas de vida libre pueden ser el reservorio ambiental del agente.

CLAMIDIAS PATÓGENAS

Como puede suponerse considerando la clasificación presentada, surgen distintas características para cada especie, las cuales pueden agruparse por su patogenicidad hacia al hombre o los animales.

PATÓGENAS HUMANAS	PATÓGENAS ANIMALES
<p><i>Chlamydophila pneumoniae</i> (causal de enfermedades respiratorias)</p> <p><i>Chlamydia trachomatis</i> (causal de enfermedades de transmisión sexual)</p> <p><i>Simkania negevensis</i></p>	<p><i>Chlamydophila caviae</i></p> <p><i>Chlamydia muridarum</i></p> <p><i>Chlamydophila pecorum</i></p> <p><i>Chlamydia suis</i></p> <p><i>Waddlia chondrophila</i></p>

PATÓGENAS PARA HOMBRE Y ANIMALES	
<p>De animales primarios transmisibles al hombre (zoonosis)</p> <p><i>Chlamydophila psittaci</i></p> <p><i>Chlamydophila pneumoniae</i></p> <p><i>Chlamydophila abortus</i></p> <p><i>Chlamydophila felis</i></p>	<p>De parásitos de vida libre (amebas) transmisibles al hombre y animales</p> <p><i>Parachlamydia acanthamoebae</i></p> <p><i>Neochlamydia hartmannellae</i></p>

GÉNERO *CHLAMYDIA*

Los microorganismos procariotas del género ***Chlamydia*** se encuentran agrupados en tres especies que afectan a mamíferos con diversa especificidad: hombre, roedores y cerdos.

Chlamydia trachomatis es la de mayor importancia dentro del género y es la especie conocida más antiguamente. Afecta al hombre y al cerdo.

Chlamydia muridarum está relacionada a patologías del tracto respiratorio inferior (o posterior) de ratones y hamsters.

Chlamydia suis se halla asociada con enteritis, neumonía y conjuntivitis porcina.

GÉNERO *CHLAMYDOPHILA*

El género ***Chlamydophila*** comprende especies con menor especificidad de huéspedes que incluyen anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Dichas especies son: ***Chlamydophila psittaci***, ***Chlamydophila abortus***, ***Chlamydophila caviae***, ***Chlamydophila felis***, ***Chlamydophila pecorum*** y ***Chlamydophila pneumoniae***.

Los aislamientos ahora designados como ***C. pecorum*** son distintos de ***C. psittaci***. Por biotipificación (Spears-Storz 1979) e inmunotipificación (Perez-Martinez, J.A. and Storz, J., 1985) se distingue ***C. pecorum*** de los organismos causantes de aborto en los rumiantes que han sido reclasificados como ***C. abortus***.

Entre las cepas de ***C. pecorum***, el biotipo 2 / inmunotipo 2 se asocia con poliartritis, conjuntivitis y encefalomiелitis en el ganado vacuno y ovino; el biotipo 3 / inmunotipo 3 causa infección intestinal en el ganado vacuno; el biotipo 4 / inmunotipo 4, causa poliartritis en los cerdos; el biotipo 4/ inmunotipo 6, la neumonía o el aborto en cerdos; el inmunotipo 9 produce infección intestinal en el ganado ovino. Las cepas de la ex biotipo 1 / inmunotipo 1 provocan el aborto en el ganado ovino y bovino y actualmente son designados como ***Chlamydophila abortus***; el biotipo 7 /inmunotipo 7 son las cepas causantes de la conjuntivitis, rinitis y neumonía en los gatos y actualmente se clasifican como ***Chlamydophila felis***.

Potencial zoonótico clamidial

El hombre es el único mamífero que puede ser infectado por todas las especies (*Chlamydophila* y *Chlamydia*). Los primeros registros de afecciones oculares por ***C. trachomatis*** datan de unos 1500 años A.C.; la epidemiología de la infección óculo-genital humana fué investigada por Halberstaed y Von-Prowazek en 1907, en donde el agente infeccioso fué denominado genéricamente ***Chlamydia***. Por su parte, los antecedentes de afecciones por ***C.pneumoniae*** son más recientes.

La infección por ***C. psittaci*** en mamíferos fue observada como aborto en ovejas por Hedley en 1837, y en psitácidos por Ritter en 1897, aunque el término psitacosis fuera usado primeramente por Morange en el año 1895. Por todo lo mencionado y ante la variada gama de especies animales sensibles a ***Chlamydia***, no puede dejarse de lado la consideración del potencial zoonótico del agente cuando se inicia el cuadro infeccioso.

CHLAMYDOPHILA PSITTACI

Es responsable de clamidiosis endémica aviar, brotes epizooticos en mamíferos y psitacosis respiratoria humana. Ha sido aislada por cultivo o detectada por serología en una gran variedad de especies aviarias, de las cuales el 25% pertenece al orden de las **Psittácidas**. Este dato no descarta a otras especies como portadoras y diseminadoras del agente, pues también las gaviotas, las palomas y otras aves pertenecientes a variados órdenes pueden transmitir **Chlamydophila psittaci**, tal como lo indica la tasa de seroprevalencia en los criadores de palomas en comparación a controles. También se ha detectado que en Europa los patos padecen endémicamente infección a **Chlamydophila psittaci**, mientras que los pavos sufren endémicamente esta infección.

Es importante señalar que la infección a **Chlamydophila psittaci** es indistinguible de cualquier otra infección sistémica bacteriana, pues solamente el diagnóstico de laboratorio puede establecer la presencia del agente causal. Éste es un patógeno oportunista y de distribución cosmopolita, que luego del contacto con el paciente puede originar infección aguda, subaguda o asintomática, pudiendo mantenerse en estado de latencia después de la infección primaria y presentar etapas de reactivación y excreción bacteriana. También debe recordarse que en este caso, como en cualquier tipo de infección, la evolución del cuadro depende del agente (virulencia de la cepa actuante), del huésped (susceptibilidad individual) y del ambiente (incidencia de diversos factores externos sobre el paciente para favorecer el desarrollo de la enfermedad).

El diagnóstico de clamidiosis aviar se puede realizar por detección directa del agente a nivel de tejidos, aislamiento en cultivos celulares, PCR, inmunoensayos, y la profilaxis en los criaderos de aves es tan importante como el correcto manejo de las aves en su transporte, mantenimiento y tratamiento. Las cepas de **C. psittaci** son similares en virulencia, crecimiento en cultivos celulares y los genes 16S rRNA genes difieren solo en <0,8%. Se conocen 8 serovares. Todas pueden transmitirse al humano.

C. psittaci serovar A es endémica en aves psittácidas y causa casos esporádicos de enfermedad zoonótica en humanos, otros mamíferos y tortugas. La serovar B es endémica en palomas y pavos y también ha sido identificado como la causa del aborto en un rodeo lechero. Las serovariedades C y D son causa de riesgos profesionales para los trabajadores de mataderos y para las personas en contacto con las aves. Los aislamientos de la serovar E (conocido como Cal-10, PM o MN) se han obtenido de una variedad de aves y a pesar de que estaban asociados con el brote de 1920 en el ser humano, no se halló un reservorio específico para este serotipo. Los serovares M56 y WC fueron aislados durante brotes en mamíferos. Muchas cepas de **C. psittaci** son susceptibles a bacteriófagos.

Chlamydophila psittaci es el agente causal de la zoonosis denominada ornitosis o psitacosis, infección sistémica que ocasiona neumonitis atípica, transmitida por más de 130 especies de aves. En el hombre, los casos de enfermedad se producen en forma esporádica o en brotes.

En poblaciones aviares evaluadas se ha comunicado una prevalencia de 5 al 8 % de portadores de **C. psittaci**; este porcentaje puede elevarse al 100 % cuando las aves son sometidas a estrés, ocasionado por transporte, hacinamiento, etc. Las aves infectadas pueden permanecer asintomáticas o presentar signos tales como escalofríos, anorexia, emaciación, disnea, diarrea, ojos cerrados y plumaje

encrespado. Durante el período de enfermedad es cuando excretan el mayor número de microorganismos; las secreciones del pido y ojos, las heces y la orina son sumamente infectantes. La infección se transmite por vía respiratoria, por contacto directo o por aerosolización de secreciones o polvo. Las cepas aisladas en pavos y psitácidos son las más virulentas para el hombre. La transmisión entre humanos y la nosocomial es muy infrecuente.

Composición antigénica

C. psittaci tiene 8 serovariedades, de acuerdo a las variantes de las MOMP, denominadas de la A a la F, WC y M56 y sus genotipos correspondientes, los cuales fueron definidos basados en la secuencia de dominios variables del gen *ompA*. Los genotipos aislados hasta la fecha comprenden el A-F, E/B, M56 and WC, cada uno relacionado con sus distintas serovariedades. Cada serovariedad/genotipo se asocia con determinados hospedadores animal y todas son capaces de ser transmitidas al hombre y provocar enfermedad grave e incluso muerte. En trabajos recientes se ha postulado que existen variantes genéticas de **C. psittaci** que modulan su virulencia, alterando de esa manera la respuesta inmune del hospedador.

Patogenia

Como se ha mencionado, el organismo existe en 2 estados; el extracelular, llamado Cuerpo Elemental (CE), elevadamente infeccioso y metabólicamente inactivo y el intracelular, de mayor tamaño, replicativo y metabólicamente activo llamado Cuerpo Reticulado (CR). Luego del contacto con la célula eucariota (típicamente una célula del epitelio respiratorio), el CE penetra en dicha célula por endocitosis; permaneciendo dentro de la inclusión y evadiendo así la respuesta inmune del hospedador. A continuación, la clamidia se diferencia en un CR que comenzará su replicación mediante fisión binaria, utilizando el ATP de la célula parasitada. Posteriormente, los CR se reorganizan en CE y son liberados de la célula en un ciclo biológico que se desarrolla en 48 horas.

La afección de diferentes órganos es reflejo de la naturaleza sistémica de la psitacosis. En el hombre, el principal órgano afectado es el pulmón, donde ocasiona una neumonitis que puede llevar a la insuficiencia respiratoria aguda; la tráquea y los bronquios se inflaman originando un taponamiento mucoso difuso. Se acumula un exudado alvéolo intersticial compuesto por leucocitos polimorfonucleares, eritrocitos, células epiteliales y fibrina, con hiperplasia, proliferación y descamación de las células de revestimiento alveolar. La diseminación de *C. psittaci* a ganglios, hígado, médula ósea y el bazo promueve la inflamación de estos órganos. También puede producirse pericarditis, meningoencefalitis, glomerulonefritis aguda y necrosis tubular aguda. Otra de las complicaciones de la psitacosis que ha sido reportada es la coagulación intravascular diseminada. El tejido placentario infectado presenta intervallositis con inclusiones citoplasmáticas trofoblásticas.

Clamidiosis humana

El hombre puede contactar con *Chlamyophila psittacide* diversas maneras:

- por medio de aerosoles desde el plumaje o heces desecadas.
- durante la evisceración en las necropsias y/o muestreo de tejidos altamente infecciosos.
- mediante el contacto con vísceras, esqueletos y plumas contaminadas con heces y/o excreciones.

Cuando esto sucede, la incubación de la enfermedad varía entre una y dos semanas. Los síntomas pueden aparecer bruscamente. Pueden presentarse fiebre y escalofríos, dolor de garganta, faringitis, jaquecas severas, anorexia y fotofobia, observándose en casos graves náuseas, vómitos y diarrea.

Síntomas de intensidad variable, rales, cianosis y picos de delirio. Con el compromiso respiratorio aparecen zonas de consolidación pulmonar uni o bilaterales, cuya extensión solamente puede apreciarse por medio de estudios radiológicos que permiten observar infiltración pulmonar y consolidación que puede cubrir con "parches" uno o ambos pulmones; además pueden producirse molestias miocárdicas detectables por medio de electrocardiogramas.

En estudios post-mortem se han detectado zonas pulmonares consolidadas (cuyas células contienen cuerpos elementales), puntos de congestión y necrosis hepática focalizada, esplenomegalia, degeneración parenquimatosa renal, miocarditis y esporádicamente congestión y edema.

La transmisión hombre-hombre se realiza por medio del esputo, persistiendo el riesgo por un período que alcanza los ocho (8) años, plazo máximo determinado para el hombre como portador.

Las infecciones y/o enfermedades causadas por ***Chlamydophila psittaci*** contraídas a partir de aves no psitácidas se denominan ornitosis, pero su diferencia con psitacosis es artificial. Aunque las cepas clamidiales procedentes de psitácidos usualmente son más virulentas para los humanos, pueden originarse graves procesos mediante el contacto con palomas u otras aves enfermas o portadoras.

Clamidiosis animal

Hablar de ***Chlamydophila psittaci*** equivale a relacionar inmediatamente la enfermedad con las aves psitácidas, sin pensar que otras 150 especies de aves y otros animales también son susceptibles a este agente y, por ende, son diseminadoras (y potenciales fuentes zoonóticas) de la enfermedad.

En las aves la clamidiosis puede producirse naturalmente pues mantiene un curso latente hasta la explosión de la enfermedad; en este punto afecta patos, gansos, gallinas y pavos, con recidivas debidas a medidas de control no estrictas.

Las palomas pueden contaminarse a cualquier edad y diseminar ***Chlamydophila psittaci*** con las heces; esto, sumado al stress, favorece su transmisión; también se han aislado ***Chlamydophilas*** a partir de huevos (tanto embrionados como no embrionados) de gansos, patos y gaviotas.

Muchas especies de aves no revelan síntomas al ser expuestas al contacto con ***Chlamydophila psittaci***, lo que permite deducir que la enfermedad se manifiesta solamente bajo stress o por la gran virulencia de la cepa.

En psitácidos y en otras aves de jaula, pavos y gallinas, la enfermedad origina diarrea, anorexia, letargo, conjuntivitis y menor producción de huevos, mientras que en patos se produce una descarga serosay/o seropurulenta a nivel nasal-ocular; la morbilidad puede ser superior al 80% y la mortalidad va del 5 al 30%.

En estos casos, ***Chlamydophila psittaci*** se puede aislar a partir de bursa, oviducto, bazo, intestino y heces, y las cepas pueden ser resistentes o sensibles a ciertos medicamentos como Tetraciclina y Eritromicina.

Las cepas altamente virulentas de ***Chlamydophila psittaci*** se transmiten por excrementos infecciosos a partir de portadores sanos hacia hospedadores susceptibles, en quienes provocan graves infecciones sistémicas.

Las cepas menos virulentas establecen un estado de mayor equilibrio en huéspedes aviarios asintomáticos, pero cuando se superponen infecciones virales, fúngicas o bacterianas en el hospedador asintomático pueden producirse explosiones de elevada mortalidad.

Chlamydophilapsittaci puede causar daño vascular con exudados serofibrinosos torácicos y abdominales, inflamación y respuestas proliferativas aguda (con producción de membranas purulentas que cubren los órganos afectados) o crónica (en donde órganos como bazo, hígado o riñones se observan agrandados y faltos de color).

Aspectos clínicos

La psitacosis puede cursar como un proceso con escasa signo-sintomatología hasta una enfermedad mortal, con insuficiencia respiratoria aguda grave. Característicamente se presenta como una neumonía atípica con tos no productiva, cefalea intensa, fiebre, faringitis y hepatoesplenomegalia. La radiografía de tórax puede evidenciar anomalías en el 90 % de los casos. Las complicaciones incluyen: hepatitis, alteraciones neurológicas (meningitis, encefalitis, mielitis transversa, parálisis facial), placentitis, coagulación intravascular diseminada, tromboflebitis, artritis reactiva, eritema nodoso.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico se basa en la serología; se considera caso confirmado cuando existe enfermedad clínica compatible con un título de Ig M anti *C. psittaci* igual o superior a 1:16 en una prueba de MIF o el aumento de cuatro veces el título de Ig G anti *C. psittaci* en dos muestras diferentes de Ig G obtenidas con un intervalo de dos semanas. También puede realizarse PCR en tiempo real para diferenciar *C. psittaci* de otras clamidias, aunque no se encuentra disponible para su uso de rutina. El cultivo de esputo, BAL, sangre o líquido cefalorraquídeo es difícil y se realiza solo en centros de referencia.

Los diferentes genotipos de *C. psittaci* (A-F, E/B, M56 y WC) pueden ser identificados mediante el análisis por PCR o microchips de ADN; una de las ventajas de estas técnicas moleculares es que pueden distinguir entre los genotipos *ompA* E/B, E y B, lo cual no puede realizarse utilizando anticuerpos específicos monoclonales, debido a que el genotipo E/B da reacción cruzada con las serovariedades B y E.

Potencial zoonótico asociado con clamidiosis aviaria

El hombre puede ser afectado por severas y fatales enfermedades originadas a partir del contacto con palomas y otras especies avícolas. Estas infecciones y enfermedades causadas por *Chlamydophila psittaci* pueden contraerse de las formas ya descritas a partir de psitácidos y no psitácidos, pero las cepas de *Chlamydia* provenientes de psitácidos generalmente son más virulentas para el hombre que las cepas obtenidas a partir de otras aves.

CHLAMYDIA TRACHOMATIS

C. trachomatis produce infecciones genitales, perinatales y oculares; las complicaciones de estas infecciones incluyen la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), la infertilidad, el embarazo ectópico, la neumonía infantil y la ceguera. La prevalencia de infección por clamidia estimada en la población general es del 1 al 12 % y aumenta al 35 % en aquellos grupos de riesgo como los trabajadores sexuales. La Organización Mundial de la Salud considera que se producen anualmente 90 millones de casos de infecciones por **C. trachomatis** en el mundo. Las guías actuales de manejo de infecciones de transmisión sexual recomiendan el estudio rutinario de infecciones por **C. trachomatis** en las personas jóvenes sexualmente activas.

Composición antigénica

C. trachomatis presenta 18 serovariedades, de las cuales las serovariedades L1, L2, L2a y L3 se asocian a Linfogramuloma Venéreo (LGV) y proctocolitis en homosexuales. De las 14 serovariedades restantes relacionadas con enfermedad óculo-genital, las cepas A, B, Ba y C producen tracoma ocular, y las comprendidas entre la D y la K conforman el complejo Conjuntivitis de inclusión - Enfermedades genitourinarias - Neumonía.

Patogenia e inmunidad

Las células epiteliales endocervicales y del tracto genital superior, las de la conjuntiva, uretra y recto son las principales células blanco de la biovariedad tracoma de **C. trachomatis**. En el hombre pueden infectarse el epidídimo y la próstata mientras que en los lactantes suelen infectarse las células del epitelio columnar de las vías respiratorias. La biovariedad LGV de **C. trachomatis** penetra a través de una solución de continuidad en la barrera cutánea o infecta a las células epiteliales de la mucosa genital o rectal, desde donde es transportada por la circulación linfática a los ganglios regionales, multiplicándose en los fagocitos mononucleares. También puede ocurrir diseminación sanguínea a distancia. La lesión histopatológica característica es la formación de un granuloma, con desarrollo de pequeños abscesos necróticos. La respuesta inicial a la infección está medida por leucocitos polimorfonucleares (PMN); luego el tejido se infiltra con linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos. En la enfermedad ocular o genital producida por la biovariedad tracoma, luego de remitir la inflamación aguda comienzan a formarse folículos linfoides, con pérdida del epitelio que los cubre y proliferación epitelial que da lugar a la formación de papilas e hipertrofia papilar. Finalmente se produce remisión de la infección con producción de fibrosis y formación de cicatrices. La infección recurrente produce una respuesta inflamatoria más intensa, con formación de cicatrices y lesiones tisulares; se requieren múltiples episodios de reinfección o infección persistente para que se desarrolle el tracoma ocular, donde buena parte de la inflamación y de las lesiones en los tejidos se deben a la respuesta inmune de huésped al microorganismo.

La infección natural por **C. trachomatis** confiere protección reducida y de escasa duración ante la reinfección. En ensayos de vacunación contra el tracoma se produce inmunidad específica contra la serovariedad implicada en la infección la cual se mantiene durante 1 o 2 años.

Aspectos clínicos

Las infecciones producidas por **C. trachomatis** pueden dividirse en cuatro categorías clínicas:

1. tracoma ocular;
2. linfogranuloma venéreo;
3. enfermedades óculo-genitales
4. infecciones perinatales.

El tracoma ocular se manifiesta como una conjuntivitis folicular crónica con hipertrofia papilar e infiltración inflamatoria. A medida que la enfermedad progresa se produce cicatrización de la conjuntiva y la córnea. Las cicatrices afectan la superficie interior de los párpados; las pestañas se curvan hacia adentro generando abrasión de la córnea, que lleva a la ulceración, cicatrización y la posterior pérdida de la visión.

El LGV es una infección de transmisión sexual endémico en África, Sudeste Asiático, India, Sudamérica y el Caribe. Inicialmente se forma una lesión primaria ulcerada indolora en la mucosa genital o piel adyacente que remite sin dejar cicatriz. Algunas semanas después de la aparición de esta lesión primaria, se desarrolla una adenitis unilateral en el sitio donde drenan los linfáticos del área afectada por dicha lesión primaria, con extensa periadenitis, formándose una masa inflamatoria con abscesos en su interior, que posteriormente se fusionan para originar un bubón, el cual puede drenar espontáneamente originando fístulas. Este proceso puede estar acompañado de manifestaciones sistémicas como fiebre, cefalea, mialgias y eventualmente compromiso del sistema nervioso central (SNC) como meningitis. Finalmente la arquitectura ganglionar es reemplazada por fibrosis e involución gradual.

La enfermedad óculo-genital en adultos incluye la conjuntivitis de inclusión, que se manifiesta como una conjuntivitis folicular aguda unilateral que evoluciona con formación de folículos linfoides que comprometen la córnea y finalmente cicatrices similares a las de un tracoma leve. Más de la mitad de los adultos que padecen conjuntivitis de inclusión presentan infección genital concurrente documentada por **C. trachomatis**. La infección genital puede presentarse como uretritis, epididimitis, prostatitis, proctitis, cervicitis, endometritis y Enfermedad Inflamatoria Pelviana (EIP); estos cuadros pueden estar asociados a artritis reactiva. La EIP puede ser silente u originar una enfermedad grave con perihepatitis y ascitis asociadas. La inflamación crónica tubárica, con formación de cicatrices y adherencias, llevan a la oclusión de las trompas de Falopio, siendo las consecuencias a largo plazo la infertilidad, el embarazo ectópico y el síndrome de dolor pélvico crónico.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico sindrómico resulta inespecífico, por lo que es necesario realizar la confirmación por métodos de laboratorio para establecer el diagnóstico definitivo. Existen numerosas técnicas que se han utilizado para el diagnóstico, entre las que se incluyen el examen citológico para la detección de inclusiones citoplasmáticas, el aislamiento de **C. trachomatis** en cultivo celular, la detección de antígeno de clamidia por inmunofluorescencia directa y la detección de ácido nucleico con técnicas de amplificación, siendo esta última la técnica diagnóstica recomendada actualmente en las Guías de

Control, Tratamiento y Prevención de Enfermedades de Transmisión Sexual, elaborada por los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos.

- **Diagnóstico citológico** -En la conjuntivitis de inclusión del lactante y en el tracoma ocular, las inclusiones intracitoplasmáticas típicas pueden identificarse en las células obtenidas del raspado conjuntival teñidas con Giemsa. Esta técnica presenta escasa sensibilidad en los casos leves de la enfermedad. La citología también se emplea para analizar los raspados endocervicales, pero presenta escasa especificidad y sensibilidad.
- **Aislamiento en cultivo celular** -*C. trachomatis* puede cultivarse en una gran variedad de líneas celulares; habitualmente se utilizan Mc Coy o HeLa. El tiempo de incubación en células oscila entre las 40 y las 72 horas; las inclusiones intracitoplasmáticas pueden detectarse con tinción de Giemsa, Giménez, Macchiavello, o por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, siendo esta última la de mayor especificidad y sensibilidad. La cantidad de clamidias infecciosas en una muestra se expresa en unidades formadoras de inclusión (UFI). La preservación correcta de las muestras clínicas antes de la inoculación del cultivo celular es esencial para obtener la recuperación de microorganismos. Las muestras deben mantenerse a 4 °C y ser inoculadas dentro de las 24 horas posteriores al momento de su obtención; si se procesarán posteriormente, deben almacenarse a -70 °C, pero esto origina una pérdida de microorganismos y por lo tanto en muestras con un número bajo de UFI pueden obtenerse falsos resultados negativos. El aislamiento en cultivo celular tiene una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 70 al 80 % en las mejores condiciones. Las mayores tasas de aislamiento se registran en el tracoma ocular activo y en la conjuntivitis de inclusión y son menores en la enfermedad ocular crónica o leve. En las muestras endocervicales se recupera una mayor cantidad de microorganismos que en muestras obtenidas por raspado uretral. El número de microorganismos suele ser más elevado en las infecciones sintomáticas. En el LGV la muestra puede obtenerse del pus del bubón; *C. trachomatis* también se ha aislado de muestras obtenidas por lavado bronquio alveolar (BAL), biopsia pulmonar, nasofaringe, recto, endometrio, trompas de Falopio, epidídimo y semen.
- **Detección de antígeno e hibridación de ácido nucleico** -Se encuentran disponibles varias pruebas para la detección de clamidias: 1) detección de antígeno por inmunofluorescencia directa (IFD), 2) detección de antígeno por enzimoimmunoensayo (ELISA) y 3) detección de ARN ribosómico clamidial por hibridación con sonda de ADN. Estas pruebas tienen una sensibilidad superior al 70 % y una especificidad del 98 %; requieren procedimientos invasivos para obtener la muestra (hisopado cervical, uretral) y no pueden emplearse orina y otros fluidos biológicos. Pueden dar falsos resultados positivos, por lo cual un resultado positivo debe ser interpretado con precaución, requiriéndose la verificación posterior mediante una segunda prueba diferente de identificación de antígeno clamidial o por cultivo. La técnica de IFD permite evaluar además la calidad de la muestra obtenida por la observación de células epiteliales y debe ser realizada por personal experimentado; existen pruebas que emplean anticuerpos contra las MOMP, que son propias de cada especie, mientras que las que emplean anticuerpos anti LPS pueden dar reacción cruzada con otras bacterias.

- **Pruebas de amplificación-** Actualmente se dispone de pruebas basadas en la amplificación de ADN o ARN clamidial, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o reacción en cadena de la ligasa (LCR). Estas pruebas poseen mayor sensibilidad que los cultivos y la misma especificidad que ellos, por lo que constituyen actualmente el método diagnóstico de elección. Además pueden utilizarse para detectar ***C. trachomatis*** en orina y otros fluidos biológicos.
- **Serología** -Las pruebas serológicas tienen una utilidad limitada en el diagnóstico de las infecciones oculogenitales por clamidias. La de mayor utilidad es la microinmunofluorescencia (MIF), que emplea como antígeno los CE de cada uno de las serovariedades y detecta los anticuerpos desarrollados contra los componentes de la pared celular clamidial. Un título de IgM igual o mayor a 1:32 por MIF es diagnóstico de infección aguda.

CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE

Es la especie más recientemente identificada de las tres clamidias patógenas para el hombre; causa infecciones respiratorias agudas como bronquitis y neumonía atípica. Es capaz de afectar a un amplio espectro de hospedadores y replicarse en numerosas estirpes celulares. Actualmente la asociación entre ***C. pneumoniae*** y enfermedad cardiovascular aterosclerótica es motivo de numerosos estudios de investigación. Los estudios de seroprevalencia realizados en la población adulta de Estados Unidos indican una exposición a este microorganismo en mayor al 50 %. Afecta a caballos y koalas.

Patogenia e inmunidad

C. pneumoniae presenta un CE con forma característica de pera, rodeado por un espacio periplásmico, que lo diferencia del CE de ***C. trachomatis***. Presenta solamente una serovariedad y puede persistir en los tejidos durante períodos prolongados luego de la infección primaria; en estos estados de persistencia el ciclo vital del microorganismo puede verse interrumpido, aunque los genes necesarios para la replicación del ADN cromosómico continúan expresándose, lo que indica actividad metabólica bacteriana. En los humanos, las células blanco respiratorias incluyen las células epiteliales y los macrófagos alveolares; ***C. pneumoniae*** puede diseminarse desde el pulmón a otros tejidos, como las células endoteliales y de músculo liso. Tanto la aterosclerosis, el asma, la enfermedad de Alzheimer, u otras enfermedades crónicas, pueden estar relacionadas con las formas persistentes crónicas del microorganismo en los tejidos.

La respuesta humoral que se produce luego de la infección primaria es relativamente pobre, consistente en anticuerpos Ig M, que se detectan entre la segunda y tercera semana posteriores a la exposición, por lo que los niveles detectables por las pruebas serológicas no se producen en las primeras fases de la enfermedad. ***C. pneumoniae*** no induce inmunidad protectora y la reinfección es frecuente. Tras la exposición al microorganismo también se producen Ig G e Ig A anti ***C. pneumoniae*** entre

la sexta y octava semana post infección, cuyos niveles permanecen detectables durante meses o años.

La interacción entre el microorganismo y la célula huésped induce la apoptosis celular, por mecanismos aún no bien conocidos. Olivares-Zavaleta y cols. comunicaron recientemente que *C. pneumoniae* puede inducir inmunosupresión local de células T mediante apoptosis y una respuesta inflamatoria; dichos mecanismos serían la causa de la persistencia y la inflamación generada por la infección clamidial.

Aspectos clínicos

La infección por *C. pneumoniae* puede ser asintomática o ser causa de insuficiencia respiratoria aguda por neumonía atípica o bronquitis adquiridas en la comunidad o en el ámbito hospitalario. También puede producir infección de las vías respiratorias altas dando cuadros de faringitis y otitis. La infección cursa con un período de incubación prolongado y los síntomas respiratorios aparecen gradualmente. La tos y el decaimiento pueden persistir durante varias semanas o meses luego del tratamiento antibiótico adecuado. *C. pneumoniae* también puede ser causa de endocarditis, encefalitis, meningoencefalitis, radiculitis lumbosacra y eritema nodoso.

Varias enfermedades crónicas se han relacionado con la infección por *C. pneumoniae*, entre ellas, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

***Chlamydophila pneumoniae* y aterosclerosis**

La relación entre *C. pneumoniae* y aterosclerosis fue planteada inicialmente en 1988, en función de un estudio finlandés de seroprevalencia realizado en varones; posteriormente se identificó al microorganismo en un ateroma coronario, a partir de lo cual se iniciaron numerosas investigaciones sobre el posible efecto de la infección crónica y persistencia de este microorganismo en la aterosclerosis, dado que las clamidias pueden inducir una respuesta inflamatoria que inicia o exacerba dicho proceso patológico.

C. pneumoniae se ha detectado en muestras de placas de ateroma obtenidas de arteria carótida, coronaria y otros tejidos cardiovasculares, mediante microscopía electrónica, PCR e inmunohistoquímica. La infección crónica por *C. pneumoniae* demostrada por el hallazgo de Ig A específica ha sido considerada un factor de riesgo significativo de accidente isquémico vascular. Aún así, tales evidencias no permiten establecer todavía una relación causal entre la presencia del organismo en el tejido y la enfermedad.

Diagnóstico de laboratorio

La detección un título de Ig M anti *C. pneumoniae* igual o mayor a 1:16 por MIF, o Ig G anti *C. pneumoniae*, en dos muestras de suero obtenidas con un intervalo de tres semanas y la observación de un aumento de cuatro veces en el título de dichos anticuerpos en la segunda muestra, debe interpretarse como infección aguda.

También están disponibles las pruebas de inmunofluorescencia de inclusiones clamidiales en equipos comercializados que pueden realizarse en muestras de secreción respiratoria, BAL, etc.

La determinación de Ig A sérica anti **C. pneumoniae** puede ser utilizada para el diagnóstico de infección por **C. pneumoniae** en infecciones crónicas; se ha postulado que resulta un indicador fiable de estímulo antigénico persistente, debido a que dicha Ig presenta una vida media de 7 días.

La PCR es utilizada para la identificación de clamidia en sangre, muestras respiratorias (BAL, secreción nasofaríngea, líquido pleural) y otros fluidos y tejidos corporales.

CHLAMYDOPHILA ABORTUS

Es el agente causal de aborto enzoótico ovino (AEO), como así también de nacimientos de animales muertos o de peso menor al correspondiente. Fue descrita por primera vez en Escocia en 1936, es responsable de grandes pérdidas económicas en los países dedicados a la cría de ganado ovino y en el Reino Unido es responsable del 60% de abortos ovinos, los cuales se producen por discontinuidad circulatoria y necrosis placentaria. En estos casos, es muy útil el empleo de Inmunofluorescencia indirecta (IFD) para el diagnóstico, por detección de corpúsculos elementales clamidiales.

Las ovejas pueden contraer la infección a través de tejidos y fluidos, considerando que **Chlamydophila abortus** presenta gran resistencia ambiental. Tras el contagio, los órganos reproductores ovinos quedan colonizados de manera crónica, especialmente a nivel endometrial. La bacteria se encuentra protegida de la acción inmunológica gracias a su ubicación intracelular, y se sospecha que la infección puede ser transmitida por el servicio.

Es productora de zoonosis, ya que se han detectado casos de mujeres embarazadas que han contactado con animales enfermos y evolucionaron con un 80% de pérdida fetal. Este agente también pone en riesgo la vida humana, pues entre las mujeres embarazadas contagiadas también hubo casos letales.

En el humano se presenta con un curso bifásico de 6 semanas de duración. Clínicamente semeja un síndrome febril de tipo influenza con fiebre, cefaleas, mialgias, artralgias, fatiga y dolor abdominal. Luego de un período de aparente curación, el cuadro se reagudiza. Los hallazgos de laboratorio son: trombocitopenia, neumonía intersticial, falla hepática y a veces, coagulación intravascular diseminada.

Clamidiosis humana

La infección por **C. abortus** en el hombre es una infección sistémica en la cual hay diseminación de la bacteria a varios órganos incluyendo la placenta produciendo abortos o nacimientos prematuros. Se presenta de forma difásica como un síndrome febril semejante a la influenza. Se aprecian dolores musculares, fatiga, artralgias, cefaleas y dolor abdominal. Luego de una recuperación hay un recrudecimiento que obliga a hospitalizar al paciente. Se observa trombocitopenia en el 100% de los casos, neumonía intersticial (85%), falla hepática (78%) y puede desarrollarse coagulación intravascular diseminada.

Clamidiosis animal

En varios países se ha demostrado la incidencia de ***Chlamydophila*** en abortos bovinos mediante el empleo de estudios serológicos y citológicos realizados en rebaños lecheros; simultáneamente se responsabiliza a las ***Chlamydophilas*** de originar bronconeumonía y mastitis bovina.

Potencial zoonótico asociado con clamidiosis bovina

En veterinarios de ciertas zonas ganaderas con bovinos que presentaban síntomas de encefalomielitis, ha sido demostrado un aumento de títulos de anticuerpos clamidiales. Además, este agente también fué aislado a partir de sangre de un paciente después de una infección accidental en laboratorio. En Francia existen informes de casos humanos asociados con ganado afectado con bronconeumonía de origen clamidial.

CHLAMYDOPHILA CAVIAE

Esta bacteria fue aislada originalmente en 1964 por Murray a partir de raspados conjuntivales de cobayos; posteriormente fue estudiada como microorganismo asociado a la conjuntivitis de inclusión (Gordon, 1966 y Kazdan, 1967); luego fue clasificada como ***Chlamydia psittaci*** y como inmunotipo 8 (Pérez-Martínez y Storz, 1985), y actualmente se encuentra reclasificada como ***Chlamydophila caviae*** (Everett, 1999).

Esta ***Chlamydophila*** es responsable de afecciones conjuntivales en animales jóvenes (de 4 a 8 semanas), provocando cuadros que van desde una enfermedad casi asintomática a conjuntivitis grave acompañada de abundante secreción purulenta que llega a adherir los párpados comprometidos por el cuadro. En casos experimentales, tras la instilación de las gotas se produce una conjuntivitis de moderada a severa con secreción mucopurulenta acuosa que puede derivar en cuadros de queratitis con pannus o micropannus, a partir de cuyos raspados conjuntivales se ha detectado ***Chlamydophila caviae***.

Los cuadros queratoconjuntivales se definen entre 3 y 4 semanas por autolimitación. Este microorganismo también es responsable de infecciones genitales en cobayos, los que llegan a producir inmunidad protectora contra reinfecciones por este microorganismo. Si los animales de experimentación son inoculados intraperitonealmente, se desarrolla un cuadro febril pasajero de unas 48 h con recuperación espontánea, pero si los cobayos son inoculados intracerebralmente con elevadas dosis de ***Chlamydophila caviae*** muertas, dichos cobayos mueren dentro de las 20 h siguientes. Cuando se produce una infección natural en cobayos, llega a desencadenarse una elevada mortalidad entre los neonatos y cobayos jóvenes, a partir de los cuales el agente causal puede ser aislado a partir de SNC y otros órganos de los enfermos. Serológicamente, no se han detectado anticuerpos anti ***Chlamydophila caviae*** por medio de fijación de complemento en casos de conjuntivitis natural ni en los animales de experimentación inoculados.

Por su parte, otros investigadores han aislado esta bacteria de tres pacientes humanos afectados con cervicitis y con uretritis (cepas OK133, OK135 y OKM2 respectivamente). Estas cepas fueron compa-

radas por PCR y denominadas ***Chlamydophila caviae***-like ***Chlamydia***. Un dato interesante es que se requiere de la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células para conseguir la resolución de la infección genital.

CHLAMYDOPHILA FELIS

Chlamydophila felis: es responsable de enfermedad del tracto respiratorio anterior felino (en donde produce neumonitis), rinitis y conjuntivitis, con muy elevada seroprevalencia. Este microorganismo parece tener una menor virulencia que las ***Chlamydophilas psittaci*** y ***abortus*** hacia el hombre, dato que se desprende de la poca incidencia de infecciones en humanos a partir de la exposición a felinos afectados, pero es factible suponer que el hombre hace infecciones inaparentes o con diagnóstico erróneo a partir de esta clamidófila, ya que las tasas de anticuerpos para ***Chlamydophila felis*** en profesionales dedicados a la clínica de animales pequeños es significativamente alta.

Clamidiosis animal

En criaderos felinos de Estados Unidos y del Reino Unido se ha demostrado que las ***Chlamydophila felis*** son responsables de conjuntivitis. Se han detectado típicos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos al realizar siembras en cultivos tisulares a partir de muestras conjuntivales.

La enfermedad es esporádica: provoca edema bilateral y conjuntivitis purulenta que puede acompañarse de rinitis con rinorrea ligera asociada a estornudos, tos y pirexia leve; a veces ocasiona cuadros de queratoconjuntivitis. La infección ocular crónica puede persistir durante un (1) año o más.

En los felinos, el período de incubación varía entre tres (3) y diez (10) días; su curso es a menudo crónico y origina una inmunidad débil y pasajera que convierte al paciente en portador durante varios meses.

Las gatas asintomáticas recuperadas totalmente pueden infectar a sus hijos recién nacidos con la llamada Forma Neonatal, pues se ha detectado contaminación por ***Chlamydophila felis*** a nivel genital felino. Las hembras también pueden padecer alteraciones reproductivas y sufrir abortos por causa de ***Chlamyophila***.

Potencial zoonótico asociado con clamidiosis felina

Se han detectado casos de conjuntivitis humana con aislamiento de ***Chlamyophila Felis*** a partir de afecciones oculares en felinos domésticos, cuyo cuadro ha afectado al humano predilecto del gato enfermo.

CHLAMYDOPHILA PECORUM

Algunas cepas de ***Chlamydia***, previamente designadas como ***Chlamydia pecorum*** (Fukushi y Hirai, 1992), se han reclasificado como ***Chlamydophila pecorum*** (Everett et al., 1999). Esta especie se asocia con infecciones en mamíferos, incluyendo el ganado ovino y caprino (Fukushi y Hirai, 1992); koalas (Girjes et al., 1993) y porcinos (Kaltenboeck y Storz, 1992; Anderson et al., 1996).

Patogénicamente diversas, las cepas de **C. pecorum** están asociadas conneumonía, poliartritis, conjuntivitis,aborto, encefalomiелitis, enteritis y diarrea (Kaltenboeck et al., 1993). Pueden también causar metritis, salpingitis e infertilidad en el ganado.En los koalas, la infección por **C. pecorum** causa enfermedadgenitourinaria.

Clamidiosisanimal

Chlamydophila abortus(anteriormente clasificada como **Chlamydia psittaci** var. **ovis**) es una de las principales causales de abortos ovinos con pérdidas mayores al30%; la enfermedad es más severa en sistemas intensivos de crianza por su rápida diseminación entre el rebaño.

Al producirse el aborto, la placenta se observa engrosada y limitada por algunos cotiledones necrosados y hemorrágicos con la región intercotiledónica del corion espesada o edematizada y gelatinosa. Si el aborto ocurre en las últimas cuatro semanas de gestación, los fetos son bien formados, sin patologías pero poco viables; la oveja puede desarrollar infecciones secundarias y morir, aunque generalmente se restablece. Los corderos sobrevivientes y las ovejas que no han sido afectadas pueden presentar posteriormente cuadros de conjuntivitis y poliartritis.

La forma natural de transmisión es desconocida, pero se supone que la oveja infectada disemina **Chlamydophila** durante el parto y el resto del rebaño se infectaría en forma latente, recrudesciendo la enfermedad en la siguiente época de partos. Debido a la contaminación de pasturas no se puede descartar la infección por vía oral, ya que **Chlamydophila** puede sobrevivir de uno (1) a tres (3) meses en las heces.

También existe una forma de diseminación fecal que puede producir infección venérea durante el servicio.

En ovinos y caprinos, **Chlamydophila pecorum** produce desde una infección asintomática hasta cuadros de infección intestinal, sinovial (poliartritis), o infección cerebral (encefalomiелitis) pero no se ha demostrado su potencial zoonótico.

Potencial zoonótico asociado con clamidiosis ovina

Las **Chlamydophilas** de origen no aviario se consideraban reducidas en su potencial zoonótico, pero conviene evaluar nuevamente este concepto si se tiene en cuenta que, en tiempos de abortos, el número de organismos infecciosos contenidos en una membrana puede ser superior a 10^{12} (10^9 gs).

Existen pocos informes sobre contagios de enfermedad en laboratorio, pero desde que el agente clamidial ovino se recuperó a partir de muestras clínicas, ha aumentado la cantidad de enfermedades asociadas como meningitis, conjuntivitis, neumonía y abortos en mujeres embarazadas.

CLAMIDIAS AMBIENTALES

Existe la posibilidad que dentro del grupo de clamidias ambientales muchas estén involucradas en la formación de un medio ambiente propicio para producir diversas patologías humanas. En la mayor parte de los casos, dichos microorganismos han sido aislados de distintas amebas, y si bien existen coincidencias genéticas entre ellos también existen marcadas diferencias pues, p.ej., su tamaño puede ser muy variable (de la clásica medida de 0,4 a 0,6 μ al máximo de 1,0 a 1,2 μ de diámetro).

Por medio de PCR se han identificado integrantes del orden **Chlamydiales** en muestras de lodos activados de plantas de depuración de aguas residuales, con la detección de varios linajes bacterianos adicionales aún en estudio. Esto sugiere que la presencia de estos microorganismos en las plantas de tratamiento las implica como perfectos reservorios de clamidias ambientales con el lógico peligro sanitario para la comunidad.

También hay que considerar que muchas de las secuencias clamidiales detectadas son de diferentes orígenes: humanos (genes de frotis cervicales y muestras de humor acuoso), animales (muestras tisulares de pollos, peces, felinos, porcinos y reptiles de diversas clases), y se han encontrado hasta en agua destilada, aguas subterráneas y sedimentos marinos.

Existe otro microorganismo denominado **Criblamydia sequanensis**, considerado como perteneciente a una familia separada de **Chlamydiaceae** hasta su agrupación taxonómica final, pero similar a ésta. Desarrolla en amebas, en donde se multiplica con un ciclo similar al de clamidias con cuerpos reticulados y elementales estrellados (símil **Rhabdochlamydia**), y ante estas diferencias se sugiere la denominación antedicha en vías de aceptación.

El ciclo de desarrollo de las clamidias ambientales ha sido estudiado por microscopía electrónica de barrido y de transmisión de luz, y el ciclo evolutivo varía para las distintas familias bacterianas.

- 1) **Parachlamydia** - las técnicas empleadas permitieron comprobar que en el ciclo de infección amebiana aparecen elementos cocoides o con forma de media luna rodeados por una gruesa pared y con un centro granular denso, similares a cuerpos elementales clamidiales. La lisis amebiana (que no siempre se produce) deriva en la liberación de innumerables cuerpos infecciosos de forma cooide. Tiene la particularidad de inhibir la formación de quistes amebianos.

Con respecto al llamado 'cuerpo de media luna' hay que señalar que se trata de una morfología particular que se presenta fuera de las amebas hospedadoras y se sugiere que la misma es la forma infecciosa de **Parachlamydia acanthamoebae**, tal como los cuerpos elementales lo son para **Chlamydia** spp., aunque en algún momento se relacionó esta morfología con el llamado 'estrés osmótico que se origina durante el proceso de fijación para microscopía electrónica.

- 2) **Neochlamydia** - presenta un ciclo evolutivo muy parecido al de **Parachlamydia acanthamoebae**, con presencia de cuerpos reticulares y cuerpos elementales capaces de contaminar las amebas hospedadoras, pero a diferencia de éstas, las neochlamidias carecen de membrana en su ciclo intracelular, además de lisar las células hospedadoras entre 3 y 5 días después de la infección. Como en el caso anterior, **Neochlamydia** inhibe el desarrollo de quistes amebianos.

- 3) A diferencia de las anteriores, el resto de las clamidias ambientales parece no ejercer ningún tipo de inhibición sobre el enquistamiento de las amebas hospedadoras, lo que sugiere la existencia de transmisiones horizontal y vertical.
- 4) ***Simkania negevensis***-presenta la particularidad de ser infecciosa en las dos etapas, es decir, tanto como cuerpo elemental como cuerpo reticulado, mientras que en otras clamidias solamente el cuerpo elemental es infeccioso durante la transmisión intercelular.

Poder patógeno de las clamidias ambientales

Aunque no lo parezca, es necesario investigar el rol que tienen las clamidias ambientales en distintas patologías que afectan tanto al hombre como a los animales.

Neumonía: los estudios realizados en pacientes afectados de neumonía comunitaria de origen no determinado, aplicando pruebas de inmunofluorescencia indirecta con empleo de cuerpos elementales de 'cocos Hall' (una ***Parachlamydia*** casi idéntica a ***P. acanthamoebae***) como antígeno, establecen que es prudente considerar al 'coco Hall' como patógena para el hombre. También se ha establecido el carácter patógeno de ***Parachlamydia acanthamoebae*** en cuadros respiratorios humanos (aunque con baja frecuencia), con el agravante que esta clamidia puede sobrevivir a la fagocitosis por macrófagos alveolares humanos. Algunos autores han responsabilizado a ***Simkania negevensis*** por cuadros de bronquilitis aguda infantil, de neumonía en adultos y por exacerbación de enfermedad obstructiva crónica

Dificultad respiratoria y rash eritematoso, además de descamación labial y digital

Otras patologías: también se ha relacionado a especies de ***Parachlamydia*** con enfermedades humanas de origen indefinido y variada sintomatología (fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, dolor de pecho, tos no productiva, dolor de garganta,

Aborto: en bovinos, ***Parachlamydia*** spp. (en especial ***Parachlamydia acanthamoebae***), ***Waddia chondrophila*** y ***Chlamydophila abortus*** han sido **asociadas** con aborto.

TRATAMIENTO DE CHLAMYDIOSIS

Cualquier ave o especie sospechosa de encontrarse contaminada con *Chlamydophila psittaci* debe ser considerada como altamente patogénica. Clínicos, patólogos y laboratoristas deben prevenir la diseminación de heces desecadas y aerosoles producidos post-mortem o durante el molido o pipeteado de emulsiones tisulares, pues estos elementos son extremadamente peligrosos. Por ello dichas tareas deben ejecutarse bajo una campana de presión negativa, desde la cual el aire efluente sea filtrado a través de filtros HEPA.

Como zoonosis en el hombre, la ornitosis tuvo un incremento regular durante algún tiempo, tal como lo demuestran los monitoreos que se han efectuado sobre el tema. La clamidiosis de mamíferos origina una zoonosis potencial para el hombre con infecciones que pueden ser graves; por ello deben implementarse métodos más sensibles de detección de infecciones clamidiales en animales, semejantes a los actualmente rutinarios usados en el diagnóstico de infecciones clamidiales óculogenitales humanas.

En lo que a quimioterapia se refiere, el mecanismo de acción de los antimicrobianos sobre los *Chlamydiales* intracelulares se ve dificultado debido a la escasa penetración medicamentosa a través de la membrana celular. Las sulfamidas, tetraciclinas y cloranfenicol dan buen resultado contra los *Chlamydiales*, sobre todo en los primeros estadios de la enfermedad, pero se ha observado una creciente resistencia a los fármacos empleados en los tratamientos.

Con respecto a las clamidias ambientales, se ha determinado que son sensibles a tetraciclinas, macrólidos y rifampicina, pero los autores han detectado resultados **inesperados**, a saber:

1. *Parachlamydia acanthamoebae* es resistente a amoxicilina, β lactámicos, ceftriaxona, ciprofloxacina, fluoriquinolonas, imipenem, ofloxacina y penicilina G, mientras *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydophila psittaci* son sensibles.
2. Sobre *Parachlamydia acanthamoeba* tuvieron efecto bacteriostático amikacina y gentamicina, mientras *Chlamydia trachomatis* es resistente a este último aminoglucósido.
- 3.
4. Según los investigadores, tanto los macrólidos como la tetraciclina serían **eficaces** en el tratamiento contra *Parachlamydia acanthamoebae*, conclusión sugerida por la **diversidad** metabólica y estructural del orden *Chlamydiales*.

**MORFOLOGÍA
Y CICLO BIOLÓGICO**

El Género ***Chlamydia*** está constituido por microorganismos procariotas, parásitos intracelulares obligados, Gram negativos, que se diferencian de los virus por poseer ambos ácidos nucleicos, ribosomas, enzimas y una pared celular químicamente similar a la de las bacterias Gram negativas y *Rickettsia* spp. Sin embargo, una diferencia fundamental es la carencia de peptidoglicano, que es reemplazado por una estructura proteica polimérica.

Durante su evolución, las ***Chlamydias*** intercalan etapas de presentación como **CUERPO ELEMENTAL** (preparado para la sobrevivida extracelular) y como **CUERPO RETICULAR** (observado en la etapa de multiplicación intracelular). Ambas formas (y todas las morfologías intermedias del ciclo evolutivo) son fácilmente coloreables por los métodos de Castañeda, Giemsa, Giménez, Macchiavello y Stamp.

El **CUERPO ELEMENTAL**(CE) tiene forma cocoide en la mayoría de las especies y piriforme en ***C. pneumoniae***. Sus medidas oscilan entre 200 y 300 nm de diámetro; por fagocitosis se hace intracelular, y después de unas ocho (8) horas se forma el **CUERPO RETICULAR**, (CR) que llega a medir 1000 nm de diámetro y se ubica en un fagosoma unido a la membrana de la célula hospedadora.

Transcurridas unas doce (12) horas, el cuerpo reticular se multiplica por fisión binaria y origina entre cuatro (4) y dieciséis (16) cuerpos que al permanecer en la vacuola disminuyen su tamaño. Alrededor de veinte (20) horas después de iniciado el ciclo reaparecen los cuerpos elementales intracelulares con aspecto de pequeñas esferas.

C. trachomatis desarrolla una sola vesícula endosómica con muchos CE lo que da lugar a un solo cuerpo de inclusión, en contraste, ***C. psittacci*** y ***C. pneumoniae*** producen múltiples vesículas endosómicas

Según la especie de ***Chlamydia*** puede observarse la presencia de una “matriz” con glucógeno durante la formación de los cuerpos elementales; tal es el caso de ***C. trachomatis***. Por su parte, la evolución varía entre treinta (30) y sesenta (60) horas según la especie y célula hospedadora.

Es importante recordar que ***Chlamydia*** es capaz de: sobrevivir a la fagocitosis al impedir la fusión fagolisosoma, de inhibir la síntesis del DNA y de aprovechar la energía metabólica del huésped por empleo de ATP. Si la producción de energía intracelular del huésped llega a detenerse, también se frena la multiplicación parasitaria.

En lo que respecta a su interacción con las células hospedadoras, las clamidias en general son parásitos intracelulares obligados aunque también actúan como simbioses, es decir, como individuos asociados en simbiosis. De todas formas, el resultado de la infección difiere entre distintos aislamientos y puede ser modificado por varios factores, como p.ej. la célula hospedadora y las condiciones ambientales que rodean a las clamidias (medios de cultivo, temperatura de incubación, etc.). De no existir interferencia alguna, las clamidias no tienen ningún inconveniente que impida su multiplicación intracelular y se instituye una inalterable y estrecha relación hospedador-parásito, aunque en ciertos casos la infección de amebas por clamidias ambientales ha concluido con la destrucción de las células hospedadoras. También se ha llegado a la conclusión que por obra de ciertos mecanismos de restricción, algunas cepas de clamidias ambientales no llegan a infectar determinadas clases de amebas, por lo cual éstas son consideradas resistentes a la infección clamidial.

COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA

La pared celular de estos microorganismos posee varios antígenos de importancia:

- **Lipopolisacárido (antígeno específico de grupo)**

El lipopolisacárido es un antígeno presente en todos los miembros de la familia **Chlamydiaceae**. Es específico de género y no permite diferenciar especies. Su presencia se ha demostrado mediante fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA y es una causa importante de las reacciones cruzadas que, con frecuencia, se observan en la serología de **Chlamydiaceae**.

Está presente en los cuerpos elementales, en los reticulares, en la membrana de las células infectadas y en la región proximal de células anexas a las anteriores, pero no infectadas.

- **Proteína principal de la membrana externa(MOMP) (antígeno específico de especie)**

Uno de los antígenos mejor caracterizados en las especies de **Chlamydiae** es el **MOMP**. Es la proteína que se halla en mayor proporción (60%) en los cuerpos elementales y reticulares y es común a todos los miembros de la familia **Chlamydiaceae**, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies.

A veces puede estar enmascarada con otras proteínas de superficie, PMP (proteínas polimórficas de la membrana externa) y no es inmunodominante como en **C. pneumoniae**.

- **Proteínas del complejo de membrana externa (OMC) ricas en cisteína**

Están presentes en grandes cantidades en el cuerpo elemental y se sintetizan de manera tardía en la maduración del cuerpo reticular hacia el elemental. No están presentes en el cuerpo reticular.

- **Proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP)**

Su superficialidad e inmunogenicidad justifican el interés por estas proteínas.

- **Proteínas de inclusión (Inc)**

Se localizan en la membrana de los cuerpos de inclusión de todos los miembros del orden **Chlamydiales**. Sus funciones se han relacionado con el desarrollo de la inclusión y la evasión del sistema inmunológico.

- **Chaperonas y Proteínas de shock térmico (HSP) (antígeno específico de especie)**

Las chlamydias sintetizan un pequeño grupo de proteínas altamente conservadas como respuesta al calor o al estrés y son inmunogénicas. Las más estudiadas son la HSP 60 y HSP 70 de 60 y 70 kd respectivamente que están en la superficie del corpúsculo elemental y corpúsculo reticulado. Cumplen funciones de corregir plegamientos incorrectos de proteínas desnaturalizadas y están asociadas a daño e inflamación ocular en el caso de **C. trachomatis**. En el caso de **C. pneumoniae** se relacionarían con la arteriosclerosis, por inducir un ataque a la pared endotelial, mediante

una reacción de hipersensibilidad retardada, propia de las infecciones crónicas, que puede ser el eslabón entre los microorganismos involucrados y la autoinmunidad.

- **Enolasa.**

Esta proteína de la superficie bacteriana comparte antígenos con la enolasa humana presente en las células hematopoyéticas, por lo que, en las infecciones por chlamydia, la inducción de anticuerpos anti-enolasa podría causar reacciones autoinmunes inflamatorias.

- **Antígenos tipo específico:**

Polipéptidos de 30Kd en el caso de ***C. trachomatis*** que permiten la diferenciación de serotipos.

- **Antígenos específicos de subespecie**

También de estructura polipeptídica que permiten caracterizar los serotipos de ***C. trachomatis*** en dos grandes subespecies: grupo B y C (86).

**DIAGNÓSTICO
DE LABORATORIO**

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Puede realizarse por microscopía electrónica y óptica, en este caso aplicando técnicas de coloración como los métodos de Castañeda, Giemsa, Giménez, Macchiavello y Stamp.

En el caso de ***C. trachomatis*** existe otro método tintorial con yodo, la coloración de Lugol, utilizado en cultivos celulares para observar la presencia de cuerpos de inclusión ricos en glucógeno.

El uso de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra diversas fracciones antigénicas de ***Chlamydia*** presentes en secreciones, tejidos infectados o sobre aislamientos en cultivo celular, es también una técnica de rápida aplicación, pero su utilización requiere el uso de microscopio de fluorescencia.

AISLAMIENTO

Por ser parásitos intracelulares obligados, las ***Chlamydias*** se cultivan en modelos biológicos como animales de laboratorio, medios tisulares y saco vitelino de embrión de pollo.

El tipo de inóculo que se emplea debe ser tratado previamente con anti-microbianos y antifúngicos para purificarlo y evitar la competencia de agentes contaminantes. La metodología varía según su origen, y con posterioridad a dicha "purificación" se procede a inocular en los medios celulares como lo describe la técnica de **repique en línea celular Mc Coy**.

La **inoculación en saco vitelino de embrión de pollo** es aplicable a todas las variedades de ***Chlamydia*** y se realiza cuando el embrión tiene entre seis (6) y siete (7) días de incubación. El volumen del inóculo es de 0,2 ml y entre los cinco (5) y doce (12) días siguientes a la inoculación se produce la muerte del embrión, en el que son observables congestión y hemorragias.

INFECCIONES EN ANIMALES DE LABORATORIO

En forma natural, ***Chlamydia*** ocasiona una gran cantidad de procesos patológicos y su capacidad infectiva también se relaciona con la sensibilidad de sus ocasionales huéspedes.

Experimentalmente se dispone de dos especies "de laboratorio" para realizar las inoculaciones: el ratón y el embrión de pollo; el mono puede ser empleado para este fin, pero la infraestructura necesaria y el costo del mantenimiento limitan su uso.

- ➔ **Ratón:** inoculada por distintas vías (intranasal, intraperitoneal e intra-cerebral) ***Chlamydia*** origina diversos procesos patológicos (neumonía, hepato y esplenomegalia con exudados fibrosos intraabdominales y meningoencefalitis ó leptomeningitis respectivamente). En cada caso e independientemente de la vía de inoculación empleada, se consigue una importante cantidad de cuerpos elementales.
- ➔ **Embrión de pollo:** la vía más utilizada es el saco vitelino, donde ***Chlamydia*** alcanza elevada titulación tras su multiplicación. En ciertos casos se produce óptimo desarrollo clamidial inoculando

en cavidad alantoidea o en membrana corioalantoidea, aunque estas últimas vías no son de elección.

- **Mono:** puede ser inoculado en prepucio, ganglios linfáticos, recto y por vías intraperitoneal, intraocular e intranasal. Es importante recordar que el mono no es sensible a las inoculaciones por vías endovenosa e intracerebral.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Todos los organismos del género **Chlamydia** y **chlamydophila** poseen lipopolisacáridos antigénicos que permiten identificarlos serológicamente por métodos como fijación de complemento, inmunofluorescencia, ELISA test e inmunocromatografía.

Pueden presentarse casos de reacción cruzada entre los miembros del orden **Chlamydiales**, resultado directamente relacionado con la similitud genética de las especies. Pero aún se debe ser muy cauteloso con la interpretación de los resultados debido a la positividad dada por ciertas clamidias ambientales asociadas a noxas respiratorias.

Actualmente, la metodología más utilizada es la PCR, en donde se han utilizado modificaciones en la técnica (de un sólo paso - semianidada - y de dos pasos - anidada -,) aplicadas al estudio de muestras respiratorias, y se han detectado secuencias correspondientes a **Protochlamydia amoebophila**, **Waddlia chondrophila** y Candidatus **Rhabdochlamydia porcellionis**, con lo que se incrementa la sospecha de asociación del número de **Chlamydiales** y las patologías de tipo respiratorio.

1. Preparación del Antígeno

El **antígeno específico de grupo** se prepara apartir del saco vitelino de embrión de pollo infectado con **Chlamydias**. Tras la cosecha, el material se homogeniza y suspende al 20 ó 30% en caldo cerebro corazón o PBS a pH 7,2; se hierve durante treinta (30) minutos, se enfría y se añade fenol en cantidad suficiente para una concentración final del 0,5%.

Si la muestra proviene de un paciente, el hisopo impregnado con el LPS (lipopolisacárido) se agita en medio de transporte (detergente en solución salina bufferada) y se somete a ebullición por quince (15) minutos; posteriormente se deja enfriar y finalmente se reagita, aumentando así la cantidad de sitios de combinación Ag-Ac disponibles por dispersión del antígeno.

2. Métodos de Identificación Serológica

- **Fijación de Complemento:** El antígeno obtenido se enfrenta con suero que contiene anticuerpos clamidiales, determinándose que se trata de **Chlamydia** cuando la prueba es positiva con dilución 1:8 o mayor.
- **Inmunofluorescencia:** Detecta rápidamente los antígenos clamidiales; para ello se utilizan anticuerpos monoclonales y si el material contiene antígeno clamidial, el anticuerpo marcado con fluoresceína se une al antígeno intracitoplasmático específico originando fluorescencia positiva observable con microscopía de luz UV.

- **ELISA test:** Este método emplea Anticuerpos mono y / o policlonales, permite evaluar un elevado número de muestras por vez, detecta la presencia de microorganismos muertos y su punto final se mide por variación en la intensidad de color. La técnica puede utilizarse para detectar ***Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci* y *Chlamydophila pneumoniae***. Es una prueba de alta sensibilidad con bajo nivel de antígeno.
- **Inmunocromatografía:** Este tipo de determinación permite la identificación visual selectiva del antígeno LPS clamidial común por medio del cambio de color producido al realizarse la unión antígeno/anticuerpo.

**TÉCNICAS
TINTORIALES**

COLORACIÓN POR TÉCNICA DE CASTAÑEDA

MATERIALES

Solución buffer de fosfatos

Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄) sol acuosa 1%	100 ml
Fosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O), sol acuosa 25% (mezclar y agregar 1 ml de formol)	100 ml

Solución madre de azul de metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol metílico	100 ml

Solución de trabajo de azul de metileno

Solución buffer de fosfatos	20 ml
Solución madre de azul de metileno	0,15 ml
Formol	1 ml

Solución de safranina

Safranina O, solución acuosa al 2%	25 ml
Ácido acético al 0,1%	75 ml

Técnica

1. **Extendido o impronta de tejidos:** según método clásico.
2. **Secado:** al aire.
3. **Coloración principal:** Solución de trabajo de azul de metileno cubriendo el extendido.
4. Dejar escurrir el colorante sin secar.
5. **Coloración secundaria:** Safranina, de 1 a 4 seg.
6. **Lavado:** con agua corriente.
7. **Secado:** con papel.
8. **Observación.**

INTERPRETACIÓN: cuerpos de inclusión color **AZUL** sobre elementos celulares color **ROJO**.

COLORACION POR TÉCNICA DE GIEMSA

MATERIALES

Solución madre de Giemsa

Colorante de Giemsa en polvo	0,5	gs
Glicerina	33	ml
disolver entre 55 y 60 °C durante 2 h; luego añadir		
Alcohol metílico absoluto (libre de acetona)	33	ml
mezclar, sedimentar y conservar a temperatura ambiente		

Solución buffer fosfato ácido de sodio (0,067 M)

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	9,2	g
Agua destilada	1000	ml

Solución buffer fosfato disódico (0,067 M)

Na ₂ HPO ₄	9,5	g
Agua destilada	1000	ml

Agua amortiguada (pH 7,2)

Sol. buffer fosfato ácido de Na	39	ml
Sol. buffer disódico	61	ml
Agua destilada	900	ml

Solución de trabajo de Giemsa (preparar antes de usar)

Solución madre de Giemsa	1	parte
Agua amortiguada	40 ó 50	partes

Técnica

1. **Extendido o impronta de tejidos:**según método clásico.
2. **Secado:** al aire.
3. **Fijado:** Alcohol etílico absoluto durante 5 min.
4. **Secado:** al aire.
5. **Coloración principal:** colorante de Giemsa durante 1h.
6. **Lavado:** rápido con alcohol etílico 95°.
7. **Secado.**
8. **Observación.**

INTERPRETACIÓN: Cuerpos de inclusión color **ROJO PÚRPURA.**

COLORACIÓN POR TÉCNICA DE GIMÉNEZ

MATERIALES

Solución madre de carbolfucsina

Fucsina al 10% (p / v) en etanol 95°	100	ml
Sol. acuosa de fenol al 4% (v/v)	250	ml
Agua destilada	650	ml
(mantener a 37 °C durante 48 h antes de usar)		

Solución buffer de fosfato ácido de sodio (0,2 M)

NaH ₂ PO ₄	2,84	g
Agua destilada	100	ml
también puede prepararse con:	3,27	g
Na ₂ H PO ₄ .12 H ₂ O	100	ml
Agua destilada		

Solución buffer fosfato disódico (0,2 M)

Na ₂ HPO ₄	2,76	g
Agua destilada	100	ml

Solución buffer de trabajo (0,1 M y pH 7,45)

Sol. buffer fosfato ácido de Na	3,5	ml
Sol. buffer fosfato disódico	15,5	ml
Agua destilada	19	ml

Solución de trabajo de carbolfucsina

Sol. madre de carbolfucsina	4	ml
Sol. buffer de trabajo 0,1 M	10	ml
(filtrar antes de usar - duracion: 48 hs)		

Solución acuosa de verde de malaquita al 0,8%

Técnica

1. **Extendido o impronta de tejidos:** según técnicas clásicas.
2. **Secado y fijado:** por calor.
3. **Coloración principal:** Carbolfucsina durante 1 ó 2 min.
4. **Lavado:** con agua corriente.
5. **Coloración secundaria:** Verde de malaquita por 6 a 9 seg.
6. **Lavado:** con agua corriente.
7. **Secado** con papel y **observación.**

INTERPRETACIÓN: cuerpos de inclusión **ROJOS** sobre fondo color **VERDOSO.**

COLORACIÓN POR TÉCNICA DE MACCHIAVELLO

MATERIALES

Solución de fucsina básica al 0,25%

Fucsina básica	0,25 g
Agua bidestilada (pH 7,4 añadiendo carbonato de Na)	100 ml
(filtrar directamente sobre el extendido)	

Ácido cítrico al 0,25%

Ácido cítrico	0,5 g
Agua bidestilada	200 ml

Solución acuosa de azul de metileno al 1%

Azul de metileno	1 g
Agua bidestilada	100 ml

Técnica

1. **Extendido o impronta de tejidos:** según técnicas clásicas.
2. **Secado y fijado:** por calor.
3. **Coloración principal:** Fucsina básica al 0,5% por 5 minutos (agregar a medida filtra por el papel).
4. **Decoloración:** por inmersión en ácido cítrico (algunos segundos).
5. **Lavado:** con agua.
6. **Coloración secundaria:** Azul de metileno al 1% durante 20 a 30 seg.
7. **Lavado:** con agua.
8. **Secado:** colocar sobre un extremo y dejar escurrir.
9. **Observación.**

INTERPRETACIÓN: cuerpos de inclusión color **ROJO** sobre fondo color **AZUL**.

COLORACION POR TÉCNICA DE STAMP

MATERIALES

Solución madre de fucsina

Fucsina básica	10 g
Etanol 95%	100 ml

Solución de carbolfucsina

Sol. madre de fucsina	10 ml
Fenol	5 ml
Agua destilada	100 ml

Solución madre de azul de metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol etílico de 95°	100 ml
Agua destilada	30 ml

Solución acuosa de azul de metileno

Sol. madre de azul de metileno	10 ml
Agua destilada	90 ml

Técnica

1. **Extendido ó impronta de tejidos:** según técnicas clásicas.
2. **Secado y fijado:** por calor.
3. **Coloración:** cubrir con Carbolfucsina diluída 1/5 durante 5 min.
4. **Lavado:** con agua.
5. **Decoloración:** con ácido acético al 0,5% durante 30 seg.
6. **Lavado:** con agua
7. **Coloración secundaria:** azul de metileno al 1% durante 20 seg.
8. **Lavado** con agua, **secado** y **observación**.

INTERPRETACIÓN: cuerpos elementales de color **ROJO**.

COLORACION DE LUGOL

Permite observar la formación de los cuerpos de inclusión intracelulares de las cepas de referencia y su evaluación, pues se realiza el control de infectividad de cultivo por recuento o titulación de Unidades Formadoras de Inclusiones.

MATERIALES

Solución A:

IK	1 g
Ibisublimado	1 g
Agua destilada	10 ml
(dividir el volumen total en dos partes)	

Solución 1:

Solución A	10 ml
Alcohol etílico	10 ml

Solución 2:

I	0,25 g
Alcohol etílico	10 ml

Solución 3:

Solución A	10 ml
Glicerina	8 ml
PBS	2 ml

Técnica

1. **Retirar** del vial inoculado el MEM Ciclohexitida.
2. **Lavar** la monocapa con PBS (1 ml).
3. **Retirar** el ml de PBS con pipeta Pasteur.
4. **Fijar** la muestra con metanol durante 10 min.
5. **Retirar** el metanol.
6. **Secar** durante 15 min.

Si no se pudiera continuar, congelar el vial a -20 °C.

7. **Cubrir** el cubreobjetos con Solución 1 durante 15 min.
8. **Retirar y cubrir** con Solución 2 durante 10 min.
9. **Retirar y cubrir** con Solución 3 durante 15 min.
10. **Retirar y montar** el cubreobjetos sobre un portaobjetos.
11. **Observar** la muestra con microscopio de luz y aumento mediano.

INTERPRETACIÓN: cuerpos de inclusión color **PARDO**.

**AISLAMIENTO
POR
CULTIVO**

CULTIVO DE *CHLAMYDIAS* EN MEDIOS TISULARES

Cuando se desee realizar el CULTIVO DE *CHLAMYDIATRACHOMATIS*, se procederá como indica la técnica de Cultivo Celular McCoy, aplicándose la coloración de Lugol exclusiva para *Chlamydia trachomatis*.

SOLUCIONES DE TRABAJO PARA

a) MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR Mc COY

b) CULTIVO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

→ Medio MEM (Minimum Essential Medium Powder Autoclavable) (Laboratorio Gibco)

→ Medio MEM uso

El medio MEM es autoclavable y se diluye en 880 ml de agua bidestilada fraccionada en botellas de 88 ml cada una.

Bajo flujo laminar se agrega a cada botella:

L-glutamina de 200 mM	1,5	ml
Suero fetal bovino (inactivar a 56 °C durante 30 min.)	10	ml
Gentamina 80	0,02	ml
Hepes	2	ml
Bicarbonato de Na al 7,5 %	2	ml
pH final: 7,4 (alcalinizar con Bicarbonato de Na al 7,5% o acidificar con Hepes)		

Cada botella dura 2 semanas a 4 °C

→ Hepes (Laboratorio Gibco)

Hepes	2,38	g
Aguabidestilada	10	ml

(filtrar la solución con filtro de 0,22 µm)

→ Medio Hanks (Laboratorio Gibco)

→ Bicarbonato de Na al 7,5%

Bicarbonato de Na	7,5	g
Agua destilada	100	ml

(autoclavar dos veces)

→ Tripsina 1:250 (Laboratorio Gibco)

→ **Tripsina Versene**

Tripsina 1:250 Gibco	0,50	g
Versene	0,20	g
NaHCO ₃	0,58	g
Dextrosa	1,00	g
CIK	0,20	g
NaCl	8,00	g
Rojo de fenol al 0,5 %	4	gotas
Agua destilada csp	1000	ml

(esterilizar por filtración: 0,22 µm y fraccionar)

→ **MEM Cicloheximida**

Cicloheximida Sigma	10	mg
PBS	20	mg

A 1 ml de esta solución agregar 4 ml de MEM uso, filtrar y fraccionar.

En el momento de utilizar, agregar 0,1 ml por cada 10 ml de MEM uso.

PREPARACIÓN DE VIALES PARA CULTIVO CELULAR DE *Chlamydia trachomatis*

Viales: Shell 15 x 45 mm. 1 DRAM - Opticlear.

Son de vidrio y poseen una tapa de papel de aluminio; en su interior y sobre el fondo plano, llevan un cubreobjetos de forma circular.

Cubreobjetos: Microscope cover glass de Fisher Scientific Co. (size 12 mm. circle)

Preparación de suspensión para cultivo:

Suspensión de línea celular Mc Coy	0,8	ml
MEM uso.	100	ml

De la suspensión así preparada utilizar 1 ml por vial.

TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras clínicas de cualquier origen (hisopado, uretral, endocervical o conjuntival, biopsia, exudados, semen, etc.) deben ser transportadas en medio 2-sacarosa-fosfato y guardadas a 4 °C por no más de 24 h

En caso de no procesarse deberán conservarse a -70 °C.

Medio 2-sacarosa-fosfato (2-SP)

Disolver perfectamente:

Sacarosa	68,46	g
Agua bidestilada	500	ml

Disolver en poca cantidad de agua bidestilada:

K ₂ HPO ₄	2,01	g
KH ₂ PO ₄	1,01	g

Mezclar ambas soluciones y llevar a 1000 ml con agua bidestilada; ajustar a pH 7,2. Filtrar con filtro de 0,22 µm y fraccionar.

Solución de trabajo

2SP	100	ml
Suero fetal bovino	3	ml
Gentamina	0,03	ml

REPIQUE DE LÍNEA CELULAR MC COY

Técnica:

Quantificar el porcentaje de monocapa desarrollada.

1. Bajo flujo laminar **retirar el medio de cultivo viejo**.
2. **Repicar** parte del medio en Caldo cerebro corazón para llevar a cabo el control de esterilidad.
3. **Añadir** 5 ml de medio Hanks, lavando (de la botella) las paredes opuestas y laterales a la monocapa; finalmente lavar la pared que contiene la monocapa.
4. **Retirar** el Hanks.
5. **Repetir** los pasos 4 y 5.
6. **Agregar** tripsina Versene (1 ml por botella de 250 ml)
7. **Verificar** que la tripsina tome contacto con toda la monocapa.
8. **Llevar a estufa a 37 °C** durante 1 a 4 min. La tripsinización finaliza cuando se observa caer la monocapa. Se puede golpear ligeramente la botella para acelerar la caída.
9. **Frenar el efecto de la tripsina** con medio MEM uso, en cantidad como para diluirlo 6 veces (ej.: dil. 1/16).
10. **Agitar** enérgicamente con pera de goma sin producir espuma.
11. **Tomar el volumen calculado para efectuar los repiques necesarios** (por cantidad de botellas). Completar con MEM uso hasta un volumen final de 10 ml

Colocar las botellas en estufa a 37 °C durante 48 a 72 h para posteriormente realizar un nuevo repique.

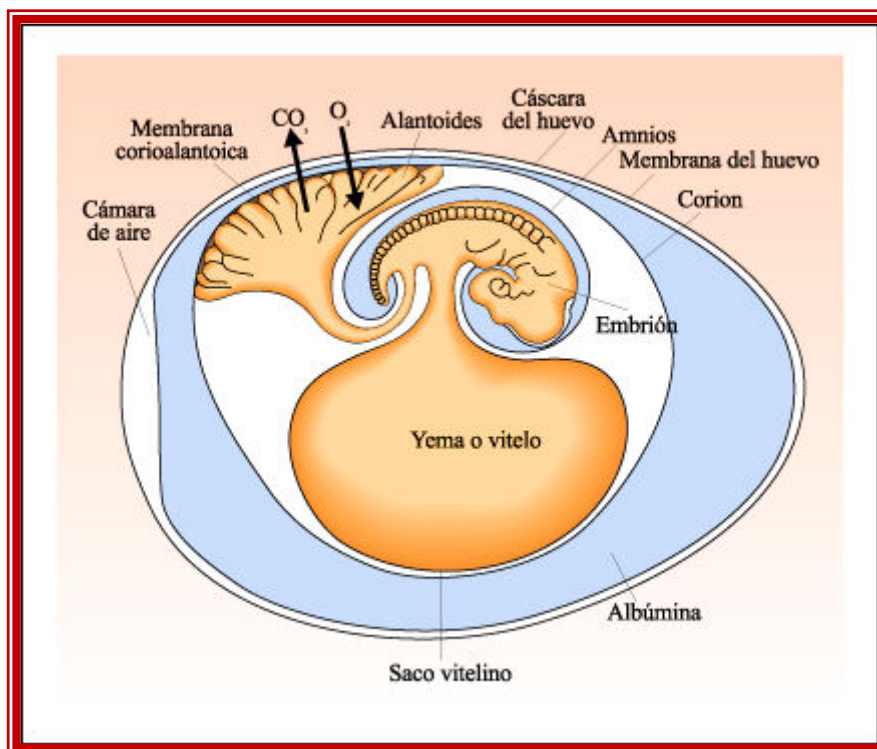
MÉTODO DIAGNÓSTICO DE *Chlamydia tracomatis* POR CULTIVO CELULAR

Técnica:

- **Vial con monocapa de células Mc Coy** con 24 a 48 h de incubación.
- **Retirar** del vial el medio MEM uso con pipeta Pasteur.
- **Sembrar** 0,02 ml de muestra.
- **Centrifugar** 1 hora a 1000 g a 35 °C.
- **Incubar** el vial 2 h a 37 °C.
- **Agregar** MEM Cicloheximida (1,5 ml)
- **Incubar** 72 h a 37 °C en atmósfera de CO₂
- **Lavar, fijar y teñir la muestra** con el método de coloración de Lugol.
- **Montar en portaobjetos.**
- **Leer al microscopio óptico.**

**AISLAMIENTO
POR
INOCULACIÓN**

AISLAMIENTO POR INOCULACIÓN EN EMBRIÓN DE POLLO



Anatomía del embrión de pollo:

1. **Cámara de aire:** se ubica superiormente (en el polo más romo), y está formada por la separación de las membranas **Testácea** y **Fáfara**.
2. **Membranas Testácea y Fáfara:** tapizan íntegramente la cara interna de la cáscara como una sola membrana, separándose recién al formar la **Cámara de aire**.
3. **Cavidad alantoidea:** está constituida por una membrana muy vascularizada denominada alantoides; contiene al **líquido alantoideo** y es una de las vías más empleadas para inoculación general.
4. **Saco amniótico:** rodea totalmente al embrión y contiene al **líquido amniótico**; como la cavidad alantoidea, es una vía de inoculación general utilizada frecuentemente.
5. **Saco vitelino:** más comúnmente conocido como “yema” contiene **vitelo** (sustancia que actúa como alimento del embrión hasta cierto tiempo después de nacido el pollito). Su membrana constituye el medio ideal para reproducir **Chlamydia o Chlamydophila**. Es vía de elección para su inoculación.

Manejo de los embriones:

- **Incubación:** se realiza con una temperatura que oscila entre 39 y 39,5°C., y una humedad ambiental del 75 al 80%.
- **Volteos diarios:** 2 (entre los días 2 y 19 de incubación).
- **Edad del embrión para inocular en Saco Vitelino:** 2 a 7 días.

AISLAMIENTO POR INOCULACIÓN EN EMBRIÓN DE POLLO

بن مuestra tisular:

Triturar y homogenizar en un 20 ó 40% de PBS y a pH 7,2 con:

- Estreptomina, Vancomicina y Kanamicina (1 mg / ml de c/u) ó
- Estreptomina (10 mg / ml) y Neomicina (1 mg / ml).

SON INHIBIDORES: Tetraciclinas, Chloromicetina y Penicilinas.

بن Muestra fecal o tisular muy contaminada:

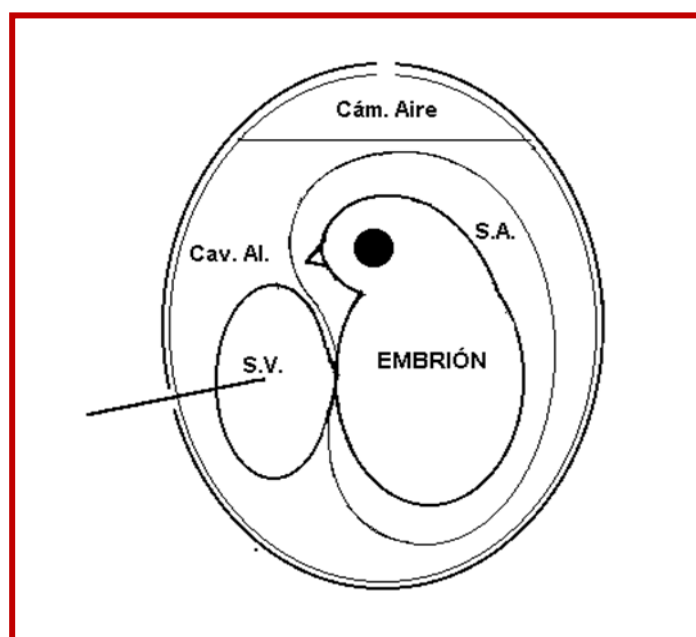
Suspender al 20% en Kanamicina, Estreptomina y Vancomicina; centrifugar por 30 minutos a 1000 rpm. y repetir tres veces la maniobra. Después de cada centrifugado **separar la porción media del sobrenadante** (eliminando elementos en suspensión y sedimento). Tras la última centrifugación, **extraer e inocular la capa media del material**.

بن Muestra Líquida:

La sangre heparinizada o el líquido ascitis recolectados asepticamente pueden inocularse inmediatamente.

TÉCNICA DE INOCULACIÓN EN SACO VITELINO

1. **DELIMITAR Y PERFORAR** la cámara de aire (con torno o punzón).
2. **DETERMINAR** la posición del SV ubicando con el ovoscopio el ojo del embrión y girando 180° el huevo embrionado.
3. **PERFORAR ASÉPTICAMENTE** la cáscara sin lastimar las membranas.
4. **INOCULAR** entre 0,3 a 0,5 ml utilizando agujas 16/5 ó 25/8.
5. **SELLAR** ambas perforaciones con esmalte de uñas.
6. **REINCUBAR, CONTROLAR LA EVOLUCIÓN Y COSECHAR.**



AISLAMIENTO POR INOCULACION EN RATÓN BLANCO

Manejo del ratón blanco

Para extraerlo de la caja se procede a tomarlo por la piel del cuello o directamente de la cola, tras lo cual se lo apoya sobre una superficie áspera que permita fijarlo con seguridad; posteriormente el método de contención varía según la técnica de inoculación a emplear.

1. VÍA INTRANASAL

Se procede a instilar gotas de la suspensión clamidial en los orificios nasales del animal de experimentación, o bien se hace inspirar dicha suspensión en forma de aerosol.

2. VÍA INTRACEREBRAL

Dado lo particular de esta vía solamente pueden inyectarse de 0,1 a 0,2 ml, ya que la caja craneana carece de la elasticidad necesaria para tolerar volúmenes mayores.

Técnicas

Abordaje por ángulo interno del ojo:

Se fija el animal contra la mesada y con un movimiento seguro se atraviesa la pared ósea entre el globo ocular y el párpado, en el ángulo interno del ojo.

Esta inoculación **NO REQUIERE ANESTESIA PREVIA** por la rapidez de realización. Posteriormente, el animal puede presentar un enrojecimiento en el punto de penetración de la aguja.

Abordaje por zona frontal:

En este caso el animal debe ser sometido a una inducción anestésica; luego se lo fija contra la mesada, y en la parte media de la línea imaginaria que une el ojo con la base de la oreja se clava la aguja con un golpe seco, ya que el cráneo del ratón no ofrece mayor resistencia a la inoculación directa.





NO INOCULAR NUNCA EN LA ZONA FRONTAL MEDIA PUES SE DAÑA EL SENO VENOSO Y EL ANIMAL MUERE INMEDIATAMENTE POR MALA PRAXIS.

3. VÍA INTRAPERITONEAL

Método de sujeción I:

Tomar la piel del cuello del ratón entre índice y pulgar, sosteniendo la zona posterior entre el dedo medio y la palma de la mano; antes de inocular, un ayudante deberá estirar el miembro posterior correspondiente a la inoculación.

Método de sujeción II:

Colocar al ratón sobre una superficie áspera que le permita afirmarse, tomarlo de la cola con pulgar e índice, apoyar en la base de la misma el dedo anular y “envolverla” con los dedos libres; luego sujetar la piel del cuello entre pulgar e índice: el dorso del ratón descansará sobre los dedos que mantienen sujeta la cola.

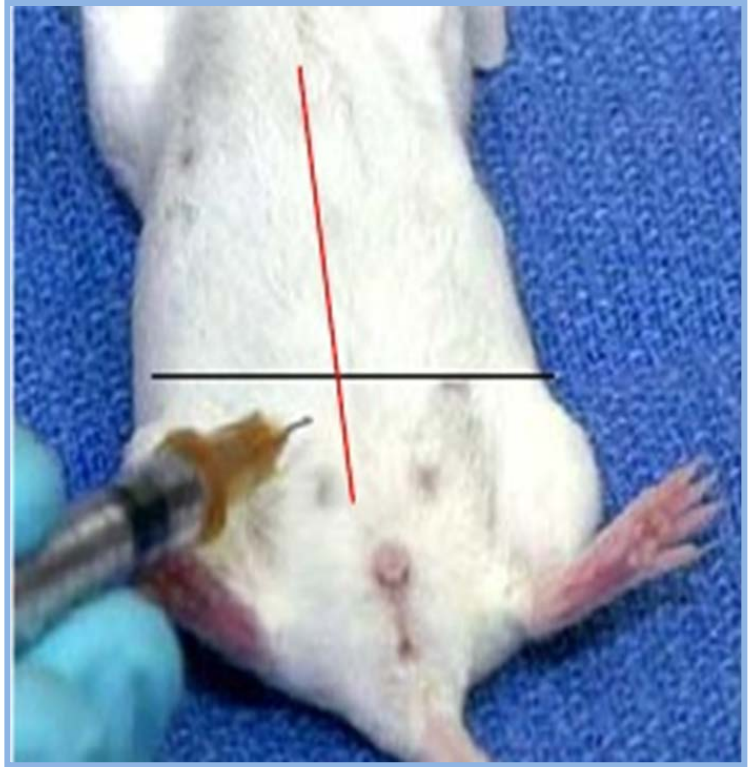


El miembro posterior correspondiente al punto de inoculación se sujetará con el dedo meñique, en caso de carecer de ayudantes.

Obviamente, cuando el inoculador es diestro el ratón debe ser tomado con la mano izquierda, y viceversa. Para serinoculado el animal debe permanecer en decúbito dorsal con la cabeza más baja que la cadera para facilitar el desplazamiento de los órganos abdominales hacia el diafragma, evitando así posibles traumas durante la práctica.

Técnica

1. Aplicar antiséptico en la zona cercana al ombligo.
2. Clavar la aguja con el bisel hacia arriba en un punto cercano a la ingle y en dirección al diafragma, desplazándola siempre por vía subcutánea.
3. Colocar la aguja en posición perpendicular a la masa muscular y atravesarla con un golpe seco.
4. Inyectar el inóculo de manera lenta.
5. Extraer la aguja rápidamente.



**DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO**

DETERMINACIÓN DE LPS POR ELISA TEST (IDEIA™ CHLAMYDIAS)

Este método combina la obtención de Antígenos lipopolisacáridos y de Anticuerpos monoclonales específicos anti LPS; permite la evaluación simultánea de un elevado número de muestras y la detección de organismos vivos y muertos.

Muestra: obtener por hisopado, tomando una buena cantidad.

Transporte de la muestra: según indicaciones

Procesado de la muestra: Agitar en Vortex, hervir, enfriar, reagit.

Materiales:

Muestra, Muestra control, Conjugado monoclonal, Solución de trabajo bufferada, Sustrato, Amplificador, Solución de frenado.

Técnica:

1. **Muestra:** en medio de transporte previamente calentada a 100 °C durante 15 min. preparada y vortead.
2. **Muestra problema o control:** 200 µl en un pocillo adherido con anticuerpo monoclonal específico.
3. **Conjugado monoclonal:** 50 µl en cada pocillo; agitando, incubar 60 min. a 37 °C.
4. **Solución de trabajo bufferada:** lavar la policubeta cuatro (4) veces.
5. **Sustrato:** 100 µl en cada pocillo; con agitación, incubar 20 min. a 37 °C.
6. **Amplificador:** 100 µl; con agitación, incubar 10 min. a 37 °C.
7. **Solución de frenado:** agregar 50 µl en cada pocillo.
8. **Lectura:** apreciar cambios de color a ojo desnudo o con espectrofotómetro a 492 nanómetros.

INTERPRETACIÓN: Positivo o Negativo

TITULACION DE INMUNOGLOBULINAS POR ELISA TEST (INMUNOCOMB)

Este método permite determinar títulos de Anticuerpos IgG para *Toxoplasma* y *Chlamydothyla felis* en felinos.

Muestra: suero sanguíneo refrigerado entre 2 y 8 °C, o bien sangre entera impregnando un disco de papel.

Materiales: provistos por el kit InmunoComb.

Técnica:

1. **Muestra:** en el pocillo A₁ colocar
suero sanguíneo: 5 µl o bien
disco impregnado con sangre: incubar 60 min. para extraer los anticuerpos.
2. **Muestras para Control:** 5 µl de controles positivo y negativo en pocillos A₂ y A₃ respectivamente.
3. **Tarjeta Reactiva:** colocarla en el pocillo correspondiente e incubar a temperatura ambiente de la siguiente manera
A: incubar durante 10 minutos; secar y pasar a
B: incubar durante 2 minutos; secar y pasar a
C: incubar durante 10 minutos; secar y pasar a
D: incubar durante 2 minutos; secar y pasar a
E: incubar durante 2 minutos; secar y pasar a
F: incubar durante 10 minutos; secar y pasar a
G: incubar durante 2 minutos y secar al aire.
4. **Lectura:** se realiza comparando los resultados con la escala.

DETERMINACIÓN DE IgM E IgG POR ELISA (VIRCELL *Chlamydophila pneumoniae*)

Este método es una prueba inmunoenzimática indirecta para determinar y titular anticuerpos IgM e IgG frente a *Chlamydophila pneumoniae* en suero o plasma humano. El kit incluye 96 tests.

Muestra: suero sanguíneo o plasma refrigerado entre 2 y 8 °C.

Fundamento: El método de ELISA está basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. En el presente ensayo se utiliza antígeno COMP- *complexes of outer membrane proteins* - de *C. pneumoniae*, eliminando el LPS responsable de la mayor parte de las reacciones cruzadas con otras Chlamydias. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados, la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

Materiales: provistos por el kit incluye 96 test.

Técnica:

01. **Colocar** el número de pocillos necesarios para el suero que vamos a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero out off.
02. **Añadir** 100 µl de diluyente de la muestra, 5 µl de las muestras, 5 µl del control positivo, 5 µl del suero out off(en duplicado) y 5 µl del control negativo.
03. **Incubar** en estufa/baño durante 45 minutos a 37 °C.
04. **Realizar** 5 lavados con solución de lavado.
05. **Añadir** 100 µl de conjugado.
06. **Incubar** en estufa/baño durante 30 minutos a 37 °C.
07. **Realizar** 5 lavados con solución de lavado.
08. **Añadir** 100 µl de sustrato.
09. **Incubar** a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.
10. **Añadir** 50 µl de solución de parada.
11. **Lectura** espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

INTERPRETACIÓN: Positivo o Negativo.

OBSERVACION POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA(I)

Emplea anticuerpos monoclonales murinos marcados con fluoresceína; la evaluación final se realiza por microscopía de luz ultravioleta.

Materiales

- **Kit Reactivo Monoclonal de Chamydias conjugado FITC** purificado y estabilizado en buffer de fosfatos (pH 7,5), incluyendo colorante de contraste (Azul de Evans) y conservador (Azida de Na).
- **Líquido de montaje con inhibidor fotobloqueante** en solución PBS-Glicerol.
- **Portaobjetos con células conectivas murinas infectadas con *Chlamydias*** (como control positivo).
- **PBS** (Fórmula: ClNa 8 g - ClK 0,2 g - PO₄HNa₂ 1,15 g - PO₄H₂K0,2 g - agua destilada 1000 ml)
- **Microscopio de Epifluorescencia con filtro de 490 - 520 nm.** (lentes: ocular X10 objetivos de inmersión de X60 y X100).
- **Aceite para inmersión no fluorescente.**
- **Muestras por hisopado** de origen variado (oftálmicas, nasales y traqueales, éstas últimas obtenidas bajo el efecto de inducción anestésica)

Técnica

1. **PREPARAR** el portaobjetos con la muestra problema y el control positivo (fijado con acetona)
2. **APLICAR EL CONJUGADO** (25 µl) e **INCUBAR** en cámara húmeda a 37 °C durante 15 min.)
3. **LAVAR** en baño durante 5 min. y con agitación para eliminar el exceso de conjugado; **SECAR** al aire y a temperatura ambiente.
4. **APLICAR LÍQUIDO DE MONTAJE** en el centro del portaobjetos y **COLOCAR EL CUBREOBJETOS** evitando las burbujas de aire.
5. **OBSERVAR** en microscopio epifluorescente (previa aplicación de aceite para inmersión) con X 600 ó X 1000 totales.

RESULTADOS:

- a) **POSITIVO: PUNTOS LUMINOSOS VERDE BRILLANTE FLUORESCENTES.**
- b) **NEGATIVO:** la muestra debe permanecer **SIN FLUORESCENCIA.**

OBSERVACION POR INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA(II)

Utiliza Anticuerpos marcados con fluoresceína. **Se aplica a todas las especies de *Chlamydia*.**

Materiales

- **Kit reactivo monoclonal IMAGEN™ Chlamydia DAKO.**
- **Líquido de montaje**
- **Portaobjetos con células conectivas murinas infectadas con *Chlamydia*s (como control positivo)**
- **PBS**
- **Microscopio de epifluorescencia con filtro de 490 - 520 nm. Aceite para inmersión no fluorescente**
- **Muestras** obtenidas por hisopado.

Técnica

1. **Extender** en portaobjetos la muestra problema y el control positivo en un área no mayor a 6 mm. **Secar** al aire y **Fijar** con acetona.
2. **Aplicar** 25 µl de conjugado e **Incubar** en cámara húmeda a 37 °C por 15 min.
3. **Lavar** con PBS durante 5 min. **Secar** al aire a temperatura ambiente.
4. **Aplicar** el líquido de montaje y **Cubrir** con cubreobjetos evitando forma burbujas de aire.
5. **Observar** en microscopio epifluorescente con x 600 ó x1000 totales previa aplicación de aceite para inmersión.

RESULTADOS:

- a) **POSITIVO: PUNTOS LUMINOSOS VERDEBRILLANTE FLUORESCENTES.**
- b) **NEGATIVO: muestra SIN FLUORESCENCIA.**

INMUNOCROMATOGRAFÍA (CHLAMYDIA STAT-PAK)

Materiales:

- **Solución extractante**
 - Solución buffer no iónico
 - Azida sódica 0,1%

- **Control positivo (LPS Chlamydial)**

- **Unidad de reacción (Test card)**
 - Ac. monoclonales de ratón marcados con oro coloidal
 - Ac. policlonales de conejo anti-chlamydia
 - Ac. de cabra anti-ratón

- **Hisopos de dacrón estériles**

- **Tubos de extracción plásticos descartables**

- **Pipetas plásticas descartables**

Muestras:

Se obtienen por hisopado; si las muestras no se procesan inmediatamente, refrigerar entre 2° y 8 °C.

TIEMPO MÁXIMO DE REFRIGERACIÓN: 72 h

Técnica:

1. Extraer la muestra del hisopo con solución extractante durante 10 segundos e incubar 10 minutos.
2. Colocar gotas de la muestra extraída en el sitio correspondiente de la Unidad de reacción (Test card) empleando una pipeta plástica.
3. Colocar inmediatamente solución extractante en el sitio correspondiente a la misma Unidad de Reacción.
4. Dejar reaccionar entre 5 y 20 minutos.
5. Leer.
6. Realizar simultáneamente la técnica empleando un Testigo.

INTERPRETACIÓN: el resultado es positivo cuando se visualiza una banda de color **ROJO - LILA**

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

OBTENCIÓN DE ANTÍGENO CHLAMYDIAL (específico de grupo)

1. A partir de Saco vitelino inoculado

cosechar y homogenizar

suspender al 20 - 30 % en caldo corazón de buey o PBS (pH final 7,2)

llevar a ebullición durante 30 min. **Enfriar.**

Fenolar hasta concentración final del 0,5 %

2. A partir de un paciente

agitar el hisopo impregnado con LPS (lipopolisacárido) en medio de transporte (detergente en solución salina bufferada)

llevar a ebullición por 15 min. Y **enfriar.**

reagitar para aumentar la cantidad de sitios de combinación Ag / Ac disponibles por dispersión del antígeno.

Técnica:

El antígeno obtenido de la forma mencionada se enfrenta con el suero conteniendo anticuerpos clamidiales, siguiendo los pasos del método clásico por todos conocido.

INTERPRETACIÓN

Se considera que se trata de clamidiosis cuando la prueba es:

POSITIVA EN LA DILUCIÓN 1:8 O MAYOR

NEGATIVA CON EL SUERO CONTROL

**DIAGNÓSTICO
POR
BIOLOGÍA MOLECULAR**

DIAGNÓSTICO, IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE INFECCIONES POR *CHLAMYDIAS* MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El uso de metodologías de biología molecular como las de amplificación de ADN ha permitido mejorar notablemente las posibilidades de diagnosticar con certeza las infecciones por bacterias pertenecientes al orden ***Chlamydiales***.

En la literatura pueden encontrarse abundantes referencias acerca de diversas técnicas para la detección específica de alguna de las especies de bacterias pertenecientes a esta orden. Sin embargo, son pocas las diseñadas para la detección conjunta de varias especies sobre todo de aquellas de interés en salud animal y humana.

PCR convencional

En cuanto a técnicas de amplificación génica mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) la técnica de Sachse y col (1) permite la detección individual de infecciones por ***Chlamydia trachomatis***, ***Chlamydophila psittaci***, ***Chlamydophila pneumoniae*** y ***Chlamydophila pecorum***. El blanco molecular para la amplificación es el gen *omp1*. Este gen codifica para la proteína principal de membrana externa (MOMP) y posee 4 regiones variables y 4 constantes. La metodología consiste en una primera ronda de amplificación que utiliza los partidores que flanquean las regiones variables 3 y 4 (partidores 191CHOMP y CHOMP371 ver tabla 1). En una segunda ronda de amplificación se utilizan 6 partidores que producirán un producto de amplificación de distinto peso molecular según sea la especie involucrada.

El esquema de amplificación y los partidores a utilizar se describen a continuación:

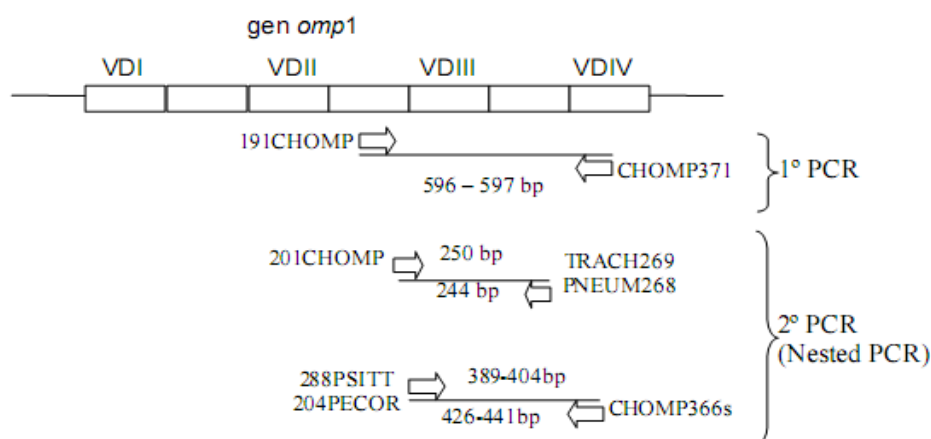


Tabla 1: Partidores para la detección de *Chlamydiae*

Nombre del Partidor	Secuencia ^a 5'>3'
191CHOMP	GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC
CHOMP371	TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC
201CHOMP	GGI GCW GMI TTC CAA TAY GCI CAR TC
CHOMP366s	CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT
218PSITT	GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG
TRACH269	ACC ATT TAA CTC CAA TGT ARG GAG TG
PNEUM268	GTA CTC CAA TGT ATG GCA CTA AAG A
201PECOR	CCA ATA YGC ACA ATC KAA ACC TCG C

^aNucleotidos degenerados: K=G,T; M=A,C; R=A,G; W=A,T; Y=C,T; I=Inosina

Real Time PCR

La técnica de PCR en tiempo real además de permitir la detección de la presencia o ausencia de especies de clamidias, también permite la cuantificación del agente en la muestra analizada y mediante la utilización de sondas especie-específicas marcadas con diferentes fluoróforos, investigar en una única reacción hasta cuatro especies de clamidias, y también detectar infecciones por más de una especie.

Otras metodologías

La tecnología de microarray de ADN permite explorar nuevas posibilidades que prometen ser beneficiosas para el diagnóstico enfermedades infecciosas. Estos ensayos permiten analizar muestras con un gran número de sondas de ADN simultáneamente. Estas sondas de ADN pueden derivar de fragmentos de genes polimórficos y/o de diferentes regiones genómicas; y la hibridación equivale a la secuenciación del sitio genómico en cuestión. Se han diseñado metodologías de microarray (chip de ADN) para identificar subspecies, serotipos o genotipos, y variantes genéticas de distintas especies de clamidias. Por lo tanto, test basados en la metodología de microarray permitirán obtener una resolución mayor que los basados en PCR. Si bien esta metodología se encuentra en etapas iniciales y carece aún de estandarización y validación internacional; su futura difusión y disponibilidad permitirá obtener resultados sensibles y específicos para la evaluación de un gran número de especies y tipos en un solo paso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acha, P. y Szyfres, B.: "Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales". Organización Panamericana de la Salud , Publicación Científica N° 503 - 2^{da} edic. - 1989.
2. Arumainayagam, J. T., Matthews,R., Uthayakumar, S, Clay, J. - "Evaluation of a novel Solid-Phase Immunoassay, clearview *Chlamydia*, for the rapid detection of *Chlamydia trachomatis*" - Journal of Clínica Microb., 28:2813-2814 - 1990.
3. Arráiz N, Ginestre M, Perozo A, Castellano GM, Urdaneta B, García GM. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado de Zulia, Venezuela. Rev Chil Infect; 24 (1): 48-52. 2007
4. Arráiz N, Marcucci R, Urdaneta B, Colina S, Romero Z. Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*. Rev Obstet Ginecol Venez; 68 (3): 195-201.2008
5. Bailey, R. y Scott, E. - "Diagnóstico Microbiológico" - 3^{ra} edic.- Edit. Panamericana - 1973.
6. Balows, A. y cols. - "Manual of Clínica Microbiology" - 5^{ta} edic.- American Society for Microbiology - 1991.
7. Bautista, E., Cesarone, M., Niedfeld, G., Basualdo JA.- "Infecciones por *Chlamydia trachomatis* biovar TRIC" Parte I - Infect & Microbiol Clin 7: 138-143. 1995.
8. Bautista, E., Cesarone, M., Niedfeld, G., Basualdo JA.- "Infecciones por *Chlamydia trachomatis* biovar TRIC" Parte II - Infect & Microbiol Clin 8:1-15. 1996.
9. Bisping, W. y Amtsberg, G. - "Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals" - Paul Parey Scientific Publishers - Berlín and Hamburg - 1988.
10. Burrows, W. - "Tratado de Microbiología" - Edit. Interamericana - 1975.
11. Beeckman DSA, Vanrompay DCG. Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydophila psittaci* strains in chicken macrophages. Vet Microbiol; 141 (3): 342-53. 2010
12. Beeckman DSA, Vanrompay DCG. Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective. C Clin Microbiol Infect;15 (1): 11-7. 2009
13. Caffarena R, Trenchi H, Capano F. Chlamydias. Actualización: Stanchi NO. Microbiología Veterinaria. Ed. INTER-MÉDICA. 2007 (ISBN 978-950-555-321-1)
14. Carter, G. - "Bacteriología y Micología Veterinarias, Aspectos Esenciales" -Editorial El Manual Moderno - 1985.
15. Chalmers, W.S.K. y col. - "Detection of *Chlamydia psittaci* from various animal species by reverse passive haemagglutination" - Vet. Microbiol. - vol. 15, n° 1-2, pp. 57- 64- 1987.
16. Chandler, E.A., Gaskell C.J., Hilbery, D.R. - "Medicina y terapéutica felinas" - De. Acribia - Zaragoza, España - 1990.
17. Chembio Diagnostic Systems (U.S.A.) - "*Chlamydia* Stat-Pak, Manual de Instrucciones".
18. Chemetron Argentina (Dako Diagnostics Ltd.) - "IDEIA™*Chlamydia*, Manual de Instrucciones".
19. Chemetron Argentina (Dako Diagnostics Ltd.) - "IMAGEN™*Chlamydia*, Manual de Instrucciones".
20. Coleman, P., Varitek, V., Mushahwar, I., Marchlewicz, B., Safford, J., Hansen, J., Kurpiewski, G., Grier, T.: "Test-Pack *Chlamydia*, a new rapid assay for the direct detection of *Chlamydia trachomatis*" - Journal of Clínica Microbiology,27: 2811-2814-1989.
21. Cowan, S. y Steel, K.- "Manual for the Identification of Medical Bacteria" - Cambridge at the University Press - Daniele Corsaro¹ and Gilbert Greub^{2*}. Pathogenic Potential of Novel .1965.
22. Daniele Corsaro¹ and Gilbert Greub^{2*}. Pathogenic Potential of Novel Chlamydiae and Diagnostic Approaches to Infections Due to These Obligate Intracellular Bacteria. Clin Microbiol Rev. April; 19(2): 283–297. 2006
23. Davis, B., Dulbecco, R. y cols. - "Tratado de Microbiología" - Salvat Editores -1983.
24. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* Assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Clin Infect Dis; 33: 492-503. 2001
25. De Vecchi, Aixa - "Nociones sobre animales de laboratorio" - Cátedra de Animales de Laboratorio - Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP - 1974.
26. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* Assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Clin Infect Dis; 33: 492-503. 2001
27. Eb, F. y col. - "Microimmunofluorescence typig of *Chlamydia psittaci*: Epidemiological interest" - Ann. Inst. Pasteur Microbiol - n° 1378, pp. 77-93 - 1986.

28. Ehret, J. M. - "Genital *chlamydial* infections" - *Clin. Lab. Med.*, 9:481-499 - 1989.
29. Everett, K. D. E., Bush, R. M. & Andersen, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 49, 415 - 440. 1999
30. Elmer Especialidades Veterinarias - "InmunoComb: Manual de Instrucciones" - 1995.
31. Ettinger, Stephen J. - "Tratado de Medicina Interna Veterinaria"(tercera edición)- Edit. Intermédica - Buenos Aires, Argentina - 1992.
32. Gupta, S. Camm, AJ.: "Chronic infection in the etiology of atherosclerosis – the case for *Chlamydia pneumoniae*." – *Clin. Cardiol* 20:10, 829-836- 1997.
33. Geisler WM. Diagnosis and management of uncomplicated *Chlamydia trachomatis* infections in adolescents and adults: summary of evidence reviewed for the 2010 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*; 53 (S3):S92-8. 2011
34. Gutiérrez J, Linares J, Camacho A, Palanca M, Maroto C, Ros E, et al. Descripción de inmunógenos de *Chlamydia pneumoniae* reconocidos por el suero de sujetos con enfermedad arterial periférica. *Med Clin (Barc)*.;126:721-2006.
35. Hanselaer, J.R. - "Chlamydial infection of the cat" - *Ann. Med. Vet.* - vol 133, nº 3, pp. 197-210- 1989.
36. Hargis, A.M. y col. - "Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats" - *Vet. Pathol.* - vol. 20, nº 2, pp. 170-178- 1983.
37. Hipp, S., Han, Y., Murphy, D. - "Assessment of enzyme immunoassay and immunofluorescence test for the detection of *Chlamydia trachomatis*" - *J. of Clinical Microbiology*, 25:1938-1943 - 1987.
38. Hume, C.W. - "The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals" - Ed. UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) - Edinburgh, Great Britain - 1976.
39. Horn M. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Ann Rev Microbiol*,62:113-131. 2008
40. Heinz E, Tischler P, Rattei T, Myers G, Wagner M, Horn M. Comprehensive *in silico* prediction and analysis of chlamydial outer membrane proteins reflects evolution and life style of the *Chlamydiae*. *BMC Genomics*, 10:634. 2009
41. Hadgu A, Dendukuri N, Wang D. Evaluation of Screenin2009g Tests for Detecting *Chlamydia trachomatis* Bias Associated With the Patient-infected-status Algorithm. *Epidemiology*; 23 (1): 72-82. 2012
42. Haider M, Rizvi M, Malik A, Azam M, Rabbani MU. Acute and chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *J Infect Dev Ctries*; 5 (8):580-6. 2011
43. Harkins AL, Munson E. Molecular diagnosis of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* in the United States. *ISRN Obstetrics and Gynecology*; Volume 2011, Article ID 279149, 17 pages. 2011
44. Hasan ZN. Association of *Chlamydia pneumoniae* serology and ischemic stroke. *South Med J*; 104 (5): 319-21. 2011
45. Kallestad Diagnostics - "*Chlamydia trachomatis* Direct Specimen, Manual de Instrucciones" - 1987.
46. Kellner, S.J. - "Eye injury by *Chlamydia psittaci* in cat" - *Kleintierpraxis* - vol. 33, nº 5, pp. 157- 160 - 1988.
47. Kirk, Robert W. - "Terapéutica veterinaria" - Ed. CECSA (Compañía Editorial Continental, S. A. de C.V.), México - 1984.
48. Kirk, R. W., Bonagura, J.D. - "Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales" -Ed. Interamericana de España y McGraw - Hill - 1994.
49. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic method. *Clin Infect Dis*44: 568-76. 2007;
50. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb.*; 13:1501-4. 1993
51. Linzitto OR, Tunes M. del L. - "Chlamydiosis animal" - Acta de IV Jornadas de la Asociación Argentina de Zoonosis y I Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias, págs. 1-4. 1994.
52. Linzitto OR. y col. - "El laboratorio en las Zoonosis - Técnicas diagnósticas para *Chlamydia psittaci*, *pneumoniae* y *trachomatis*" - Curso dictado 'a posteriori' de las IV Jornadas de la Asociación Argentina de Zoonosis y I Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias - Facultad de Cs. Médicas de la UNLP - La Plata, noviembre de 1994.
53. Linzitto OR, Tunes M del L - "Detección de Chlamydias en cuadros óculo-pulmonares en felinos domésticos" - Acta de I Congreso Argentino y I Congreso Latinoamericano de Zoonosis, pág. 88. 1995.

54. Linzitto OR, Tunes M del L, Heer E. - "Detección de LPS chlamydial en bovinos por el método de ELISA" - Acta de XI. Reunión Anual de la A.A.V.L.D, pág. 60. 1996.
55. Linzitto OR., Tunes M. del L.: "Chlamydias y síndrome de inmunodeficiencia adquirida" - Revista Quirón, ISSN 0326-2345 - N° 28, pp 64-66 - 1997.
56. Linzitto OR., Tunes M. del L, Formenti L, Menéndez, NA, Radman NE, Stornelli A. - "Detección de anticuerpos anti-Chlamydia grupo felino y anti-Toxoplasma gondii en gatos" - Acta de II Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias y I Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Prov. de Bs. Aires, pág. 77. 1997.
57. Linzitto OR., Tunes M. del L, Menéndez NA, Formenti L, Stornelli A - "*Chlamydia* spp. asociada a cuadros de queratoconjuntivitis bovina" - Acta de II Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias y I Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Bs. Aires, pág. 87. 1997.
58. Menéndez N A, Linzitto OR, Tunes M. del L, Piscopo M V. - "Chlamydiosis de las aves" - Acta de II Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias y I Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Bs. Aires, págs. 45-47. 1997.
59. Tunes M del L, Linzitto OR, Menéndez NA, Formenti L - "Detección de Chlamydias en felinos domésticos" - Acta de II Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias y I Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Bs. Aires, págs. 48-50. 1997.
60. Linzitto OR, Tunes M. del L, Formenti L, Radman NE - "Detección de *Chlamydophila* spp en gatos" - Acta de IV Taller Internacional de Infecciones por Clamidias en Humanos y Animales, pág. 8. - 2004.
61. Linzitto OR, Tunes M. del L, Formenti L, Radman NE. - "Detección de *Chlamydophila* spp en gatos" - Acta de I Congreso Bonaerense de Zoonosis, IV Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias de la Provincia de Buenos Aires, III Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Buenos Aires y II Jornadas de Medio Ambiente, Educación y Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires, pág. 67. 2003.
62. Linzitto OR, Tunes M del L, Radman NE, Orellana JS. - "Psitacosis: diagnóstico y medidas de control sanitario" - Acta de IV Taller Internacional de Infecciones por Clamidias en Humanos y Animales, pág. 11. 2004.
63. Linzitto OR, Tunes M del L, Romero JA, Radman NE, Recalde RJ, Orellana JS: "LPS ELISA en la detección de *Chlamydophila* spp. en abortos enzoóticos en animales sin sintomatología abortiva y riesgo zoonótico". Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. ISSN 0325-2957- Suplemento N° 3, 2006.
64. Linzitto OR: "*Chlamydia*, *Chlamydophila* y Rol Zoonótico". Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana - ISSN 0325-2957- Suplemento N° 3, 2006.
65. Linzitto OR, Tunes M del L, Recalde RJ: "*Chlamydophila abortus*: su asociación a problemas abortivos en ovinos y rol zoonótico". - Magazine postcongreso de Zoonosis pp. 21. 2008.
66. Linzitto, O. R., Cerdá, R. O., Menéndez, N. A., Tunes, M. del L., Formenti, L., Radman, N. E., Panettieri, G. - "Caracterización de *Chlamydia psittacii* y *Mycoplasma columbinum* en trastornos respiratorios en aves columbiformes" - Acta de II Congreso Argentino de Zoonosis, I Congreso Argentino y I Congreso Latinoamericano de Enfermedades Emergentes, (B 30) pág. 102. 1998.
67. Linzitto OR, Menéndez N A, Tunes M. del L, Formenti L, Piscopo MV. - "Investigación de *Chlamydia psittacii* en animales y humanos" - Acta de XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología del Mercosur y II Congreso Paraguayo de Microbiología (Asunción), pág. 138. 1998.
68. Linzitto OR, Tunes M. del L., Menéndez NA, Formenti, L., Radman NE, Piscopo MV., Credaro, C. - "Detección de Chlamydia grupo felino a partir de una afección óculo-pulmonar en felinos y su posible contagio en humanos" - Acta de XXI Congreso Chileno de Microbiología (Valdivia), pág. 17. 1999.
69. Linzitto OR, Tunes M. del L, Menéndez NA: "Chlamydiosis porcina: un nuevo frente zoonótico?" - Revista Quirón, ISSN 0326-2345 - N° 30, pp. 62-63, 1999.
70. Linzitto OR., Menéndez N A, Tunes M. del L, Formenti L, Piscopo MV, Radman NE - "Diagnóstico de Chlamydias en aves" - Acta de III Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias de la Provincia de Buenos Aires, II Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Buenos Aires y I Jornada de Medio Ambiente, Educación y Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires, pág. 80. 2000.
71. Linzitto OR, Tunes M. del L, Panettieri GA, Radman NE, Menéndez NA - "Detección de *Streptococcus bovis*/*Streptococcus gallolyticum* y Chlamydias spp. en palomas (*Columba livia*)" - Acta de III Congreso Argentino de Zoonosis y II Congreso Latinoamericano de Zoonosis. (CD). -2001.
72. Linzitto OR, Ventola R, Tunes M del L, Romero JA, Formenti L, Radman NE: "Detección de *Chlamydophila* spp en abortos enzoóticos ovinos". Acta Bioquímica Clin. Latinoamericana, ISSN 0325-2957. Suplemento N° 1, 2003.
73. Linzitto OR, Tunes M del L, Formenti LE, Radman NE: "Detección de *Chlamydophila* spp en gatos". Acta Bioquímica Clin. Latinoamericana. ISSN 0325-2957 - Suplemento N° 1 - 2003.

74. Linzitto OR., Tunes, M. del L. - "Psitacosis: diagnóstico y medidas de control sanitario" - Acta de I Congreso Bonaerense de Zoonosis, IV Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias de la Provincia de Buenos Aires, III Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Buenos Aires y II Jornadas de Medio Ambiente, Educación y Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires, pág. 65. - 2003.
75. Linzitto OR, Ventola R, Tunes M del L, Romero JA, Formenti L, Radman NE, Recalde RJ. - "Detección de *Chlamydophila* spp. en abortos enzoóticos ovinos" - Acta de I Congreso Bonaerense de Zoonosis, IV Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias de la Provincia de Buenos Aires, III Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Buenos Aires y II Jornadas de Medio Ambiente, Educación y Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires, pág. 66. - 2003.
76. Linzitto OR, Ventola R, Tunes, M del L, Romero JA, Formenti L, Radman N Magazine postcongreso de Zoonosis. 21-22 - 2008.
77. Loomis, w. p.; Starnbach, m. n. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. Current Opinion in Microbiology.; 5:8791. 2002
78. Miyairi I, Laxton JD, Wang X, et al. *Chlamydia psittaci* genetic variants differ in virulence by modulation of host immunity. J Infect Dis; 204 (4): 654-63. 2011
79. Nicolet, J. - "Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria" - Edit. Acribia - 1986.
80. Nystrom Rosander, C. Theilin S. Hjelm, E. Lindquist, O. Pahlson, C. Friman, G. High incidence of *Chlamydia pneumoniae* in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. - Scand. J Infect Dis., 29:4, 361-365 - 1997.
81. Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H, Fukushi H. Detection of *Chlamydophila psittaci* by using SYBR Green Real-Time PCR. J Vet Med Sci; 73 (2): 249-54. 2011
82. Olivares-Zavaleta N, Camody A, Messer R, Whitmire WM, Caldwell HD. *Chlamydia pneumoniae* Inhibits activated human T lymphocyte proliferation by the Induction of apoptotic and pyroptotic pathways. J Immunol; 186 (12): 7120-6. 2011
83. Ortiz Rodríguez E, Hechavarría Calderín CE, Ley Ng M, Álvarez Medina G, Hernández Ortiz Y. Estudio de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en pacientes infértiles y abortadoras habituales. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología; 36 (4): 573-84. 2010
84. Perez-Martinez JA. and Storz J, Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. Infect. Immun. 50: 905-910. 1985
85. Piazza D., Tobia M., Pracca G., Balague L., Stanchi N., Investigación de *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* en población femenina consultantes en clínicas ginecológicas. I Congreso Internacional de Infectología y Micro-bio-logía Clínica (SADI-SADE-BAC). III Congreso de Infectología del Mercosur. I Congreso de Infectología Pediátrica del Mercosur. I Congreso de Microbiología del Mercosur. 15-18 junio 1997.
86. Rodríguez Fermepin M, Mestre M, Ranea F, Saraví M, De Cristóforo MA, Planes N, De Torres R. "Prevalencia de anticuerpos contra *Chlamydia* en bovinos de la República Argentina" - Taller Internacional sobre infecciones por *Chlamydias* en humanos y animales - Asociación Argentina de Zoonosis - 1995.
87. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet; 2: 983-6. 1988
88. Stewardson A, Grayson ML. Psittacosis. Infect Dis Clin N Am; 24 (1): 7-25. 2010
89. Su WH, Tsou TS, Chen CS et al. Diagnosis of *Chlamydia* infection in women. Taiwan J Obstet Gynecol . 2011
90. Sachse K et al. - "Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections". - Vet. Microbiol. Mar 16; 135(1-2):2-21. 2009
91. Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R. - "DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp". Mol Cell Probes. 19(1):41-50. 2005
92. Shoshana L, Black C, Farshy C, Ossewaarde J, Barnes RC - "Enzyme Immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (Strain TWAR)" - Journal of Clinical Microbiology, 27: 2778-2783 - 1989.
93. Slatter, D - "Fundamentos de Oftalmología Veterinaria" (segunda edición) - Ed. Intermédica - Buenos Aires, Argentina - 1992.
94. Spears P Storz J- Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide Infect Immun. Apr;24(1):224-32. 1979
95. Stanchi N, Krakover R, Ferreras M, Perelstein S. Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* entre mujeres consultantes a un servicio ginecológico de un hospital público en argentina. I Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica (SADI-SADEBAC). III Congreso de Infectología del Mercosur. I Congreso de Infectología Pediátrica del Mercosur. I Congreso de Microbiología del Mercosur. 15-18 junio 1997.

96. Stanchi N, Krakover R, Ferreras M, Perelstein S, Piazza D, Tobia M, Pracca G, Balague L. Frecuencia de *Chlamydia trachomatis* entre mujeres consultantes a servicios de Ginecología de un Hospital Público y de Clínicas de Planeamiento Familiar. Taller Internacional sobre Infecciones Humanas y Animales, producidas por Chlamydias, Micobacterias, Brucelas y Borrelias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Buenos Aires. 25 de junio al 5 julio de 1997.
97. Tunes M. del L, Linzitto OR, Menéndez NA, Formenti L: " Chlamydiosis felina " - Revista Quirón, ISSN 0326-2345 - Nº 29, pp. 87-90 - 1998.
98. Tunes M. del L. - "Diagnóstico de Chlamydias por inoculación en embrión de pollo y en ratón blanco" - III Jornadas "El Laboratorio en las Zoonosis: Chlamydiosis animal y humana". 1999.
99. Tunes M. del L. - "Diagnóstico de Chlamydias por inmunocromatografía" - III Jornadas "El Laboratorio en las Zoonosis: Chlamydiosis animal y humana". - 1999.
100. Tunes M. del L. - "Titulación de inmunoglobulinas chlamydiales por inmunoensayo" - III Jornadas "El Laboratorio en las Zoonosis: Chlamydiosis animal y humana". - 1999.
101. Tunes M del L, Linzitto OR, Formenti LE, Menéndez NA, Radman NE. - "Diagnóstico de Chlamydias por inoculación en embrión de pollo". Acta del III Taller Internacional de Infecciones por Clamidias, Brucelas y Micobacterias en humanos y animales. (Cla 07) pág. 36. - 2000.
102. Tunes M del L, Linzitto OR, Menéndez NA., Formenti LE, Radman NE - "Chlamydiosis felina: diagnóstico inmunocromatográfico" - Acta del III Taller Internacional de Infecciones por Clamidias, Brucelas y Micobacterias en humanos y animales. (Cla 09) pág. 38. 2000.
103. Travería G, Linzitto OR, Tunes MdelL, Romero JA, Radman NE, Orellana JS, Recalde RJ. "*Chlamydophila* spp. en abortos en una explotación caprina". Acta de I Congreso Bonaerense de Zoonosis, IV Jornadas de Zoonosis Bacterianas y Parasitarias de la Provincia de Buenos Aires, III Jornadas de Enfermedades Emergentes de la Provincia de Buenos Aires y II Jornadas de Medio Ambiente, Educación y Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires, pág. 66. - 2003.
104. Tunes M del L, Linzitto OR, Menéndez NA, Formenti LE. "Detección de *Chlamydophila* spp. en gatos con problemas oculares y respiratorios". Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes, vol. 3 n 1. pp. 22-24. 2005.
105. Tunes M del L, Romero JA, Radman NE, Recalde RJ, Orellana JS: "LPS ELISA en la detección *Chlamydophila* spp en abortos enzoóticos, en animales sin sintomatología abortiva y riesgo zoonótico" - I Congreso Panamericano de Zoonosis, V Congreso Argentino de Zoonosis y II Congreso Bonaerense de Zoonosis - Resumen publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana - ISSN 0325-2957- Suplemento Nº 3, 2006.
106. Tunes M del L. - "Guías de Trabajos Prácticos de Microbiología" - Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP - 1981.
107. Uyeda C, Welborn P, Ellison-Birang N, Shunk K, Tsaouse B. - "Rapid diagnosis of chlamydial infections with Microtrak Direct test" - J. of Clinical Microbiology, 20:948-950 - 1984.
108. Weigler B, Baldok R, Girjes. AN, Carrick F, Lavin M - "Evaluation of an enzyme immunoassay test for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in free-ranging koalas (*Phascolarctos cinereus*) in southeastern Queensland, Australia" - Journal Wildl. Dis., 24: 259-263 - 1988.
109. Weigler B, Girjes A, White N, Kunst N, Carrick F, Lavin M - "Aspects of the epidemiology of *Chlamydia psittaci* infection in a population of koalas (*Phascolarctos cinereus*) in southeastern Queensland, Australia - Journal Wildl. Dis., 24:282-291 - 1988.
110. Wills JM y col. - "Prevalence of *Chlamydia psittaci* in different cat population in Britain" - J. Small Anim. Pract. - vol. 29, nº 6, pp. 327- 339 - 1988.
111. Wood M, Timms P. - "Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to *Chlamydia psittaci* in koalas" - Journal of Clinical Microbiology, 30: 3200-3205 - 1992.

CHLAMYDIA Y CHLAMYDOPHILA

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL LABORATORIO

Chlamydia y Chlamydophila son bacterias que poseen un ciclo de vida como parásitos intracelulares obligados en células eucariotas, lo que las convierte en parásitos energéticos. Desarrollan un ciclo de vida donde intercalan una forma infectante (corpúsculo elemental infeccioso) y cuerpo reticular (forma replicativa metabólica). Este libro pretende contribuir al conocimiento del microorganismos y sus métodos de diagnóstico.

ISBN 978-987-42-1728-8



9 789874 217288