

PSITACOSIS-ORNITOSIS

Francisco Cuello Gijón. Departamento de Patología Animal (Microbiología e Inmunología).
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

I. INTRODUCCIÓN.

A finales del siglo XIX ya se intuía la relación entre una enfermedad de pájaros exóticos, fundamentalmente loros, y neumonías en humanos que habían tenido contacto con tales aves. El papel que jugaban los microorganismos en la enfermedad, tanto en aves como en humanos, que en un principio fueron considerados virus, lo establecieron en 1930, Bedson, Western y Simpson.

Hace ya bastantes años que se sabe que el agente etiológico es *Chlamydia psittaci*, microorganismo que tiene una muy amplia distribución zoológica -se ha aislado de mamíferos, de más de 130 especies de aves, tanto domésticas como silvestres, de anfibios, y parece que hasta de peces y moluscos-, como geográfica -puede decirse que no hay lugar del mundo libre de esta bacteria y de sus actividades-, estando asociado a una gran diversidad de procesos patológicos.

Al objeto de calibrar en su justa medida la importancia de esta enfermedad, es necesario estudiar los datos referidos a prevalencia de la misma en diferentes países, y dado que se trata de una zoonosis, es igualmente importante detectar el nivel de infección entre las aves portadoras para establecer la relación entre el mismo y la presentación en la especie humana. La prevalencia exacta de la psitacosis-ornitosis no se conoce. Los casos relacionados con aves de jaula, su comercio, así como con la industria avícola, están bien documentados, pero en otros muchos el origen no es tan evidente, y no podemos excluir la posibilidad de inhalar aerosoles formados por pájaros de nuestras ciudades.

La evidencia concluyente de la prevalencia de este proceso, debe obtenerse por aislamiento de *C. psittaci* y mediante serología específica.

Es bien sabido que varias especies de aves pueden transmitir la infección al hombre, por lo que este es otro punto a investigar, ya que el estudio de la epidemiología de la infección clamidial, incluyendo el conocimiento e importancia de estas fuentes de infección para la especie humana, es fundamental para instaurar eficaces medidas de control, de hecho, el interés despertado en Gran Bretaña a principios de los '80, se debió al diagnóstico de un proceso clamidial adquirido en un matadero de patos.

La terminología relacionada con la clamidiosis aviar es algo confusa, de tal forma que el nombre de psitacosis se refiere a la infección en aves psitácidas y el de ornitosis al proceso en aves no psitácidas. A nuestro entender, tal distinción carece de sentido, y, desde luego, no es en modo alguno científica, debiendo referirnos a ambos procesos con el nombre de clamidiosis aviar, sobre todo teniendo en cuenta que una misma cepa de *C. psittaci* puede ocasionar enfermedad de forma natural en varias especies de aves y de mamíferos, por lo que no hay razón para asignar nombres diferentes a un mismo proceso aunque se presente en especies distintas.

La infección en la especie humana recibe el nombre de psitacosis-ornitosis, dependiendo del tipo de ave fuente de la infección, distinción innecesaria, ya que no se han establecido diferencias entre las cepas aisladas de uno u otro tipo de aves transmisoras; además, la fuente de contagio es muchas veces desconocida, y casi nunca confirmada. El mero uso de los términos psitacosis u ornitosis para referirse a la infección en el hombre, implica el conocimiento de la fuente de infección, y esto no parece

estar justificado. El término más apropiado para describir esta infección en la especie humana, sería el de clamidiosis humana de origen aviar.

II. ETIOLOGÍA.

II.1.- ¿Quién es *Chlamydia psittaci*?

Hasta el año 1971, la familia *Chlamydiaceae* formaba parte del Orden *Rickettsiales*; en ese año, Storz y Page, atendiendo a características bioquímicas y del ciclo de desarrollo, proponen la distinción entre clamidias y rickettsias, creando el Orden *Chlamydiales*⁽¹⁰⁶⁾. Con anterioridad, y debido a sus especiales propiedades (pequeño tamaño, incapacidad de crecer en medios inertes y parasitismo intracelular obligado), las clamidias se habían considerado durante mucho tiempo como virus o como microorganismos intermedios entre las bacterias y los virus, recibiendo diversas denominaciones, hoy día en desuso, como *Myxogamella*, *Bedsonia*, o grupo PLT (psittacosis-linfo granuloma-tracoma). La demostración de que su estructura es semejante a la de las células procariotas, que presentan un metabolismo activo que les permite multiplicarse por fisión binaria y su sensibilidad a algunos antibióticos, justifica su inclusión dentro de las bacterias.

La familia *Chlamydiaceae* comprende un único género, *Chlamydia*, que engloba a microorganismos caracterizados por presentar un parasitismo intracelular obligado, un ciclo de desarrollo con diferencias entre la forma infectiva y la forma reproductiva, una envuelta tipo Gram negativa sin el peptidoglucano convencional y un genoma de pequeño tamaño⁽⁸⁾. Page, en 1968, basándose en criterios morfológicos, bioquímicos, genéticos y de sensibilidad a los antibióticos, propuso su división en dos especies: *C. trachomatis* y *C. psittaci*⁽⁷⁵⁾. Más recientemente, se han propuesto dos nuevas especies: *C. pneumoniae* por Grayston y col. en 1989⁽⁴⁶⁾, a partir de estudios antigénicos, morfológicos y bioquímicos sobre cepas de *C. psittaci* que habían sido aisladas en Taiwan de un cuadro respiratorio agudo en humanos (cepas TWAR)⁽⁹⁹⁾ y *C. pecorum* por Fukushi e Hirai en 1992⁽⁴⁰⁾ basándose en diferencias de homología del ADN a partir de cepas de baja virulencia de *C. psittaci* aisladas de rumiantes, a las que recientemente se han añadido cepas de origen porcino^(42, 107).

C. trachomatis incluye la cepa de la neumonitis del ratón y hasta un total de 18 serotipos humanos, cuatro de ellos se asocian al tracoma (A, B, B_a y C) y el resto (D a K, D_a, I_a, L₁, L₂, L_{2a} y L₃) a procesos de transmisión venérea y conjuntivitis^(116, 117). Aunque se ha considerado la clamidia típicamente humana, se ha aislado de una infección intestinal inaparente en el cerdo⁽⁵⁹⁾.

C. psittaci, a diferencia de *C. trachomatis*, define a un grupo bacteriano muy heterogéneo, que se diferencia genéticamente, serológicamente y por el tropismo hacia un hospedador concreto. Esta especie posee una gran diversidad de hospedadores, desde invertebrados como moluscos y artrópodos⁽⁶⁴⁾, hasta aves y mamíferos, incluido el hombre, lo que provoca una gran variación intraespecífica entre los diversos serotipos^(5, 77). A modo general, las cepas de *C. psittaci* se clasifican en dos grandes grupos en función de su origen: cepas aviarias y cepas mamíferas. Dentro de estas últimas, adquieren una especial importancia las cepas procedentes de rumiantes, que se han clasificado en dos serotipos^(96, 97): serotipo 1, que se muestra como un grupo muy homogéneo mediante estudios genéticos^(28, 87) y antigénicos^(93, 101), incluyendo a cepas de alta virulencia⁽⁸⁶⁾, y serotipo 2, altamente heterogéneo genéticamente^(28, 87) y antigénicamente^(93, 94) y que incluye a cepas de baja virulencia⁽⁸⁶⁾.

Esta especie es un importante patógeno para el hombre, e incluso, a pesar de disponer hoy día de un potente arsenal terapéutico, la infección por este microorganismo puede tener un curso fatal fulminante.

C. pneumoniae es una especie patógena para el hombre en el que provoca cuadros de tipo neumónico⁽⁴⁶⁾. Se ha aislado de humanos con conjuntivitis y con faringitis. El primer aislamiento fue en 1965, a partir de un niño con conjuntivitis, en Taiwán (cepa TW-183); el primer aislamiento faríngeo lo fue en 1983 a partir de un estudiante universitario de Seattle con faringitis (cepa AR-39 *Acute Respiratory Disease*)⁽⁴⁷⁾ de ahí el nombre de cepas TWAR. Al principio se pensó que estos nuevos microorganismos eran *C. psittaci*^(47, 59). Actualmente, esta especie engloba a las cepas denominadas originalmente TWAR y es la especie clamidial transmitida por vía aérea más frecuente en la especie humana.

Además de neumonía, cuadro típicamente provocado por esta especie, se aísla también de broquitis. Aunque, al igual que *C. trachomatis* se ha considerado como típicamente humana, parece que se ha aislado también de una infección respiratoria equina⁽¹²³⁾. En esta especie no se han identificado reservorios aviares, siendo el contagio persona a persona. Sólo se ha definido una serovariedad.

C. pecorum, especie de reciente creación, engloba a cepas de baja virulencia y que proceden de aislamientos de rumiantes (muchas de ellas clásicamente englobadas dentro del serotipo 2 de *C. psittaci*^(94, 107)) y cerdos, con patologías de poliartrosis, encefalomielitis y enteritis de poca consideración, o incluso aisladas de animales sin patología aparente^(41, 107). Es una clamidia típicamente animal.

Las tres especies que afectan al hombre pueden causar procesos respiratorios, de hecho, las infecciones respiratorias por clamidias están rivalizando en protagonismo con las de transmisión sexual.

II.2.- Estructura antigénica.

II.2.1.- Antígenos de género.

Todos los miembros del género *Chlamydia* presentan una serie de antígenos comunes. El más importante es el LPS, que fue puesto en evidencia por Bedson en 1936 mediante la prueba de fijación del complemento. Se trata de un antígeno termoestable y que se puede extraer de la pared celular con éter o desoxicolato⁽³⁰⁾. En su composición química, además del lípido A, presenta 3 moléculas de ácido 3-ceto-2-desoxioctulosónico (KDO), pero a diferencia del LPS de otras bacterias Gram-negativas, el LPS clamidial carece del resto del corazón oligosacarídico y del polisacárido O⁽²³⁾. El LPS de *Chlamydia* presenta reacción serológica cruzada con los LPS de los mutantes Re de algunas enterobacterias (*Salmonella typhimurium* y *S. minnesota*⁽⁷⁴⁾). Mediante anticuerpos monoclonales se ha descrito la presencia de al menos 3 epítomos diferentes, uno correspondiente al lípido A, al que sólo se tiene acceso tras una hidrólisis ácida, otro común a las clamidias y a los mutantes Re y un tercero específico del género *Chlamydia*⁽²³⁾.

También se ha identificado un antígeno glicolipídico soluble de estructura y características físico-químicas diferentes a las del LPS pues no posee KDO, ni glucosamina ni tampoco los ácidos grasos normalmente asociados al lípido A⁽¹⁰⁸⁾. Este antígeno se ha localizado tanto sobre la inclusión como sobre la membrana citoplasmática de la célula hospedadora, siendo excretado en los medios de cultivo por las células infectadas por *Chlamydia*⁽¹⁰⁹⁾.

II.2.2.- Antígenos de especie.

Son los antígenos que se encuentran presentes en todos los miembros de una especie clamidial, y sólo en ellos, permitiendo así la diferenciación interespecífica dentro del género *Chlamydia*. Su sensibilidad al calor y a las proteasas parece indicar una naturaleza proteica, y la necesidad de aplicar detergentes no iónicos para solubilizarlos sugiere que estos antígenos se localizan preferentemente asociados a la membrana clamidial⁽⁹⁸⁾, estando algunos de ellos en la MOMP (proteína principal de la membrana externa). Son varios los antígenos de especie descritos en *C. trachomatis*, así como en *C. pneumoniae*, pero esto no es aplicable a *C. psittaci*⁽³⁴⁾ debido a la enorme variedad intraespecífica de la que hace gala, al gran abanico de hospedadores y a la diversidad de cuadros patógenos que produce, lo que hace prácticamente imposible una caracterización completa de sus antígenos específicos.

II.2.3.- Antígenos de tipo.

Son de gran importancia biológica, debido fundamentalmente al amplio espectro de cuadros patológicos que las especies clamidiales provocan, ya que un detallado estudio de estos antígenos podría explicar el porqué de los diferentes cuadros clínicos producidos y cuales son los epítomos claves para que una cepa sea más virulenta que otra de la misma especie, con una clara aplicación en la consecución de mejores vacunas contra estas infecciones. Estos antígenos son también de naturaleza proteica y se localizan en la membrana externa, permitiendo establecer en las especies de *Chlamydia* diferentes serotipos mediante técnicas de microinmunofluorescencia.

A causa de su importancia como patógena para la especie humana, *C. trachomatis* es la especie más estudiada, determinándose 18 serotipos diferentes^(116, 117), a los que hay que añadir la biovariedad productora de la neumonía del ratón, sin importancia patógena para el hombre⁽¹¹⁾. Según el cuadro clínico que provocan, estos serotipos se clasifican en:

- Inmunotipos A, B, B₂ y C, que corresponden a cepas oculares aisladas de zonas endémicas de tracoma.
- Inmunotipos D, D₂, E, F, G, H, I, I₂, J y K, que se corresponden con cepas aisladas de aparato genital y recto así como cepas que provocan la conjuntivitis de inclusión.
- Inmunotipos L₁, L₂, L_{2A} y L₃, que corresponden a cepas aisladas de pacientes con sintomatología de linfogranuloma venéreo.

Desde que *C. psittaci* fue reconocida como especie por Page en 1968, siempre ha surgido el problema de su serotipificación, ya que ésta agrupa a cepas antigénica y biológicamente muy diversas, lo que hace que los intentos de tipificarla de un modo similar a *C. trachomatis* hayan sido siempre muy parciales. En relación a las cepas aisladas de mamíferos, se han descrito un total de nueve inmunotipos diferentes⁽⁷⁷⁾: 4 serotipos en cepas procedentes de rumiantes (serotipo 1, que engloba a cepas abortivas^(96, 97), serotipo 2, que comprende a cepas procedentes de cuadros de poliartritis, conjuntivitis y neumonías^(96, 97) y dos serotipos más con cepas aisladas de heces), 3 serotipos para cepas porcinas, un serotipo para cepas felinas y otro para una cepa de cobaya.

Más recientemente, mediante sueros policlonales, las cepas de rumiantes han sido clasificadas en dos grandes grupos⁽¹⁰¹⁾: serotipos 1 y 2. Con anticuerpos monoclonales se ha comprobado que las cepas englobadas en el serotipo 1 son muy homogéneas desde el punto de vista antigénico⁽⁹³⁾, mientras que las cepas de serotipo 2 presentan una alta heterogeneidad antigénica^(93, 94), lo que también ha sido comprobado mediante análisis genético del gen de la MOMP por PCR⁽²⁸⁾ (reacción en cadena de la po-

limerasa) o del ADN total tras ser tratado con diferentes enzimas de restricción⁽⁸⁷⁾. En función de su virulencia, estas mismas cepas han sido clasificadas en dos grupos⁽⁸⁶⁾: un grupo, invasivas en ratón, que inducen infección en el bazo con esplenomegalia tras la inoculación subcutánea en la almohadilla plantar de una extremidad posterior. Estas cepas son aisladas principalmente de abortos y pertenecen al serotipo 1⁽¹⁰¹⁾. El segundo grupo, no invasivas en el modelo murino⁽⁸⁶⁾, son aisladas de procesos tales como poliartitis, neumonías y conjuntivitis así como de heces de animales aparentemente sanos, y se caracterizan porque el microorganismo permanece a nivel del ganglio poplíteo. Todas estas cepas pertenecen al serotipo 2⁽¹⁰¹⁾, y muchas de ellas ya han sido reclasificadas dentro de la nueva especie *C. pecorum*^(46, 41, 94, 107).

Si la tipificación de las cepas procedentes de mamíferos presenta problemas, éstos se multiplican en el caso de las cepas aviarias donde cada autor presenta una clasificación diferente. Los estudios más recientes mediante anticuerpos monoclonales indican que existen al menos cuatro inmunitipos⁽⁵⁾: psittácidas, palomo, pavo y pato, sin que el nombre del grupo sea excluyente de su origen. También se ha constatado la baja relación antigénica por debajo del nivel de género que existe entre estas cepas aviarias y las procedentes de mamíferos^(93, 94).

II.3.- Biología de Chlamydia. Ciclo de desarrollo.

II.3.1.- Generalidades.

Las clamidias no pueden crecer fuera de las células hospedadoras ya que necesitan obtener de ellas los compuestos de alta energía y los intermediarios metabólicos de bajo peso molecular para la síntesis de sus propios ácidos nucleicos y proteínas⁽⁷¹⁾. Estas especiales características determinan la existencia de un ciclo intracelular que no encontramos en ningún otro procarionta, y que se puede dividir en tres fases⁽⁶⁶⁾.

- Penetración de la forma infecciosa o cuerpo elemental (CE) en la célula hospedadora, seguido de su transformación en forma metabólicamente activa o cuerpo reticular (CR).
- Multiplicación del CR mediante fisión binaria, produciendo una microcolonia o inclusión citoplasmática.
- Conversión de los CR en CE y posterior liberación de la célula hospedadora.

El CE tiene forma esférica, con un diámetro de 200-400 nm, apreciándose en su interior un nucleoide electrodenso con numerosos ribosomas, además de material amorfo moderadamente electrodenso⁽⁸⁹⁾. Está rodeado por una doble envoltura trilaminar, una interna o membrana citoplasmática y otra externa que corresponde a la pared celular bacteriana⁽³³⁾. Esta pared celular presenta una composición química parecida a la de las bacterias Gram negativas, si bien carece de ácido murámico o su contenido es muy escaso, pero contiene una gran cantidad de proteínas (proteína principal de la membrana externa, MOMP) ricas en aminoácidos azufrados que forman numerosos puentes disulfuro, y que son los responsables de su rigidez y escasa permeabilidad⁽⁷²⁾. Esto hace que el CE sea estable en el medio extracelular, presentando cierta resistencia a diversos agentes físico-químicos. Constituye la forma infectiva, pero metabólicamente es una forma inactiva incapaz de replicarse por división^(8, 94).

El CR, de mayor diámetro, 800-1500 nm, es la forma intracelular, no infectiva y metabólicamente activa⁽⁸⁾. Está rodeado de una pared más fina y más frágil que la del CE con una membrana citoplasmática no muy bien definida. La estructura interna tiene un aspecto granular, debido al desenrollamiento del ADN y al mayor número de ribosomas presentes⁽³³⁾. El contenido en ARN de los CR es cuatro veces superior al de los CE, lo que demuestra una intensa actividad biosintética. Se ha demostrado que los CR pueden sintetizar ciertas proteínas independientemente de la célula hospedadora⁽³⁾, e

incluso libre de la misma, si se les asegura un aporte adecuado de ATP exógeno⁽⁵⁰⁾. El CR es una forma sensible y frágil, incapaz de sobrevivir en el medio externo⁽⁸⁾.

Una forma intermedia entre ambas estructuras es el cuerpo intermedio (CI), que morfológica y estructuralmente representa un estadio de transición en la condensación del CR para originar el CE⁽⁶⁾. El CI es una estructura diferenciable morfológicamente más que fisiológicamente, y al microscopio electrónico manifiesta una pared celular nítida como consecuencia del inicio de la polimerización de los monómeros de la MOMP, así como un nucleóide denso a los electrones⁽⁷¹⁾.

II.3.2.- Adhesión a la célula hospedadora.

Para que se realice la fagocitosis de *Chlamydia* es necesario que se haya producido con anterioridad la adhesión⁽⁷²⁾, poniéndose de manifiesto múltiples mecanismos que favorecen esta unión, lo que nos hace entender la adhesión no como un suceso único sino como un proceso favorecido por múltiples factores.

La adición de policationes tales como el DEAE-dextrano (dietilaminoetil-dextrano) a un cultivo celular aumenta su sensibilidad a la infección clamidial⁽⁶³⁾. Mediante estudios de microscopía electrónica con policationes de ferritina⁽¹⁰⁰⁾ se ha comprobado la unión específica de éstos alrededor de la membrana clamidial, lo que indica que esta estructura está cargada negativamente. También se han encontrado interacciones hidrófobas implicadas en la adhesión a la célula mediante el lipopolisacárido (LPS), que actuaría como hemaglutinina al ligarse a los glóbulos rojos de ratón y conejo⁽¹¹⁸⁾. Por otro lado, se sabe que en el contacto inicial de la bacteria con su célula hospedadora se encuentran involucrados ciertos receptores termolábiles en las clamidias, y un receptor sensible a la tripsina en la célula hospedadora^(21, 49, 54). La pared juega un papel muy importante en este mecanismo de adhesión⁽²²⁾, como lo demuestra el hecho de que fragmentos de pared de CE se adhieren y son fagocitados por las células con la misma facilidad que CE completos. También se ha considerado a la MOMP como participante en la adhesión a la célula, dada su abundancia en la pared celular clamidial y por la inhibición de la adhesión producida tras el tratamiento con anticuerpos monoclonales específicos de esta proteína⁽¹¹⁰⁾.

II.3.3.- Fagocitosis de las clamidias por la célula.

El hecho de que determinadas líneas celulares puedan adherir clamidias pero no fagocitarlas sugiere que ambos procesos tienen diferentes mediadores⁽⁶⁵⁾. Las clamidias son fagocitadas por células fagocíticas no específicas con más facilidad que otras bacterias como *E. coli* o partículas de latex⁽²²⁾, lo que indica la existencia de estructuras específicas en la bacteria encaminadas a favorecer el proceso fagocítico. Es de destacar que este proceso no es interferido por la citocalasina B, inhibidor de la fagocitosis clásica^(79, 111).

La ingestión del microorganismo por la célula es un proceso que requiere un gasto energético⁽⁷²⁾. Tras esta ingestión, y si la célula es permisiva (células epiteliales, fibroblastos), no se produce la fusión fagosoma-lisosoma^(37, 114) o se realiza en fases más tardías del ciclo, afectando a un porcentaje muy bajo de inclusiones^(79, 98), de forma que la secuencia más habitual en los procesos fagocíticos, que culmina con la destrucción del microorganismo fagocitado, no tiene lugar en el caso de *Chlamydia*⁽⁷²⁾. Parece ser que un factor presente en la superficie de los CE, sensible al calor y ausente en la superficie de los CR, es el responsable de la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas que contienen a las clamidias. Este factor modificaría la membrana de la vacuola tras la penetración del microorganismo en la célula hospedadora, manteniéndose esta modificación tras la reconversión de CE a CR⁽³⁷⁾ ya que al infectar un cultivo de células simultáneamente con *C. psittaci*, *E. coli* y *Sacharomyces cerevisiae*, se observó que solamente se inhibía la fusión entre fagosoma y lisosoma en aquellas vacuo-

las fagocíticas que contenían clamidias. Una excepción a estos procesos es el comportamiento de los polimorfonucleares, que son las células más importantes en la defensa orgánica ante la infección clamidial, donde sí se ha detectado la presencia de fagolisosomas⁽⁸⁰⁾.

Los acontecimientos posteriores a la entrada del microorganismo y su inclusión en el fagosoma dependen básicamente del grado de multiplicidad de infección (MI) o número de clamidias que penetran por célula, ya que si ésta es muy alta (100:1), la supervivencia de las clamidias en células tales como macrófagos peritoneales de ratón se reduce considerablemente comparada con la hallada con una MI más baja (10-50:1), a causa de la gran mortalidad inicial producida en las células, fenómeno que se denomina citotoxicidad inmediata^(98, 125). Con valores medios de MI no se observa este efecto tóxico y las clamidias pueden reproducirse con normalidad hasta el final del ciclo. Si la MI es muy baja (1-2:1), la célula invadida puede incluso dividirse y dar lugar a células hijas, infectadas o no.

II.3.4.- Multiplicación de las clamidias en la célula.

Los primeros fenómenos detectables en la reorganización de CE a CR, tras la formación del fagosoma, son el inicio de la síntesis proteica y la transformación de la MOMP de su forma polimérica a monomérica, con lo que aparecen poros de un tamaño adecuado para el paso de los nucleótidos transportadores de energía⁽⁹⁾. Tras estos sucesos iniciales, a las 12 horas post-infección todas las clamidias intracelulares están en forma de CR⁽⁷²⁾, que se divide por fisión binaria sin una aparente septación⁽³⁵⁾, de forma que la segregación del nucleóide se realiza por separación en dos zonas de baja densidad a los electrones, conteniendo material fibrilar⁽⁷¹⁾. En esta etapa se produce un crecimiento exponencial del número de clamidias, que dura de 12 a 20 horas, tras lo cual comienza la reorganización de los CR a CE⁽⁷²⁾, fenómeno éste que no es sincrónico, apareciendo en las inclusiones CR en reproducción junto a CE maduros. De manera semejante al inicio del ciclo, el paso de CR a CE viene marcado por los cambios ocurridos en la MOMP, pasando ésta de su forma monomérica a la polimérica, con la formación de gran cantidad de enlaces disulfuro⁽⁷³⁾. La reproducción clamidial en el interior de la célula no termina realmente hasta la lisis de ésta, normalmente a las 48-72 horas, aunque *C. psittaci* y las cepas de linfogranuloma venéreo lisan a las células más rápidamente que las cepas de tracoma⁽⁷²⁾, liberándose al exterior entre 10 y 1000 CE, dependiendo de factores como la cepa clamidial, línea celular hospedadora y condiciones de cultivo⁽⁷¹⁾.

II.3.5.- Liberación de las clamidias.

El mecanismo de liberación no se conoce aún con exactitud. Generalmente las clamidias son detectadas extracelularmente tras la lisis de la célula hospedadora, lisis que se produce como consecuencia de la liberación tardía de enzimas lisosomiales⁽¹¹⁴⁾ así como por la acción de una proteasa de origen clamidial⁽¹⁰⁴⁾. Sobre el animal, además de este mecanismo, al menos en cepas de origen intestinal (de baja virulencia) se ha demostrado la existencia de otros dos mecanismos de liberación de las clamidias, uno por expulsión de células infectadas intactas a la luz intestinal, y otro por la liberación de pequeñas colonias clamidiales rodeadas de una membrana citoplasmática⁽⁶⁴⁾. En este caso, la bacteria es liberada⁽¹¹⁵⁾ por exocitosis sin que suponga la lisis de la célula.

El hecho de que las clamidias puedan permanecer en el interior de la célula como agente infecciosos latentes o persistentes, parece jugar un importante papel en la interacción con el sistema inmunitario del hospedador, y podría explicar⁽⁶⁵⁾ las recidivas en las clamidiosis crónicas y la dificultad de la eliminación total del microorganismo.

III. ACCIÓN PATÓGENA.

La acción patógena de estas bacterias origina, con elevada frecuencia, la aparición de infecciones latentes, inaparentes o crónicas, situación bien conocida en la psitacosis y otras infecciones de mamíferos, en los que el microorganismo parasita células del sistema retículo endotelial del intestino, aparato respiratorio, serosas, SNC y placenta. Incluso a nivel laboratorio, se presentan infecciones persistentes en una pequeña fracción de las células infectadas, que soporta el crecimiento de *C. psittaci* durante varios ciclos, sin manifestar daño celular.

Las diferentes cepas clamidiales varían en su virulencia, de forma que las aisladas de aves psitácidas son, en general, más virulentas que las aisladas de no psitácidas, y entre estas, las cepas de pavo son más virulentas para el hombre que las de otras aves.

III.1.- Clínica.

Aunque la clamidiosis aviar clínica existe, tanto en pájaros de jaula como en aves con interés industrial (las gallinas sólo se infectan ocasionalmente, y ocas y patos con muy poca frecuencia), así como en aves silvestres, hay que tener muy en cuenta, y es un aspecto de indudable interés epidemiológico, que el carácter distintivo que marca la relación *Chlamydia*-hospedador, es la latencia, lo que da origen a portadores asintomáticos que eliminan el microorganismo, fundamentalmente a través de las heces, y que ante situaciones de estrés de diversa índole (cambios en la alimentación, el manejo, competiciones, transporte, enfermedades intercurrentes, climatología adversa, etc) puede aparecer una forma clínica a veces bastante grave.

El estado de latencia en un colectivo, se produce como consecuencia de un equilibrio entre el hospedador no tratado y el microorganismo. Si se trata, el hospedador se vuelve susceptible, tanto a la cepa original como a nuevas cepas de *Chlamydia*, de forma que aves que han sido sacadas del colectivo y tratadas, a menudo mueren cuando vuelven y se reinfectan a partir del colectivo no tratado⁽⁵²⁾.

La sintomatología de la clamidiosis aviar, por tanto, puede variar desde completamente ausente a extremadamente severa, pasando por formas muy benignas; a veces es la enfermedad aparecida en personas en contacto con las aves, la primera indicación de que estas están subclínica o latentemente infectadas.

La sintomatología más frecuente en aves enfermas⁽⁵¹⁾, es un exudado ocular y/o nasal serosopurulento, acompañado de pérdida de apetito e inactividad. Es frecuente la diarrea con excretas amarillo-verdosas y de consistencia gelatinosa, que pueden estar teñidas de sangre. Puede apreciarse fiebre, y si la enfermedad progresa, aparece sintomatología respiratoria. Hay disminución de la producción.

La tendencia normal es hacia una mejoría parcial seguida de una recaída, a manera de ciclos, durante algunas semanas. Sin embargo, en los casos agudos, la muerte se produce rápidamente con muy poca sintomatología. Los casos crónicos se caracterizan por una severa emaciación. La morbilidad oscila entre el 5 y el 80% y la mortalidad puede llegar al 30%.

Las lesiones encontradas en el examen anatomopatológico macroscópico, dependen de la evolución de la enfermedad, del grado de agudeza con que se ha presentado.

Típicamente se observa congestión pulmonar con exudado en cavidad pleural, los sacos aéreos pueden estar muy adelgazados y la membrana pericárdica igualmente adelgazada y congestiva, a menudo cubierta de exudado fibrinoso. El hígado y bazo están aumentados de tamaño y decolorados, con

bordes redondeados, petequias y pequeños focos necróticos. Un exudado purulento puede cubrir las superficies serosas y el conducto biliar está frecuentemente obstruido y aumentado de tamaño.

En la especie humana, el proceso, tras un periodo de incubación de 1-2 semanas, pero que puede alargarse hasta un mes, comienza a veces de forma insidiosa, con malestar y dolor en los miembros, pero con más frecuencia su comienzo es repentino, con fiebre alta, rigidez y dolor de cabeza. Generalmente hay tos pero con poca expectoración y la disfunción respiratoria es rara salvo en casos graves. Típicamente el número de pulsaciones es bajo en comparación con la temperatura (unas pulsaciones elevadas son consideradas por algunos como de mal pronóstico). El examen radiológico pone de manifiesto una extensa neumonitis, sin embargo, la exploración externa muestra pocas o ninguna señal de consolidación. No es rara la epistaxis, así como la presencia de exantemas cutáneos semejantes a los del tifus. Puede haber esplenomegalia y a veces signos evidentes de una franca hepatitis.

Los casos graves se acompañan de meningitis o meningoencefalitis, miocarditis y, más raramente, endocarditis. En la fase aguda el recuento globular es con frecuencia normal, pero la leucopenia es evidente en un 25% de los casos.

En pacientes que se recuperan sin tratamiento, la infección se resuelve lentamente a las 2-3 semanas o a veces más tiempo, aunque pueden ser eliminadores de *Chlamydia* durante periodos bastante largos.

Los pacientes afectados gravemente, pueden presentar somnolencia y abatimiento, si se encuentra afectado el SNC. La muerte es consecuencia de la insuficiencia cardiovascular y respiratoria; esta muerte tiene a veces las características de una grave toxemia.

En la autopsia es constante la presencia de neumonitis generalizada con zonas de consolidación. Los alvéolos están rellenos de exudado con eritrocitos, y las células alveolares están típicamente hinchadas. El bazo se encuentra aumentado de tamaño, muestra pérdida de su arquitectura normal y en el hígado pueden verse áreas de necrosis focal. Hay también signos de inflamación en meninges y congestión del parénquima cerebral.

IV. EPIDEMIOLOGÍA.

Sin entrar en los aspectos clínicos ni económicos derivados de la clamidiosis aviar, hemos de decir que este proceso infeccioso tiene un importancia sanitaria grande, derivada del hecho de su reconocimiento como zoonosis, y que, debido a sus características pizootiológicas, justifica su inclusión en la lista de zoonosis profesionales, afectando a todos aquellos cuyo trabajo se desarrolla en estrecho contacto con las aves, sobre todo criadores, matarifes, veterinarios, biólogos, etc. La clamidiosis aviar es pues, una enfermedad con un gran peso en salud pública, a causa de las serias secuelas que puede dejar en el hombre.

La infección clamidial es cosmopolita entre las aves, pues afecta a más de 130 especies domésticas o silvestres, entre las que los palomos, patos y pavos destacan por la importancia económica que en ellos alcanza la enfermedad, y por el potencial peligro que representan en cuanto a la transmisión del agente infeccioso a la especie humana. *C. psittaci* puede igualmente ser transmitida por aves de compañía a sus propietarios, siendo estas las que representan un mayor riesgo para los humanos. De hecho, el creciente comercio de aves exóticas hace que la frecuencia de clamidiosis aviar, lejos de disminuir, se encuentre en aumento, lo que hace necesario tomar medidas de control de estas aves, evitando el comercio ilegal de las mismas, pues este incremento de la clamidiosis aviar tiene como consecuencia un paulatino aumento de los casos humanos.

En un estudio realizado en EEUU a principios de los '70 sobre las posibles fuentes de infección de la clamidiosis humana por Duffee y Moore⁽³¹⁾, de los 105 casos estudiados, prácticamente el 100% eran de origen aviar, siendo los periquitos y palomos la fuente de infección más probable. Es de destacar en este estudio que, mientras que en el caso de los periquitos, los casos de infección se detectan principalmente entre los propietarios de los mismos, por lo que se refiere a los palomos, la mayoría de los casos corresponden a personas que ocasionalmente contactaban con ellos, con sus excrementos o, incluso, que residían en las proximidades de palomares, lo que tiene un indudable interés epidemiológico. En este estudio también se mencionan a loros, canarios, pollos, pavos y patos como transmisores comprobados del proceso, aunque en menor proporción. En el caso de los palomos, nosotros⁽⁹⁰⁾ hemos detectado un 35.9% de positividad por ELISA, y es relativamente frecuente el aislamiento de *Chlamydia* a partir de muestras fecales sin que exista una situación patológica clara.

En ocasiones, y debido a una de las principales características de la clamidiosis aviar, como es la gran frecuencia con que se presentan las infecciones inaparentes, no se puede detectar el vector aviar responsable de la infección en el hombre.

Aunque el tema de esta ponencia es la psittacosis-ornitosis, la realidad es que la clamidiosis humana a *C. psittaci* no sólo reconoce a las aves como fuente de contagio, sino que los mamíferos también pueden transmitir esta bacteria, y de hecho lo hacen, bien es verdad que en menor proporción y en casos más aislados y concretos aunque no por ello con menor gravedad.

El papel de las aves como fuente de infección humana por *C. psittaci* está bien reconocido, pero se han descrito algunos casos de transmisión de este microorganismo al hombre, en el que los mamíferos, especialmente ovinos, están directamente implicados. Así, Giroud estableció ya en 1956⁽⁴³⁾ la relación entre aborto caprino por este microorganismo y aborto humano, llamando la atención en posteriores trabajos, sobre el papel de *Chlamydia (Neorickettsia)* en abortos y patología neonatal humana. A partir de estas primeras notificaciones, no han cesado los trabajos en los que se señala el riesgo que, para las mujeres gestantes, supone el contacto con ovinos o caprinos, pues *C. psittaci* muestra un especial tropismo por el trofoblasto humano, en el que se multiplica dando lugar a una intensa respuesta inflamatoria aguda, que es la causa de la muerte fetal por anoxia⁽¹²¹⁾. También es posible la infección humana a partir de conjuntivitis felina por *C. psittaci*.

IV.1.- Transmisión.

La transmisión de *C. psittaci* entre ovinos y caprinos está asegurada a partir de animales enfermos o portadores asintomáticos, bien por las envueltas fetales en caso de aborto (proceso más importante en estas especies debido a este microorganismo), o por las heces en el caso de animales portadores, sugiriéndose la posibilidad de transmisión venérea.

Las relaciones y los ciclos epizootiológicos entre las aves y los mamíferos son numerosos, describiéndose la infección de caballos⁽⁶⁸⁾ y cerdos e incluso jabalíes⁽¹¹⁹⁾, transmitida por aves silvestres portadoras que picoteaban los ectoparásitos de estos mamíferos, entre las que destacan los estorninos⁽⁸²⁾, gorriones⁽⁷⁶⁾, mirlos⁽⁸⁹⁾, tórtolas⁽⁴⁸⁾ y palomos⁽⁹⁰⁾, que raramente padecen la enfermedad, pero que son portadores inaparentes de ciertas cepas que causan infección en mamíferos⁽⁵⁸⁾.

También se han descrito contagios entre aves silvestres y de corral, concretamente entre estorninos y pavos⁽⁴⁴⁾, con la intervención de un mamífero como vector u hospedador intermediario, la rata. Entre las aves, la transmisión puede darse mediante aerosoles, por vía transovárica, por introducción de

aves infectadas o por contacto con aves silvestres y por picadura de ácaros o piojos y por ingestión de productos contaminados.

Las aves silvestres juegan un importante papel como reservorios para otras aves, mucho más que como fuente de infección para el hombre.

Pocas son las referencias existentes de ciclos de transmisión de la enfermedad de mamíferos a aves de corral. Se ha estudiado el contagio de pavos que se encontraban en estrecho contacto con ovejas infectadas por *C. psittaci*.

La transmisión al hombre⁽⁵¹⁾ se realiza mediante aerosoles contaminados. La infección puede ocurrir por manejo de aves latentemente infectadas, enfermas o muertas, o de sus productos: plumas, heces, secreciones nasales, vísceras. La inhalación de aire contaminado, particularmente en espacios cerrados, puede dar lugar a infección, aunque las ocasiones de adquirir una clamidiosis de origen aviar a través del contacto con aves de vida libre o con sus ambientes, son pocas. Se han señalado casos de infección por picaduras, pero en tales circunstancias parece imposible excluir la posibilidad de infección por inhalación.

Aunque la ingestión es vía habitual de contagio en aves y mamíferos (bovinos, ovinos y caprinos), en la especie humana no se han descrito casos de infección por ingestión de carne o vísceras de aves infectadas. Los artrópodos no han sido implicados en casos de infección humana, aunque ácaros y piojos asociados con aves, pueden, como se ha demostrado, albergar al microorganismo.

La transmisión de persona enferma a sana es un hecho controvertido, habiendo autores que niegan tal posibilidad⁽⁵²⁾ mientras que otros⁽⁴⁵⁾ confirman este mecanismo de transmisión directa, si bien este mecanismo habría de ser reconsiderado a la vista de la situación taxonómica actual, con la especie *C. pneumoniae* en el escenario; lo cierto es que las citas que indican este modo de transmisión, son anteriores a 1989, fecha del "nacimiento" de esta especie, por lo que podemos pensar que en realidad se trata de infecciones por *C. pneumoniae*, especie que como hemos indicado, estaba considerada como integrante de *C. psittaci*.

V. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico correcto de los procesos respiratorios es de indudable importancia, ya que la mayoría de los antibióticos son totalmente ineficaces, y las sulfamidas sólo lo son frente a *C. trachomatis*, por lo que es importante la diferenciación entre las especies, ya que el modo de transmisión es distinto para cada una, y por tanto, las medidas profilácticas a tomar serán también diferentes.

Puesto que la clínica apenas nos dice nada específico, y los datos epidemiológicos, muchas veces no son bien conocidos o son ambiguos, hemos de recurrir al diagnóstico laboratorial, que en la clamidiosis se puede dividir en dos grandes apartados:

- **Diagnóstico directo:** se trata de poner en evidencia la presencia de *Chlamydia* en un tejido o en un exudado; en este apartado se incluye el cultivo del germen, la bacterioscopia, las técnicas inmunológicas denominadas directas así como las modernas de amplificación del ADN (PCR).

- **Diagnóstico indirecto:** consiste en detectar la respuesta inmunológica provocada en el animal ante la infección por *Chlamydia*; en este apartado se encuentran las distintas pruebas serológicas.

V.1.- Diagnostico directo.

En este tipo de diagnóstico, que tiene su aplicación fundamental en animales enfermos, es de gran importancia la calidad de las muestras a examinar, por lo que si no se va a realizar el aislamiento de forma inmediata se deben conservar las muestras a -20°C o mejor a -70°C, ya que el poder infeccioso de *Chlamydia* disminuye rápidamente⁽³³⁾.

V.1.1.- Bacterioscopia mediante tinción.

Tiene su fundamento en la observación de los microorganismos en extensiones a partir de exudados o de órganos afectados, generalmente cotiledones de una placenta procedente de un aborto. Sobre los frotis se realizan tinciones específicas de *Chlamydia*; las más utilizadas normalmente son las modificaciones de la técnica de Ziehl-Neelsen como las propuestas por Macchiavello, Stamp, o Giménez. Todas estas técnicas tienen como colorante principal la fucsina fenicada y como colorante de contraste el verde malaquita o el azul de metileno, realizándose la decoloración con un ácido débil (ácido acético o cítrico) muy diluido. Con esta tinción se observan las clamidias de color rojo sobre fondo verde o azul. El inconveniente de estos métodos tintoriales es su baja sensibilidad, existiendo un alto porcentaje de falsos negativos cuando la concentración del microorganismo es baja, a pesar de lo cual, en algunas ocasiones la primera observación con alguna de estas tinciones permite emitir un diagnóstico al menos presuntivo, hasta el momento de certificarlo con el aislamiento del germen.

La tinción de May-Grünwald Giemsa⁽³³⁾ presenta la ventaja de proporcionar información sobre la composición y procedencia de las células del frotis, así como sobre la morfología de la inclusión. Las clamidias se observan formando una inclusión más o menos densa en el interior de la célula con una tonalidad fuertemente basófila sobre un citoplasma acidófilo.

V.1.2.- Técnicas inmunológicas directas.

Se trata de una serie de técnicas que van a reconocer la presencia de antígenos clamidiales, tanto en tejidos como en exudados, revelando posteriormente la reacción inmunológica ya sea mediante una molécula fluorescente o una enzima y su sustrato. La más extendida de estas técnicas es la inmunofluorescencia directa (IFD), que ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis* en el hombre⁽²⁴⁾, siendo una técnica de gran sensibilidad, superando en algunos casos a los métodos de aislamiento y cultivo⁽¹¹²⁾. Sus desventajas son que es una técnica mucho más compleja en su realización que la bacterioscopia tintorial y que es necesario contar con un microscopio de luz ultravioleta. Esta técnica se ha perfeccionado en gran medida, merced a la utilización de anticuerpos monoclonales.

Las técnicas de inmunocaptura son una variante de las técnicas ELISA usadas en serología, en las que en vez de antigenar las placas con el antígeno clamidial, se tapizan los pocillos con anticuerpos, policlonales o monoclonales, dirigidos contra *Chlamydia*. Estas técnicas han demostrado combinar una buena sensibilidad y especificidad, con unas excelentes posibilidades de automatización. Existen en la actualidad diversos kits comerciales de diagnóstico derivados de estas técnicas, que aunque en un principio se comercializaron para detectar *C. trachomatis* en pacientes humanos, al ser anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de género se pueden utilizar en el diagnóstico de *C. psittaci*, dando resultados muy aceptables en comparación con el aislamiento y con la IFD⁽¹²⁰⁾.

El uso de técnicas inmunocitoquímicas, ya sea utilizando como conjugado la enzima peroxidasa o la fosfatasa alcalina, sobre tejidos fijados en formol e incluidos en parafina ha supuesto enormes ventajas para el clínico patólogo, ya que permiten correlacionar el cuadro lesional con la cantidad de

antígeno clamidial presente en dicho tejido, además de dar la posibilidad de realizar estudios retrospectivos sobre material archivado. Este tipo de técnicas son utilizados tanto en clamidiosis humanas⁽³⁶⁾ como en clamidiosis aviares⁽³⁵⁾.

V.1.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .

El hecho de que el ADN de cada microorganismo tenga una cadena de bases propia e irrepetible es la base de esta técnica de reciente instauración, y que esta siendo ampliamente utilizada en el diagnóstico de *C. trachomatis* en pacientes humanos. Se trata de un proceso en el que se parte de una secuencia determinada de ADN de *Chlamydia*, del que se obtienen, con la aplicación de la enzima adecuada (polimerasa), múltiples copias, entre 10^{10} y 10^{11} . Para conseguir estas copias la enzima polimerasa necesita un fragmento de ADN que le sirva de matriz y un oligonucleótido cebador característico de cada molde; a este cebador se le denomina "primer". También es necesario suministrar los desoxirribonucleótidos trifosfatados que se irán añadiendo a la cadena por la polimerasa a partir del "primer" para formar las distintas copias. La PCR en sí consta de tres etapas, una primera de desnaturalización del ADN objetivo, unión de los primers a sus lugares específicos y elongación de las cadenas por acción de la polimerasa. La técnica se realiza en ciclos controlados por la temperatura: elevando primero para desnaturalizar el ADN, descendiendo después para permitir la acción de la polimerasa, en cada ciclo se dobla el número de cadenas realizándose de 30 a 40 ciclos. La revelación de la presencia o no del producto final de la PCR se realiza en electroforesis en gel de agar. La gran ventaja de la PCR es su enorme sensibilidad, superior al resto de técnicas descritas (IFD, inmunocaptura), y el poder trabajar con clamidias no viables al contrario que las técnicas de aislamiento; también hay que destacar su alta especificidad debido a que la cadena de ADN que detecta va a ser única para cada agente patógeno. Esta detección puede llevarse a nivel de género, especie o incluso serovariedad, eligiendo el primer adecuado⁽³³⁾. Entre sus desventajas destaca su dificultad, y hasta el momento alto costo, el peligro de contaminación externa aumentado por su alta sensibilidad, pues es capaz de detectar 1 cuerpo elemental/ml, y el que se ha demostrado⁽¹¹³⁾ que algunas moléculas, como por ejemplo la hemoglobina, pueden inhibir la polimerasa dando lugar a falsos negativos.

V.1.4.- Aislamiento de *Chlamydia*.

Al ser *Chlamydia* una bacteria intracelular parásita obligada, va a ser necesario para su aislamiento el cultivo en células vivas, éste se hace normalmente en embrión de pollo o en líneas celulares, ya que la inoculación en animales de laboratorio se ha ido abandonando progresivamente como método de diagnóstico, al ser muy largo y poco sensible en comparación con los dos anteriores.

Es importante, debido a la relativa poca resistencia de las clamidias ante el medio externo, que las muestras vayan vehiculadas en un medio de transporte adecuado. Un medio sencillo para la conservación en congelación durante varios meses, sería un tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,2), al que se le añade sacarosa a una concentración de 0,2 M⁽¹⁰³⁾, teniendo en cuenta que se debe diluir en el momento de la inoculación a 1/5 para evitar el efecto tóxico de la sacarosa sobre las células. A este medio se le adicionan antibióticos y antifúngicos que no afecten a clamidia, siendo los más utilizados la gentamicina, la vancomicina, la anfotericina B y la nistatina.

V.1.4.1.- Inoculación en huevo embrionado.

Se trata del método de aislamiento más antiguo, pero aún conserva su vigencia por sus buenos resultados. *Chlamydia* se reproduce perfectamente en el saco vitelino de embriones de pollo de 6-7 días⁽⁶⁰⁾ por lo que la inoculación se hace vía intravitelina, debiendo tener el inóculo un volumen de 0,1 a

0,5 ml y conteniendo antibióticos y antifúngicos o bien haber sido filtrado con un filtro de 0,45 mm de poro⁽⁶¹⁾. Los huevos se incuban en cámara húmeda a 37°C controlándose diariamente a partir del tercer día post-inoculación, ya que los embriones muertos en los dos primeros días se consideraran como resultado del efecto traumático de la inoculación. En condiciones normales el embrión muere a los 4-10 días post-inoculación, generalmente en los días 6-8, apreciándose modificaciones en los órganos y anejos del embrión, tales como: disminución del grosor del saco vitelino, congestión de los vasos sanguíneos y presencia de hemorragias sobre las membranas y piel del embrión. La infección es comprobada mediante la tinción de frotis del saco vitelino con la técnica de Stamp o similares. A pesar de su coste económico y buena sensibilidad, tiene la desventaja de ser un método bastante largo y engorroso, además de que algunas cepas tienen problemas de adaptación a este cultivo, siendo necesario el dar algunos pases ciegos⁽¹⁰⁵⁾, por lo que en la actualidad se tiende al cultivo en líneas celulares.

V.1.4.2.- Inoculación sobre cultivos celulares.

Los inconvenientes antes señalados han motivado la adaptación a *C. psittaci* de los métodos de cultivo celular clásicamente utilizados para *C. trachomatis* en el hombre^(4,9). El cultivo de estos microorganismos presenta algunas ventajas sobre la inoculación en embrión de pollo⁽⁵⁵⁾, como son mejor crecimiento clamidial y sobre todo mayor facilidad para el seguimiento de la evolución de la infección, con una mejor identificación y cuantificación del efecto citopático. La línea celular más utilizada en el aislamiento de *C. psittaci* de origen aviar es la McCoy⁽⁵⁷⁾.

Son varias las técnicas seguidas en el aislamiento de *Chlamydia* sobre los cultivos celulares. Todas tienen la misma base pero se diferencian esencialmente en el tratamiento físico-químico al que se someten las células para favorecer la penetración y el desarrollo de estos microorganismos. Estos tratamientos se pueden clasificar en dos grandes grupos:

a) Factores que inhiben o retrasan la multiplicación celular.

Es importante que se realice la infección de las células cuando el cultivo celular esté en fase estacionaria. En efecto, se ha comprobado⁽³³⁾ que un cultivo en esta fase produce diez veces más inclusiones que otro que continúe reproduciéndose.

- **Irradiación:** Se ha utilizado con éxito en células McCoy, pero tiene como gran inconveniente la necesidad de una fuente de irradiación, con los peligros que ello conlleva, siendo muy poco utilizada en la práctica.

- **Tratamiento con 5-iodo-2-desoxiuridina (IDU):** Es un metabolito análogo a la timidina que se incorpora en su lugar a la cadena de ADN, dando lugar a proteínas no funcionales. El tratamiento de las células McCoy con 25 mg/ml de IDU, y la utilización⁽⁶⁾ de estas células 3-7 días más tarde ofrece tan buenos resultados como la irradiación.

- **Tratamiento con citocalasina B:** Este metabolito induce la formación de células gigantes multinucleadas al interferir en la división citoplasmática; el tratamiento con 1 mg/ml de citocalasina B, 72 horas antes de la inoculación, presenta resultados muy aceptables.

- **Tratamiento con cicloheximida:** Este compuesto químico interfiere la síntesis de ADN exclusivamente en células eucariotas, sin afectar a la replicación de *Chlamydia*, favoreciendo por tanto su desarrollo⁽⁷⁶⁾. El cultivo añadiendo 2 mg/ml en el momento de la inoculación da resultados tan

buenos como los métodos anteriores⁽⁸¹⁾, y permite un apreciable ahorro de tiempo, por lo que es el tratamiento más utilizado en la actualidad para detener la multiplicación del cultivo celular.

- **Otros tratamientos:** También se han utilizado corticoides como la cortisona⁽²⁹⁾ y la prednisolona⁽⁸⁸⁾ que actúan retrasando el crecimiento celular. Igualmente también se han utilizado⁽²⁹⁾ otras sustancias inhibitoras de la mitosis, como la vinblastina y la colchicina.

b) Factores que incrementan la penetración de *Chlamydia* en la célula bacteriana.

La adsorción y la penetración de las clamidias en las células hospedadoras son procesos lentos y de baja frecuencia. Si aumentamos la posibilidad de contacto entre el agente clamidial y la célula eucariota, la tasa de adsorción y penetración, y por lo tanto de infección, aumenta considerablemente⁽³³⁾.

- **Centrifugación del inóculo-células hospedadoras:** El efecto favorecedor de la centrifugación para la infección de las células ha sido demostrado por diversos autores^(14, 62), siendo máximo a 3000 g.

- **Tratamiento con dietil-aminoetil dextrano (DEAE-D):** Se trata de un polícatión polibásico de alto peso molecular y soluble en agua, que al estar cargado positivamente sirve de puente electrostático entre las membranas de las clamidias y de las células eucariotas, ambas cargadas negativamente. El DEAE-D se añade al cultivo celular a una concentración de 20 mg/ml, manteniéndolo durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se lava cuidadosamente y se procede a la inoculación⁽⁵²⁾. El tratamiento de las células con DEAE-D⁽⁸¹⁾ permite suprimir la centrifugación del inóculo con las células, obteniendo resultados equivalentes.

La práctica habitual es combinar dos o más de los métodos anteriormente citados; así se combina el tratamiento con DEAE-D y con cicloheximida⁽¹⁰²⁾, IDU y DEAE-D⁽⁶⁾, cicloheximida y centrifugación⁽²⁶⁾ o citocalasina B y cortisona⁽¹¹¹⁾. En nuestro laboratorio hemos conseguido bastante buenos resultados con la siguiente técnica⁽⁹²⁾: diluir el inóculo en tampón PBS (pH 7,2) con 100 mg/ml de DEAE-D, añadir a un cultivo de células McCoy e incubar durante 2 horas en agitación continua a 37°C, posteriormente, y tras lavar dos veces, añadir cicloheximida a una concentración final de 2 mg/ml en MEM de Eagle adicionado con un 10% de suero fetal bovino.

Tras la realización de técnicas de aislamiento sobre cultivos celulares y con objeto de confirmar el aislamiento de una cepa de *Chlamydia* debemos recurrir a técnicas tales como May-Grünwald Giemsa o IFD. También se suele utilizar la técnica de placas de lisis⁽⁸³⁾ que presenta la ventaja de posibilitar la clonación de la cepa al mismo tiempo que se intenta su aislamiento, pues la capa de agar noble que se coloca sobre el tapiz celular impide la difusión de las clamidias tras la lisis celular. Mediante el colorante rojo neutro podemos teñir a todas las células vivas, no captando dicho colorante las células muertas, esto es, las placas de lisis. Una ventaja importante de esta técnica es la posibilidad de titular a diferentes cepas, siempre y cuando éstas sean líticas, en unidades formadoras de placas (UFP). El principal inconveniente, sobre todo en casos de aislamientos, es la necesidad de confirmar, fundamentalmente por IFD, la presencia de *Chlamydia* y no de un virus lítico.

Una vez que se ha conseguido el aislamiento de *Chlamydia*, si se desean realizar sucesivos pases, es conveniente la aplicación de ultrasonidos para romper las células infectadas, ya que esta técnica ha demostrado⁽⁷⁰⁾ obtener 10 veces más microorganismos, tras tres pases sucesivos, que la técnica clásica de rotura con microesferas de vidrio.

V.2.- Diagnóstico indirecto.

El diagnóstico indirecto trata de detectar la traza inmunitaria dejada en el animal por el padecimiento de la infección, y esta basado tanto en la detección y cuantificación de anticuerpos específicos como en la puesta en evidencia de una reacción inmunitaria de base celular.

V.2.1.- Diagnóstico serológico.

Este es el método de diagnóstico indirecto más utilizado, ya que ante la infección clamidial se va a producir una importante respuesta inmune humoral, principalmente ante dos tipos de antígenos: el LPS, común a todas las especies clamidiales, y contra antígenos proteicos que en su mayor parte son específicos de especie o de serotipo. Las técnicas aplicadas para la detección y cuantificación de anticuerpos se agrupan en tres tipos: reacción de fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta y técnicas tipo ELISA.

V.2.1.1.-Reacción de fijación del complemento (RFC).

Es la prueba serológica más ampliamente utilizada hasta el momento, empleando como antígeno el LPS, obtenido generalmente a partir de embriones de pollo infectados mediante extracción con éter y cloroformo⁽⁴²⁾. Con este antígeno es imposible diferenciar especies dentro del género *Chlamydia*.

A pesar de que esta técnica es de indudable utilidad para estudios epidemiológicos de la clamidiosis⁽²⁷⁾, y tiene la ventaja de que puede ser utilizada con cualquier especie animal, presenta una serie de inconvenientes importantes: en primer lugar la existencia de sueros con poder anticomplementario o de sueros hemolíticos, lo que da lugar a sueros no interpretables; la imposibilidad como hemos señalado anteriormente de detectar anticuerpos específicos por debajo del nivel de género; obtención de resultados muy variables dentro del mismo colectivo, en el caso de mamíferos, lo que hace que se recomiende para estudios a nivel de positividad del rebaño y no del individuo⁽⁸⁵⁾; y finalmente el presentar graves problemas de sensibilidad cuando se trabaja con animales con títulos bajos o en rebaños vacunados⁽⁶⁷⁾. Por todas estas razones esta técnica está siendo sustituida a nivel de laboratorio por las dos siguientes técnicas descritas a continuación.

En el caso de infección por *C. pneumoniae*, los resultados positivos se dan sólo en a infección primaria y generalmente se pierde este caracter en las reinfecciones, por lo que cuando se da una fijación positiva, siempre se tiende a considerarla como debida a infección por *C. psittaci*.

V.2.1.2.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .

Las técnicas IFI son más sensibles y específicas que la RFC^(67,91), posibilitando la detección de pequeñas concentraciones de anticuerpos en el suero, permitiendo además la diferenciación interespecífica e intraespecífica⁽⁷⁾. A pesar de sus excelentes resultados presenta algunos problemas, como son que se trata de una técnica relativamente larga y de difícil adecuación para procesar un número muy elevado de muestras, y que entraña la dificultad de presentar subjetividad en la lectura de los resultados, necesiándose personal especializado bien entrenado⁽²⁴⁾. Este último inconveniente se agrava al no disponer en la actualidad con antígenos suficientemente standardizados, obteniendo cada laboratorio los suyos propios, ya sea a partir de embrión de pollo o de cultivos celulares, presentando estos últimos unos mejores resultados⁽⁹¹⁾. Un aspecto más a resaltar, es que los resultados de la RFC y de la IFI no son siempre superponibles, existiendo en ocasiones amplias divergencias⁽⁶⁷⁾. Esto se debe a

que en ambas no intervienen las mismas fracciones antigénicas ni las mismas clases de inmunoglobulinas⁽³⁸⁾.

V.2.1.3.- Técnica ELISA.-

La técnica ELISA es la prueba serológica que se está imponiendo en la actualidad debido a sus buenos resultados de sensibilidad y especificidad, superiores a RFC y comparables a los de IFI⁽⁶⁷⁾; y sobre todo a sus grandes posibilidades de automatización, desde la dilución de los sueros a la lectura de los resultados, esta característica lo hace muy adecuado para aplicarlo a cantidades muy grandes de muestras, además de que la interpretación de los resultados es completamente objetiva al ser leídos por espectrofotometría⁽⁶⁹⁾. La técnica ELISA permite diferenciar entre IgG e IgM⁽⁵⁶⁾, y así evaluar la antigüedad del proceso infeccioso.

El origen del antígeno utilizado en estas técnicas es variable según los autores, ya que se ha usado tanto LPS procedente de clamidias cultivadas en células⁽³⁹⁾, como antígeno comercial para RFC⁽⁵⁶⁾ o placas antigenadas comerciales para *C. trachomatis*⁽⁶⁹⁾. Un antígeno muy utilizado actualmente es el constituido por cuerpos elementales de *C. psittaci* parcialmente purificados por centrifugaciones diferenciales en gradientes de Renografin. En este tipo de antígeno los principales determinantes antigénicos reconocidos son los de naturaleza proteica frente a los específicos del LPS⁽²⁵⁾, esto es lógico ya que en los cuerpos elementales intactos el LPS se presenta localizado mayoritariamente en la cara interna de la membrana clamidial⁽⁹²⁾. Por esta característica, cuando se utilizan⁽⁶⁷⁾ varias cepas diferentes como antígenos los valores obtenidos con el mismo suero varían significativamente.

Para finalizar este capítulo, hemos de decir que muchos casos diagnosticados de psitacosis, son en realidad ocasionados por *C. pneumoniae*; esto es debido a que para el diagnóstico serológico, se emplea un antígeno de género, común a ambas especies, por lo que para evaluar la situación real se debe emplear una técnica de microinmunofluorescencia utilizando un antígeno tipo específico.

Muchos aficionados a los pájaros, palomistas, etc., pueden desarrollar un proceso pulmonar mediado inmunológicamente, bajo forma de una alveolitis de origen alérgico, debido a la continua inhalación de antígenos aviáres.

La interpretación de los resultados serológicos en estos sujetos es compleja, dado que con frecuencia presentan una alta tasa de inmunoglobulinas con gran cantidad de anticuerpos contra muchos antígenos, como consecuencia de la complejidad inmunológica del proceso. Además, es también frecuente la sensibilización frente a antígenos del huevo, lo que complica el diagnóstico de la clamidiosis, ya que la mayoría de los antígenos están preparados a partir del cultivo del agente en saco vitelino, lo que puede ocasionar falsos positivos debido a anticuerpos dirigidos contra estos antígenos, y no contra los de *Chlamydia*.

VI. TRATAMIENTO.

La recuperación de un ave infectada requiere de un sistema inmune plenamente competente mientras el tratamiento pone freno a la infección. Así, para el tratamiento de una infección aguda es necesario⁽⁵²⁾ no sólo la administración de la dosis terapéutica del antibiótico específico (tetraciclina, doxiciclina), sino también de cuidados de apoyo tales como fluidoterapia, mantenimiento en ambiente cálido y administración de protectores hepáticos para ayudar a la detoxificación de este órgano.

VII. CONTROL.

Los términos control y erradicación se emplean a menudo con poca exactitud. Las definiciones correctas serían las de Andrews y Langmuir (1963)⁽¹¹⁾, modificadas por Yekutieli (1980)⁽¹²⁴⁾: “control es la reducción intencionada de la prevalencia de una enfermedad específica hasta niveles relativamente bajos, aunque la transmisión se de con suficiente frecuencia como para impedir su desaparición; la erradicación es lo mismo pero llevado al punto de ausencia continuada de transmisión dentro de una zona específica, mediante una campaña limitada en el tiempo”.

La erradicación de la clamidiosis no es una cuestión factible, debido al amplio rango de hospedadores reservorios, tanto para el hombre como para las especies domésticas. Cuando empleamos el término control con relación a la clamidiosis, hemos de referirnos a una especie hospedadora en concreto. Dado que la clamidiosis humana es, casi siempre, adquirida a partir de fuentes aviares, nos corresponde a los veterinarios un indudable papel en su prevención, tanto en los portadores como en la especie humana.

Por lo que respecta a la legislación referente a este punto, la O.I.E., en el “Código zoosanitario internacional”⁽²⁾ incluye a la psitacosis-hornitosis entre las enfermedades de la lista B, que designa la lista de enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables. Estas enfermedades son por lo general objeto de informe anual, aunque en algunos casos, pueden ser objeto de informes más frecuentes, y establece en el capítulo 3.6.4, destinado a la psitacosis-hornitosis, que Las administraciones veterinarias de los países libres de psitacosis-hornitosis pueden prohibir la importación o el tránsito por su territorio, procedentes directa o indirectamente de países que se consideren infectados de psitacosis-hornitosis, de aves de la familia Psitácidas. (Artículo 3.6.4.1); además, las Administraciones veterinarias de los países importadores deberán exigir: para las aves psitácidas la presentación de un certificado zoosanitario internacional en el que conste que las aves:

- 1) no presentaron, el día del embarque, ningún signo clínico de psitacosis-hornitosis.
- 2) permanecieron bajo supervisión veterinaria durante los 45 días anteriores al embarque y fueron sometidos a un tratamiento de clortetraciclina contra la psitacosis-hornitosis.

La legislación aplicable en nuestro país se contempla entre otras, en las siguientes disposiciones:

- Decreto de 24 de abril de 1975 nº 1119/75 del Mº de Agricultura, BOE de 28 de mayo⁽¹¹⁾, sobre Autorización y registro de núcleos zoológicos, establecimientos para la práctica de la equitación y centros para el fomento y cuidado de los animales.
- Orden de 28 de julio de 1980 del Mº de Agricultura, BOE de 11 de septiembre⁽¹²⁾, que desarrolla el Decreto anterior (de 24.04.75).
- R.D. 1316/1992, de 30 de octubre, BOE de 1 de diciembre⁽¹³⁾, por el que se establecen los controles veterinarios y zootécnicos aplicables en los intercambios intracomunitarios de determinados animales vivos y productos con vistas a la realización del mercado interior. En este R.D. se recogen las disposiciones comunitarias de las Directivas 90/425 de 26 de julio, y 92/60, de 30 de junio.

- R.D.1317/1992, de 30 de octubre, BOE de 5 de diciembre⁽¹⁴⁾, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros. En este R.D. se recoge lo indicado por la Directiva Comunitaria 90/539 de 15 de octubre referente a estos aspectos, especificándose las condiciones de control de una serie de enfermedades, que deben figurar en los programas sanitarios con vistas a la autorización de una granja (*salmonelosis -S. pullorum-gallinarum, S. arizonae-, micoplasmosis -M. gallisepticum, M. meleagridis-*).
- R.D. 1430/92 del Mº de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), de 27 de noviembre, BOE de 16 de enero de 1993⁽¹⁵⁾ y R.D. 2022/93 de Presidencia del Gobierno, de 19 de noviembre, BOE de 5 de enero de 1994⁽¹⁶⁾, que recogen la legislación comunitaria reflejada en las Directivas del Consejo 90/675 de 10 de diciembre de 1990 y 91/496 de 15 de julio de 1991, referente a regulación de los principios relativos a la organización de los controles veterinarios de identidad de los animales y de los productos respectivamente, que se introduzcan en la Unión Europea, procedentes de Países Terceros. Se establece que en los Puestos de Inspección Fronteriza (P.I.F.) autorizados al respecto, para la introducción en la Comunidad de animales vivos y productos de origen animal, se disponga de los Servicios Veterinarios adecuados para llevar a cabo el Control Sanitario de los mismos, de tal forma que a la llegada al P.I.F., el Veterinario realiza una inspección, tanto documental como física y de identidad de la partida, emitiendo posteriormente un Certificado que permite la libre circulación de la misma por cualquier estado miembro de la UE, si reúne todas las exigencias que se establecen en las Normativas anteriormente reseñadas; en caso contrario, no se autoriza la entrada, o bien se establecen medidas sanitarias complementarias en destino (cuarentenas, análisis, etc.) o bien se envía a sacrificio o destrucción.
- R.D. 1881/1994, del MOPA, de 16 de septiembre, BOE de 18 de octubre⁽¹⁷⁾, por el que se establecen las condiciones de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de países terceros, de animales, espermatozoides y embriones no sometidos, con respecto a estas condiciones, a las disposiciones contenidas en la sección 1ª del anexo A del R.D. 1316/1992, de 30 de octubre⁽¹⁴⁾. En este R.D. aparece por primera vez mención explícita a las aves psitácidas, que son tratadas de modo particular en su artículo 7 referido a *Condiciones de policía sanitaria para los intercambios de aves*, y en el que en su apartado 2, se indica que, además de cumplir los requisitos generales para cualquier ave, las psitácidas deberán:
 - a) *No proceder de una explotación ni haber estado en contacto con animales de una explotación en la que se haya diagnosticado la psitacosis (Chlamydia psittaci). La prohibición deberá durar, por lo menos, dos meses, a partir del último caso diagnosticado y de un tratamiento efectuado bajo control veterinario que se reconocerá con arreglo al procedimiento comunitario establecido.*
 - b) *Estar identificadas de conformidad con lo dispuesto en el párrafo c) del apartado 1 del artículo 3 del R.D. 1316/1992.*
 - c) *Ir acompañadas de un documento comercial visado por un veterinario oficial o por el veterinario que se encuentre a cargo de la explotación o del comercio de origen y en quien la autoridad competente haya delegado esta competencia.*

En este R.D. se confiere a la psitacosis el carácter de enfermedad de declaración obligatoria, junto con las de Newcastle y la influenza aviar, únicos procesos aviarios que hasta entonces tenían este carácter.

- R.D. 361/1995, del MOPA, de 10 de marzo, BOE de 13 de abril⁽¹⁸⁾, por el que se modifica el R.D. 1317/1992, de 30 de octubre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplica-

bles a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros.

Este R.D. actualiza el de referencia, a la vez que introduce el contenido de la Decisión 92/340/CEE, relativo al control serológico para la detección de anticuerpos frente a la enfermedad de Newcastle en aves de corral y al aislamiento del virus en aves de matadero. Así mismo se recogen las modificaciones introducidas por las Decisiones de la Comisión 92/369/CEE, de 24 de junio, y 93/152CEE, de 8 de febrero.

A nivel de nuestra Comunidad Autónoma, encontramos el Decreto nº 14/1995, de 31 de marzo, BORM de 21 de Abril⁽¹⁹⁾, por el que se dictan normas para la ordenación sanitaria y zootécnica de las explotaciones avícolas y salas de incubación en la Región de Murcia.

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS.

Dada la ubicuidad de *C. psittaci* entre las especies aviáres y mamíferas, es indudable que hay que hay un considerable potencial para descubrir nuevos síndromes asociados a la infección por este microorganismo. Casi siempre habrá un ambiente contaminado, y la probabilidad de expresión de una infección virulenta en un nuevo hospedador es muy alta.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDREWS, J.M.; LANGMUIR, A.D.: The philosophy of the disease eradication. *Am. J. Pub. Health*, 53:1. 1963. (Cit Harris, J.W. *W.P.S.A. Journal*, 39:87, 1983).
2. ANÓNIMO: Código zoonosario internacional. *Office International des Epizooties*. 1993. Paris.
3. ALEXANDER, J.J.: Separation of protein synthesis in Meningo-pneumonitis agent from that in L cells by differential susceptibility to cicloheximide. *J. Bacteriol.*, 95: 327, 1968.
4. ALLAN, I.; PEARCE, J.H.: Modulation by centrifugation of cell susceptibility to chlamydial infection. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 87, 1979.
5. ANDERSEN, A.A.: Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 707, 1991.
6. ANDERSON, I.E.: Comparison of five ovine isolates of *Chlamydia psittaci*: an evaluation of three cell culture treatments. *Med. Lab. Sci.*, 43: 241, 1986.
7. ANDERSON, I.E.: Comparison of some ovine *Chlamydia psittaci* isolates by indirect immunofluorescence. *Vet. Microbiol.*, 13: 69, 1987.
8. BARRON, A.L.: *Microbiology of Chlamydia*. Ed. CRC Press Inc. Boca Raton. 1988.
9. BAVOIL, P.; OHLIN, O.; SCHACHTER, J.: Role of disulfide binding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.*, 44: 479, 1984.
10. BECERRA, V.M.; STORZ, J.: Tissue culture adaptation and pathogenic properties of an ovine chlamydial abortion strain. *Zbl. Vet. Med.*, 21: 290, 1974.
11. Boletín Oficial del Estado de 28 de Mayo de 1975.
12. Boletín Oficial del Estado de 11 de Septiembre de 1980.
13. Boletín Oficial del Estado de 1 de Diciembre de 1992.
14. Boletín Oficial del Estado de 5 de Diciembre de 1992.
15. Boletín Oficial del Estado de 16 de Enero de 1993.
16. Boletín Oficial del Estado de 5 de Enero de 1994.
17. Boletín Oficial del Estado de 18 de Octubre de 1994.
18. Boletín Oficial del Estado de 13 de Abril de 1995.

19. Boletín Oficial de la Región de Murcia de 31 de marzo de 1995.
20. BRADE, L.; SCHRAMEK, S.; SCHADE, U.; BRADE, H.: Chemical, biological and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 54: 568, 1986.
21. BYRNE, G.I.: Requeriments for ingestion of *Chlamydia psittaci* by mouse fibroblasts (L cells). *Infect. Immun.*, 14: 645, 1976.
22. BYRNE, G.I.; MOULDER, J.W.: Parasite-specific phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. *Infect. Immun.*, 9: 598, 1978.
23. CALDWELL, H.D.; HITCHCOCK, P.J.: Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: location of the epitope on chlamydial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 44: 306, 1984.
24. CATALAN, F.: Apport des méthodes récentes au diagnostic des chlamydioses. *Ann. Biol. Clin.*, 43: 157, 1985.
25. CEVENTINI, R.; MORONI, A.; SAMBRI, V.; PERINI, S.; LA PLACA, M.: Serological response to chlamydial infection in sheep, studied by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 47: 459, 1989.
26. CHALMERS, W.S.K.; FARMER, H.; EVANS, R.T.; WOOLCOCK, P.R.: Isolation in McCoy cells of *Chlamydia psittaci* obtained from the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Avian Pathol.*, 12: 341, 1983.
27. CUELLO, F.; SALINAS, J.; CARO, M.R.; GALLEGRO, M.C.; SANCHEZ, M.J.; BUENDIA, A.J.; BRETON, J.: Prevalencia de la clamidiosis ovina y caprina en la región de Murcia. *An. Vet. (Murcia)*, 8: 39, 1992.
28. DENAMUR, E.; SAYADA, C.; SOURIAU, A.; ORFILA, J.; RODOLAKIS, A.; ELION, J.: Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2525, 1991.
29. DENNIS, M.W.; STORZ, J.: Infectivity of *Chlamydia psittaci* of bovine and avian origins for cultured cells. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1897, 1982.
30. DHIR, S.P.; BOATMAN, E.S.: Location of polysaccharide on *Chlamydia psittaci* by silver-methenamine staining and electron microscopy. *J. Bacteriol.*, 111: 267, 1972.
31. DURFEE, P.T.; MOORE, R.M.: Human psittacosis in the United States, 1971-1973. *J. Infect. Dis.*, 131: 193, 1975.
32. DURFEE, P.T.: Psittacosis in humans in the United States, 1974. *J. Infect. Dis.*, 132: 604, 1975.
33. EB, F.; ORFILA, J.: État actuel du diagnostic biologique des Chlamydioses. *Bull. Inst. Pasteur*, 76: 247, 1978.
34. EB, F.; ORFILA, J.: Structure antigénique des *Chlamydiae*: aspects fondamentaux, applications pratiques. *Bull. Inst. Pasteur*, 84: 149, 1986.
35. EDLINGER, E.: Biologie des *Chlamydiae*. *Bull. Mém. Soc. Méd. Paris*, 7: 53, 1979.
36. EDWARDS, J.M.; CAMPBELL, A.R.; TAIT, A.; LUSHER, M.: Demonstration of *Chlamydia trachomatis* in colposcopic cervical biopsy specimens by an immunoperoxidase method. *J. Clin. Pathol.*, 44: 712, 1991.
37. EISSEMBERG, L.G.; WYRICK, P.B.: Inhibition of phagolysosome fusion is localized to *Chlamydia psittaci*-laden vacuoles. *Infect. Immun.*, 32: 889, 1981.
38. FAYE, P.: Aspects vétérinaires du diagnostic des Chlamydioses. *Bull. Mém. Soc. Méd. Paris*, 7: 69, 1979.
39. FUKUSHI, H.; HAYASHI, Y.; OKUDA, Y.; SHIMAMURA, S.; HIRAI, K.: An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Chlamydia psittaci* in animal sera. *Bull. Fac. Agric. Gifu University*, 50: 265, 1985.
40. FUKUSHI, H.; HIRAI, K.: Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 306, 1992.
41. FUKUSHI, H.; HIRAI, K.: *Chlamydia pecorum*, the fourth species of the Genus *Chlamydia*. *Microbiol. Immunol.*, 37: 515, 1993.
42. GALANOS, C.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O.: A new method for the extraction of R Lipopolysaccharides. *European J. Biochem.*, 9: 245, 1969.
43. GIROUD, P.; ROGER, F.; DUMAS, N.: Certains avortements chez la femme peuvent être dus à des agents situés à côté du groupe de la psittacose. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 242: 697, 1956.
44. GRIMES, J.E.: Transmission of *Chlamydiae* from grackles to turkeys. *Avian Dis.*, 22: 308, 1978.
44. GRIMES, J.E.; CLARK, F.D.: Pet psittacine birds: a continuing potential source of psittacosis for humans. *Texas Med.*, 82: 46, 1986.
46. GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C.; CAMPBELL, L.A.; WANG, S.P.: *Chlamydia pneumontae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 88, 1989.
47. GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C.; WANG, S.P.; ALTMAN, J.: A new *Chlamydia psittaci* strain called TWAR from acute respiratory tract infections. *N. Engl. J. Med.*, 315: 161, 1987.
48. GRUCHY, P.H.: Chlamydiosis in collared doves. *Vet. Rec.*, 113: 327, 1983.
49. HACKSTADT, T.: Identification and properties of chlamydial polypeptides that bind eucaryotic cell surface components. *J. Bacteriol.*, 165: 13, 1986.

50. HATCH, T.P.; MICELI, M.; SILVERMAN, J.A.: Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *J. Bacteriol.*, 162: 938, 1985.
51. HARRIS, J.W.: Zoonotic human Chlamydia of avian origin - A review with particular reference to epidemiology and control. *W.P.S. Journal*, 39: 5-23, 1983.
52. HARRISON, M.J.: Enhancing effect of DEAE-Dextran on inclusion counts of an ovine *Chlamydia* in cell culture. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 48: 207, 1970.
53. HEWINSON, R.G.; GRIFFITHS, P.C.; RANKIN, S.E.S.; DAWSON, M.; WOODWARD, M.J.: Towards a differential polymerase chain reaction test for *Chlamydia psittaci*. *Vet. Rec.*, 128: 381, 1991.
54. HODINKA, R.L.; WYRICK, P.B.: Ultrastructural study of mode of entry of *Chlamydia psittaci* into L-929 cells. *Infect. Immun.*, 54: 855, 1986.
55. HOOD, J.W.C.; McMARTIN, D.A.: Comparative susceptibility of embryonated hen eggs and pig lung alveolar macrophages to chlamydial infection. *Vet. Res. Comm.*, 9: 135, 1985.
56. JENUM, P.A.: Antibodies against *Chlamydia* measured by an ELISA method. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C*, 93: 175, 1985.
57. JOHNSON, F.W.A.; HOBSON, D.: Factors affecting the sensitivity of replicating McCoy cells in the isolation and growth of *Chlamydia* (TRIC agents). *J. Hyg. Camb.*, 76: 441, 1976.
58. JOHNSON, M.C.; GRIMES, J.E.: Resistance of wild birds to infection by *Chlamydia psittaci* of mammalian origin. *J. Infect. Dis.*, 147: 162, 1983.
59. KALTENBÖCK, B.; KOUSOULAS, K.G.; STORZ, J.: Two-step polymerase chain reactions and restrictions endonuclease analyses detect and differentiate *ompA* DNA of *Chlamydia* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 1098, 1992.
60. KORDOVA, N.; PONFFENROTH, L.; WILT, J.C.: Lysosomes and the "toxicity" of Rickettsiales. III. Response of L cells infected with egg-attenuated *C. psittaci* 6BC strain. *Can. J. Microbiol.*, 18: 1343, 1972.
61. KORDOVA, N.; WILT, J.C.; NEUMAN, M.R.: Infectivity of penicillin-induced *Chlamydia psittaci* forms for cell cultures from the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Zbl. Bakt.*, 246: 119, 1980.
62. KUO C.C.; CHEN, H.H.; WANG, S.P.; GRAYSTON, J.T.: Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J. Clin. Microbiol.*, 24: 1034, 1986.
63. KUO, C.C.; WANG, S.P.; GRAYSTON, J.T.: Differentiation of TRIC and LGV organisms based on enhancement of infectivity by DEAE-dextran in cell culture. *J. Infect. Dis.*, 125: 313, 1973.
64. LEIBOVITZ, L.: Chlamydia: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Fish Dis.*, 12: 125, 1989.
65. LEVITT, D.; BAROL, J.: The immunobiology of *Chlamydia*. *Immunol. Today*, 8: 246, 1987.
66. LOUIS, C.; NICOLAS, G.; EB, F.; LEFEBVRE, J.F.; ORFILA, I.: Modifications of the envelope of *Chlamydia psittaci* during its developmental cycle: Freeze-fracture study of complementary replicas. *J. Bacteriol.*, 141: 868, 1980.
67. MARKEY, B.K.; McNULTY, M.S.; TODD, D.: Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Vet. Microbiol.*, 36: 233, 1993.
68. McCHESNEY, S.L.; ENGLAND, J.J.; McCHESNEY, A.E.: *Chlamydia psittaci* induced pneumonia in a horse. *Cornell Vet.*, 72: 92, 1982.
69. MILON, A.; PELLERIN, J.L.; GERAL, M.F.; PEROL, S.; LAUTIE, R.: Sérologie de la Chlamydiaose ovine par le test ELISA. Utilisation d'un antigène commercial préparé à partir d'une souche de *Chlamydia trachomatis*. *Rev. Méd. Vét.*, 136: 13, 1985.
70. MONCAN, T.; EB, F.; ORFILA, J.: Use of ultrasound to increase infection of McCoy cell monolayers by *Chlamydia trachomatis* strain. *Biologicals*, 19: 53, 1991.
71. MOULDER, J.W.: *Chlamydiales* Starz and Page 1971. En: Bergay's Manual of Systematic Bacteriology. Vol I. Edits. N.R. Krieg y J.G. Holt. Williams & Wilkins. Baltimore. Pag. 729, 1984.
72. MOULDER, J.W.: Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.*, 55: 143, 1991.
73. NEWHALL, W.J.: Biosynthesis and disulfide crosslinking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.*, 55: 162, 1987.
74. NURMINEN, M.; WAHLSTRÖM, E.; KLEEMOLA, M.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; MÄKELÄ, P.H.: Immunologically related ketodeoxyoctonate-containing structures in *Chlamydia trachomatis*, Re mutants of *Salmonella* species, and *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *Infect. Immun.*, 44: 609, 1984.
75. PAGE, L.A.: Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns, 1945. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 18: 51, 1968.
76. PAGE, L.A.: Interspecies transfer of Psittacosis-LGV-Trachoma agents: Pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. *Am. J. Vet. Res.*, 27: 397, 1966.
77. PEREZ-MARTINEZ, J.A.; STORZ, J.: Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. *Infect. Immun.*, 50: 905, 1985.

78. PEREZ-MARTINEZ, J.A.; STORZ, J.: Propagation of ovine and bovine abortion strains of *Chlamydia psittaci* in suspension cultures of L-cells. *J. Vet. Med. B*, 33: 346, 1986.
79. PRADN, C.J.; PEARCE, J.H.: Ultrastructural studies on the intracellular fate of *Chlamydia psittaci* (strain Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis) and *Chlamydia trachomatis* (strain Lymphogranuloma Venereum 434): Modulation of intracellular events and relationship with endocytic mechanism. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2107, 1989.
80. REGISTER, K.B.; DAVIS, C.H.; WYRICK, P.B.; SHAFER, W.M.; SPITZNAGEL, J.K.: Non-oxidative antimicrobial effects of human polymorphonuclear leukocyte granule proteins on *Chlamydia* spp. *in vitro*. *Infect. Immun.* 55: 2420, 1987.
81. RIDGWAY, G.L.: The laboratory diagnosis of Chlamydial infection. En: Chlamydial Infections. Proceeding of the 6th International Symposium on Human Chlamydial Infections. Cambridge University Press. Sandestand. pag. 539. 1986.
82. ROBERTS, J.P.; GRIMES, J.E.: *Chlamydia* shedding by four species of wild birds. *Avian. Dis.*, 22: 698, 1978.
83. RODOLAKIS, A.; CHANCERELLE, L.: Dénombrement direct à l'isolement de *Chlamydia psittaci* au moyen de la technique des plages de lyse. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128 B: 81, 1977.
84. RODOLAKIS, A.: Propriétés biologiques des *Chlamydia*. *Ann. Rech. Vét.*, 18: 19, 1987.
85. RODOLAKIS, A.: Diagnostic de la Chlamydirose abortive. *Ann. Rech. Vét.*, 19: 213, 1988.
86. RODOLAKIS, A.; BERNARD, F.; LANTIER, F.: Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants. *Res. Vet. Sci.*, 46: 34, 1989.
87. RODOLAKIS, A.; SOURIAU, A.: Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence. *Vet. Microbiol.*, 31: 263, 1992.
88. RONSHOLT, L.: A modified isolation technique for *Chlamydia psittaci* in L-cells treated with cycloheximide and glucocorticoid. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B*, 89: 13, 1981.
89. RUPPNER, R.; BEHYMER, D.E.; DELONG III, W.J.; FRANTI, C.E.; SCHULZ, T.: Enzyme immunoassay of *Chlamydia* in birds. *Av. Dis.*, 28: 608, 1984.
90. SALINAS, J.; CARO, M.R.; CUELLO, F.: Antibody prevalence and isolation of *Chlamydia psittaci* from pigeons (*Columba livia*). *Avian Dis.*, 37: 523, 1993.
91. SALINAS, J.; CARO, M.R.; CUELLO, F.: Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to *Chlamydia psittaci* in pigeon sera. *J. Vet. Med B*, 40: 239, 1993.
92. SALINAS, J.; SANCHEZ, J.; BUENDIA, A.J.; SOURIAU, A.; RODOLAKIS, A.; BERNABE, A.; CUELLO, F.: The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. *Res. Microbiol.*, 145: 611, 1994.
93. SALINAS, J.; SOURIAU, A.; CUELLO, F.; RODOLAKIS, A.: Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.*, en prensa, 1995.
94. SALINAS, J.; SOURIAU, A.; DE SA, C.; ANDERSEN, A.; RODOLAKIS, A.: Serotype 2-specific antigens from ruminant strains of *Chlamydia pecorum* detected by monoclonal antibodies. *Vet. Rec.*, en prensa, 1995.
95. SANCHEZ, J.; NAVARRO, J.A.; SALINAS, J.; CARO, M.R.; CUELLO, F.; BERNABE, A.: Detection of chlamydial antigen by immunohistochemical methods in psittacine birds. Proceedings of The 1993 European Conference on Avian Medicine & Surgery. Utrecht. pag. 472. 1993.
96. SCHACHTER, J.; BANKS, J.; SUGGS, N.; SUNG, M.; STORZ, J.; MEYER, K.F.: Serotyping of *Chlamydia* isolates of ovine origin. *Infect. Immun.*, 9: 92, 1974.
97. SCHACHTER, J.; BANKS, J.; SUGGS, N.; SUNG, M.; STORZ, J.; MEYER, K.F.: Serotyping of *Chlamydia* isolates of bovine origin. *Infect. Immun.*, 11: 904, 1975.
98. SCHACHTER, J.; CALDWELL, H.D.: *Chlamydiae*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34: 285, 1980.
99. SCHACHTER, J.: Human *Chlamydia psittaci* infection. En: Chlamydial Infections. Proceedings of the 6th International Symposium on Human Chlamydial Infections, Cambridge University Press. Sanderstand. pag. 311, 1986.
100. SCHIEFER, H.G.; KRAUSS, H.; SCHUMMER, U.: Anionic sites on *Chlamydia* membranes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15: 41, 1982.
101. SOURIAU, A.; Le ROUZIC, E.; BERNARD, F.; RODOLAKIS, A.: Differentiation of abortion-inducing and intestinal strains of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants by the microimmunofluorescence test. *Vet. Rec.*, 132: 217, 1993.
102. SPEARS, P.; STORZ, J.: Biotyping of *Chlamydia psittaci* based on inclusion morphology and response to diethylaminoethyl-dextran and cycloheximide. *Infect. Immun.*, 24: 224, 1979.
103. SPENCER, W.N.; JOHNSON, F.W.A.: Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.*, 113: 535, 1983.

104. STOKES, G.V.: Cycloheximide-resistant glycosylation in L cells infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect. Immun.*, 9: 497, 1974.
105. STORZ, J.: *Chlamydia and Chlamydia induced diseases*. Ed. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois, 1971.
106. STORZ, J.; PAGE, L.A.: Taxonomy of the *Chlamydiae*: Reasons for classifying organisms of the Genus *Chlamydia*, Family *Chlamydiaceae*, in a separate Order, *Chlamydiales* Ord. *Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21: 332, 1971.
107. STORZ, J.; BAGHIAN, A.; KOUSOULAS, K.G.: Advances in detection and differentiation of chlamydiae from animals. En: *Chlamydial Infections. Proceeding of the 8th International Symposium on Human Chlamydial Infections. Società Editrice Esculapio. Bologna*, pag. 563, 1994.
108. STUART, E.S.; TIRRELL, S.M.; McDONALD, A.B.: Characterization of an antigen secreted by *Chlamydia*-infected cell culture. *Immunology*, 61: 527, 1987.
109. STUART, E.S.; WYRICK, P.B.; CHOONG, J.; STOLER, S.B.; McDONALD, A.B.: Examination of chlamydial glycolipid with monoclonal antibodies: cellular distribution and epitope binding. *Immunology*, 74: 740, 1991.
110. SU, H.; WATKINS, N.G.; ZHANG, Y.X.; CALDWELL, H.D.: *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect. Immun.*, 58: 1017, 1990.
111. TESSLER, J.: Effects of cortisone, cytochalasin B and cycloheximide on strains of *Chlamydia psittaci* in cell cultures. *Can. J. Comp. Med.*, 47: 352, 1983.
112. TESSLER, J.: Comparative titers of egg assay against immunofluorescent assay of *Chlamydia psittaci*. *Can. J. Comp. Med.*, 49: 109, 1985.
113. THIELE, D.; WITTENBRINK, M.M.; FISCHER, D.; KRAUSS H.: Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. *Zbl. Bakt.*, 277: 446, 1992.
114. TODD, W.J.; DOUGHRI, A.M.; STORZ, J.: Ultrastructural changes in host cellular organelles in the course of the chlamydial developmental cycle. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 236: 359, 1976.
115. TODD, W.J.; CALDWELL, H.D.: The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. *J. Infect. Dis.*, 151: 1037, 1985.
116. WANG, S.P.; GRAYSTON, J.T.: Immunologic relationship between genital TRIC lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am. J. Ophthalmol.*, 70: 367, 1970.
117. WANG, S.P.; GRAYSTON, J.T.: Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, and L2a. *J. Infect. Dis.*, 163: 403, 1991.
118. WATKINS, N.G.; CALDWELL, H.D.; HACKSTADT, T.: Chlamydial hemagglutinin identified as lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 169: 3826, 1987.
119. WERTH, D.; SCHMEER, N.; MÜLLER, H.P.; KARO, M.; KRAUSS, H.: Nachweis von antikörpergeegen *Chlamydia psittaci* und *Coxiella burnetti* bei hunden und katzen: Vergleich zwischen enzymimmun-test, immunperoxidase-technik, komplementbindungsreaktion und agargelpräzipitationstest. *J. Vet. Med. B*, 34: 165, 1987.
120. WILSMORE, A.J.; DAVIDSON, I.: "Clearview" rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection. *Vet. Rec.*, 128: 503, 1991.
121. WONG, S.Y.; BUXTON, D.; MCKINLAY, A.W.; KEELING J.; GRAY, E.S.: Pathology of human acute placentitis caused by ovine *Chlamydia psittaci*. In "Chlamydial infections". pp. 341-344. *Proceedings of the Sixth International Symposium on human Chlamydial infections.*, Sanderstand, Surrey, 1986. Edits. Oriol D., Ridgway G., Schachter J., Taylor-Robinson D., Ward M. Cambridge University Press.
122. WYRICK, P.B.; DAVIS, C.H.: Elementary body envelopes from *Chlamydia psittaci* can induce immediate cytotoxicity in resident mouse macrophages and L-cells. *Infect. Immun.*, 45: 297, 1984.
123. YATES, P.S.; STOREY, C.; LUSHER, M.: Do horses have TWAR too?. In *Proceedings of the European Society for Chlamydia Research*. p. 193. Mardh, P., La Placa, M. and Ward, M. Edits., Upsala, 1992.
124. YEKUTIEL, P.: Contributions to epidemiology and biostatistics Vol.2. *Eradication of Infectious Diseases*. 1st ed. p. 7 S. Karger, Basel (Cit Harris, J.W. *W.P.S.A. Journal*, 39:87, 1983).